



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

**ESTUDO DO POTENCIAL PSICOFARMACOLÓGICO DE PRODUTOS
DE ESPÉCIES DO GÊNERO *ERYTHROXYLUM* PROVENIENTES DO
BIOMA CAATINGA**

FELIPE DOUGLAS SILVA

SUMÉ-PB

2015

FELIPE DOUGLAS SILVA

**ESTUDO DO POTENCIAL PSICOFARMACOLÓGICO DE PRODUTOS
DE ESPÉCIES DO GÊNERO *ERYTHROXYLUM* PROVENIENTES DO
BIOMA CAATINGA**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal De Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega

SUMÉ-PB

2015

S586e Silva, Felipe Douglas.

Estudo do potencial psicofarmacológico de produtos de espécies do gênero *Erythroxylum* proveniente do bioma caatinga. / Felipe Douglas Silva. - Sumé - PB: [s.n], 2015.

58 f.

Orientador: Professor Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Plantas medicinais. 2. Farmacologia. 3. Sistema Nervoso Central. I. Título.

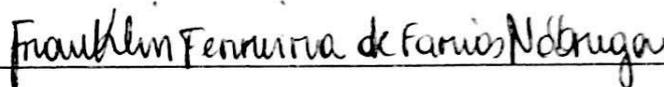
CDU: 615 (043.3)

FELIPE DOUGLAS SILVA

**ESTUDO DO POTENCIAL PSICOFARMACOLÓGICO DE PRODUTOS DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *ERYTHROXYLUM* PROVENIENTES DO BIOMA
CAATINGA**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal De Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega

Orientador



Prof. Examinador 01 – Examinador Interno UATEC - CDSA

Profa. Dra. Glauciane Danusa Coelho



Prof. Examinador 02 – Examinador Interno UATEC - CDSA

Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz

Aprovada em, 17 de março de 2015.

SUMÉ - PB

Dedico as minhas avós, Maria Salete Maciel da Silva e Maria Ferreira da Silva, que sempre me incentivaram de forma ferrenha e nunca desistiram dos meus sonhos. Meu eterno obrigado!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Luiz e Maria José, pelo amor incondicional dedicado a mim desde o início. Sem vocês nunca teria conseguido, meu muito obrigado a cada sacrifício, broncas e conselhos feitos por vocês. Sou muito abençoado por ter pais tão batalhadores.

A minha tia Maria Aparecida, pelo amor de mãe e companheirismo de uma amiga. Amo muito.

A minha prima/irmã Gabriela, por sempre estar ao meu lado, pelos momentos compartilhados, pelos conselhos, brigas, intrigas e reconciliações. É muito amor envolvido e nos entendemos da nossa forma. Obrigado.

Ao Prof. Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega, meu orientador, pela amizade construída durante o curso e pela magnífica orientação. Sem você nada disto se realizaria. Obrigado pela confiança depositada em mim, pelas correções, ensinamentos, conselhos e tempo dedicado.

A minha amiga Camila Castro, companheira de Pibic e Pivic, sempre ao meu lado mesmo nas ocasiões mais difíceis. Esse trabalho é parte seu, pois sem você nada disto estaria acontecendo. E me desculpe pelos momentos de estresse. Sei que nossa amizade será para sempre.

Aos meus companheiros do G11: Bruna, Camila, Dayse, Jucilene, Leandro, Marreiro, Raíssa, Rayza, Renally, Rhyanne, pelos momentos de risada e sofrimento. Sem a amizade de vocês tudo não teria graça. Sou grato por ter amigos tão especiais. Meu sincero Obrigado.

Aos meus colegas de curso: Bruna, Camila, Dayse, Estela, Hemerson, Jucilene, Julya, Leandro, Luanna, Marreiro, Raíssa, Rayane, Rayza, Renally, Rhyanne. Somos vitoriosos e sou mais ainda por ter vocês ao longo dessa jornada. Meu muito obrigado.

As minhas grandes e eternas amigas Luanna Vilar e Rayane Abreu, sem vocês ao meu lado nada teria sentido. Obrigado por tantos momentos bons compartilhados, tantos conselhos, momentos estes que levarei sempre no meu coração. Amo vocês.

A Layann, pelo Amor, amizade, carinho e por ter participado de tudo isto da sua forma. Os laços criados entre a gente são eternos. Obrigado por sempre estar ao meu lado e me incentivando.

Ao meu amigo/irmão Leandro Costa, tenho uma total admiração por você. Obrigado por fazer parte de tantas recordações boas! No decorrer do curso participamos de muitos momentos juntos: Propex, Pibic, Pivic, congressos, curso e laboratório. Sem dúvidas você é um irmão colocado na minha vida. Agradeço muito por tudo.

A minha amiga Rayza, pelo carinho e companheirismos que criamos no decorrer desses 5 anos de curso. Você me fez uma pessoa melhor e agradeço pelas inúmeras risadas e brigas! Só tenho a agradecer por ter uma pessoa tão especial na minha vida. Minha eterna Rayzoquinha. Amo muito.

A minha amiga Estela Beatriz, sem você não haveria tantos momentos bons para recordar. Obrigado pela amizade, companheirismo, carinhos e claro muitos sorrisos e gargalhadas. Levarei sempre no coração essa grande amizade.

Ao Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz, pela profunda admiração que tenho por você e pelo seu trabalho. Você me tornou não só uma pessoa melhor, mas também um profissional melhor. Obrigado por tanto companheirismo e risadas, sem dúvidas muitas risadas. Você ultrapassou a barreira de aluno e professor e se tornou um grande amigo e mentor! Meu eterno obrigado Professor.

A Profa. Dr^a. Magnólia de Araújo Campos, eterna coordenadora do curso e amiga, lembro até hoje das aulas e da sua empolgação para mostra o que era Biotecnologia e como essa é uma área promissora e inovadora. Meu muito obrigado pelo incentivo.

A Profa. Dr^a Glauciane Danusa, pelos princípios éticos passados em sala de aula e o companheirismo. Obrigado por sempre acreditar em mim.

As minhas queridas Profa. Dr^a Ana Mary, Profa. Dr^a Fabiana Pimentel, pelos estímulos e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Ranoel José, pelas aulas sempre dinâmicas e as provas também. Ao longo do curso se tornou um grande amigo e parceiro.

A Maria Luiza, pelo companheirismo e amor. Tivemos bons momentos juntos e sempre lembrarei disto. Você foi uma das melhores pessoas que passaram pela minha vida. Te adoro.

A minha amiga Nicolý Farias, nos conhecemos de uma forma tão especial que isso tornou o que somos, eternos amigos. Você sempre acreditou em mim e agradeço muito. E eu sei que nosso carinho vai perpetuar até o fim da nossa vida. Amo muito.

A Maria Ivanete Barros (Mainha) e Isis Terse Barros (Mana), pelo amor e carinho que criamos no decorrer dessa caminhada. Sempre vou lembrar dos sermões, conselhos, abraços e beijos. Amo muito vocês duas.

Aos meus amigos (as) universitários (as) Lucas Nascimento, Pablo Veronese, Welinágila Grangeiro, Geiza Mariana, Raul Seixas, Augusto Brito, Milca Gonçalves, Omar Cascudo, Darlyson Guimarães, Brenno Lino, Gersia Gonçalves, Emanuele Cardoso, Édipo Almeida, Natasha Lorena, Rayane Brito, Jessica Fontes, Lorrany Kerllyonai, Éryka Almeida, Suayra Marta e a todos os outros amigos universitários que de alguma forma contribuíram com a minha formação. Obrigado.

A minha linda Tia Adriana e Tio Nilton, por acreditar em mim e sempre me acolher.

Ao Prof. Dr. Josean Fachine Tavares (CBiotec/UFPB), por ter fornecido as frações metanólicas dos extratos de *Erythroxylum caatingae*, *Erythroxylum revolutum*, *Erythroxylum simonis*, *Erythroxylum paufferrense* e *Erythroxylum pulchrum*. Obrigado.

Ao Biotério Prof. Dr. Thomas George, Centro de Biotecnologia (CBiotec/UFPB), pelo fornecimento dos animais.

A minha querida Amparo e meus muitos amigos e primos do grupo C.A.C., por tantos momentos de descontração e felicidade, pelo companheirismo e amizade. Obrigado Eraldo, Edson, Erika, Anderson, Waliton, Lenildo, Simões, Silvan.

A cidade de Sumé – PB e as pessoas de sua terra que me acolheram tão carinhosamente e com tanta generosidade. Vou sentir saudades.

Ao Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA)/Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

MUITO OBRIGADO!

“ Aprendi que nem tudo são flores, nem todos os dias têm sol.
Mas não há tristeza que não passe, nem felicidade que dure para sempre.
Os dias nublados vão vir, as flores vão murchar, mas depois a primavera certamente
vai chegar!
Um dia eu descobri que a vida vale a pena ser vivida e aproveitada ao máximo,
independente das circunstâncias.
Sempre haverá um novo dia, uma nova chance, um novo amor, uma nova
oportunidade...
Mas a vida, essa é única!!!”
Desconhecido

RESUMO

A Família *Erythroxylaceae* compreende quatro gêneros com distribuição em regiões tropicais, sendo o Brasil um dos principais centros da diversidade de espécies desse gênero. No nordeste brasileiro são encontradas 71 espécies em que 13 são endêmicas do estado da Paraíba e de algumas não se tem conhecimento aprofundado sobre suas propriedades farmacológicas. Visto isso, a pesquisa tem como objetivo a observação das atividades psicofarmacológicas dos extratos metanólicos das espécies *Erythroxylum caatingae* (ECAA), *E. revolutum* (EREV), *E. pauferrense* (EPAU), *E. simonis* (ESIM) e *E. pulchrum* (EPUL) utilizando o teste de convulsões induzidas pelo Pentilenotetrazol (PTZ), o teste do labirinto de cruz elevado, teste da formalina e teste da placa quente. Esses extratos foram testados em camundongos Swiss albinos (machos e fêmeas), pesando entre 20-40 g e entre 2 e 3 meses de idade. Os testes de convulsões induzidas pelo PTZ e o labirinto de cruz elevado não apresentaram resultados com nível de significância estatístico, o que indica que os extratos não possuem atividades anticonvulsivante e ansiolítica. Na 1ª fase do teste de nocicepção os extratos EREV (64,0±10,3) e ESIM (71,7±10,9) demonstraram alterações significativas quanto ao tempo de lambida da pata em relação ao controle e ao extrato ECAA (78,5±11,8). Na segunda fase do teste de nocicepção os animais administrados com EREV (24,0±16,0) e ESIM (49,7±32,2) evidenciaram a redução do tempo de lambida da pata se comparado ao controle (196,0±32,1). No teste da placa quente foi observado as doses de 100 mg/kg dos extratos ESIM (16,82±3,955) e EREV (17,15±4,288) sugeriram uma atividade antinociceptiva. Conclui-se que os resultados apresentam efeitos psicofarmacológico de droga depressora, com propícia atividade antinociceptiva dos extratos ECAA EREV e ESIM. Contudo, outros estudos se tornam necessários para uma melhor compreensão dos resultados de nocicepção.

PALAVRAS-CHAVE: psicofarmacológicas, farmacognosia, plantas medicinais, extratos metanólicos e antinocicepção.

ABSTRACT

The *Erythroxylaceae* Family comprises four genera with distribution in tropical regions, with Brazil being one of the main centers of diversity of species of this genus. In northeastern Brazil are found 71 species in which 13 are endemic to the state of Paraíba and some do not have in-depth knowledge of their pharmacological properties. On this, the research aims to observe the psychopharmacological activities of methanol extracts of the species *Erythroxylum caatingae* (ECAA), *E. revolutum* (EREV), *E. pauferrense* (EPAU), *E. simonis* (ESIM) and *E. pulchrum* (EPUL) using the induced seizures test by Pentylentetrazole (PTZ), the high cross maze test, formalin test and the hot plate test. These extracts were tested in Swiss albino mice (males and females), weighing between 20-40 g and between 2 and 3 months. Seizures tests induced by PTZ and the high cross maze did not present results with statistical significance level, indicating that the extracts do not have anticonvulsant and anxiolytic activities. In the first phase of nociception test the EREV extracts (64.0 ± 10.3) and ESIM (71.7 ± 10.9) showed significant changes on the paw licking time in the control and the ECAA extract (78.5 ± 11.8). In the second phase of nociception test animals administered with EREV (24.0 ± 16.0) and ESIM (49.7 ± 32.2) showed a reduction in the time to lick paw compared to the control (196.0 ± 32.1). In the hot plate test was observed at doses of 100 mg / kg of ESIM extracts (16.82 ± 3.955) and EREV (17.15 ± 4.288) suggested a antinociceptive activity. In conclusion, the results showed psychopharmacological effects of depressant drugs with favorable antinociceptive activity of ECAA, EREV and ESIM extracts. However, further studies are necessary to better understanding of the results of nociception.

KEYWORDS: psychopharmacological, pharmacognosy, medicinal plants, methanol extracts and antinociception

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição do gênero <i>Erythroxyllum</i>.....	23
Figura 2 – Principais constituintes do gênero <i>Erythroxyllum</i>.....	24
Figura 3 – Aparelho do labirinto de cruz elevado	30
Figura 4 – Aparelho de placa quente	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeitos dos Extratos ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL; (i.p.). sobre convulsões induzidas pelo Pentilenotetrazol (PTZ).....	38
Gráfico 2 – Efeitos dos Extratos ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL; (i.p.) sobre o tempo de permanência nos braços abertos no teste do Labirinto de Cruz Elevado	39
Gráfico 3 – Efeitos dos Extratos ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL; (i.p.) sobre o tempo de permanência nos braços fechados no teste do Labirinto de Cruz Elevado	40
Gráfico 4 – Efeitos dos Extratos ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL na 1ª fase do teste da formalina	42
Gráfico 5 – Efeitos dos Extratos ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL na 2ª fase do teste da formalina	43
Gráfico 6 – Efeito do extrato ESIM nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg no teste da placa quente, após 30 minutos da administração	45
Gráfico 7 – Efeito do extrato ESIM nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg no teste da placa quente, após 60 minutos da administração	46
Gráfico 8 – Efeito do extrato EREV nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg no teste da placa quente, após 30 minutos da administração	47
Gráfico 9 – Efeito do extrato EREV nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg no teste da placa quente, após 60 minutos da administração	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato ECAA, pela via intraperitoneal.....	34
Quadro 2 – Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato EREV, pela via intraperitoneal.....	34
Quadro 3 – Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato EPAU, pela via intraperitoneal	35
Quadro 4 – Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato ESIM, pela via intraperitoneal.....	36
Quadro 5 – Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato EPUL, pela via intraperitoneal	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo utilizado na Triagem Farmacológica.	28
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA - Análise de variância
- CBiotec - Centro de Biotecnologia
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- ECAA - Extrato metanólico de *Erythroxylum caatingae*
- EREV - Extrato metanólico de *Erythroxylum revolutum*
- EPAU - Extrato metanólico de *Erythroxylum paufferrense*
- ESIM - Extrato metanólico de *Erythroxylum simonis*
- EPUL - Extrato metanólico de *Erythroxylum pulchrum*
- e.p.m - Erro padrão da média
- FB - Fenobarbital
- GABA - Ácido gama-aminobutírico
- IMAO - Inibidor da monoaminaoxidase
- i.p. - Intraperitoneal
- PTZ - Pentilenotetrazol
- R.E.M. - Movimento rápido dos olhos
- s - Segundos
- SNC - Sistema Nervoso Central**
- Tween 80 - Poliexetileno Sorbitano Monoleato
- UFPB - Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2. 1 OBJETIVO GERAL	18
2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3. 1 PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL: PERSPECTIVAS.....	19
3. 2 ALGUMAS DROGAS QUE ATUAM NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) E SEUS EFEITOS.....	20
3. 3 O GÊNERO <i>ERYTHROXYLUM</i>	22
4 METODOLOGIA.....	24
4. 1 EXTRATOS	24
4.2 ANIMAIS.....	25
4. 3 DROGAS E REAGENTES.....	25
4. 4 SOLUBILIZAÇÃO DOS EXTRATOS	26
4. 5 TESTES DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	26
4. 5. 1 Triagem farmacológica comportamental	27
4. 6 AVALIAÇÃO ESPECÍFICA DA ATIVIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	29
4. 6. 1 Avaliação da atividade anticonvulsivante	29
4. 6. 1. 1 Teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ)	29
4. 6. 2 Avaliação da atividade ansiolítica e sedativa	29
4. 6. 2. 1 Teste do labirinto em cruz elevado.....	29
4. 6. 3 Avaliação da atividade antinociceptiva	30
4. 6. 3. 1 Testes da formalina	30
4. 6. 3. 2 Testes da placa quente.....	31
4. 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5. 1 EFEITOS DOS EXTRATOS	33
5. 2 EFEITOS DOS EXTRATOS ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL NO TESTE DE CONVULSÕES INDUZIDAS PELO PENTILENOTETRAZOL (PTZ)	37
5. 3 EFEITOS DOS EXTRATOS ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL NO TESTE DO LABIRINTO DE CRUZ ELEVADO	38
5. 4 EFEITOS DOS EXTRATOS ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL NO TESTE DA FORMALINA	40

5. 5 EFEITOS DOS EXTRATOS EREV E ESIM NO TESTE DA PLACA QUENTE	44
6 CONCLUSÃO.....	49
7 REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

O envolvimento na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas, bem como suas atividades psicofarmacológicas vem crescendo com o passar dos anos. Entre os fatores que motivam esse aumento estão a insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina convencional, os efeitos indesejáveis e os prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos (HEINZMANN, 2007).

No Brasil, o uso de plantas medicinais vem desde os povos indígenas, já que essas populações as conheciam e utilizavam largamente no combate a inúmeras doenças (NETO; CAETANO, 2005). As terras brasileiras possuem uma riquíssima biodiversidade, representando um dos maiores “mercados de medicamentos” do mundo e tem estabelecido uma boa estrutura em ciência e tecnologia para pesquisa em produtos naturais. Entretanto, apesar de tais circunstâncias, o país se mantém em extrema dependência da importação de fármacos e medicamentos (MARINHO, 2006).

Por outro lado, a população como um todo tem como costumes o preparo de chás a partir de plantas de uso popular que podem produzir efeitos adversos em animais e seres humanos (ALMEIDA, 1993). O preparo de chás com atividades fitoterápicas representa parte importante da cultura, sendo também parte de um saber utilizado e difundido pelos antepassados para a cura ou alívio de diversas enfermidades. Baseados nesses conhecimentos e em outros fatores há uma intensa pesquisa com plantas usadas na medicina popular ou plantas regionais com possíveis efeitos farmacológicos.

O desenvolvimento do setor de plantas medicinais e fitoterápicos pode se configurar como importante estratégia para o enfrentamento das desigualdades regionais existentes em nosso país. Segundo Rodrigues e Barbosa (2012) o mercado de medicamentos fitoterápicos movimenta até 500 milhões de dólares por ano, somente no Brasil. Ao acompanhar o mundo dos negócios farmacêuticos, já é visível a importância na busca de novos medicamentos a partir de produtos naturais extensamente conhecidos pela sabedoria empírica da população carente. Essas características despertam o interesse sobre a possibilidade da utilização de produtos naturais em estudos que vão além da identificação de potenciais agentes terapêuticos, e que estão relacionados à exploração e entendimento dos sistemas biológicos e aplicações na tecnologia farmacêutica (PULHEAULT, 2008).

A família *Erythroxylaceae* compreende quatro gêneros e cerca de 240 espécies com distribuição em toda região tropical, tendo seus principais centros de diversidade na Venezuela, Brasil e Madagascar (DALY, 2004). Diversas espécies têm sido investigadas

quanto a atividade farmacológica, tais como: *E. vacciniifolium*, que apresentou efeitos contra infecções oportunas em pacientes com HIV e forneceu alcalóides tropânicos da série catuabina (A, B e C) (ZANOLARI, 2003); *E. pervillei* que forneceu alcalóides pervilleinas A e B, que inibiram o crescimento de carcinoma de pele em células KB-VI e outros tipos de alcaloides extraídos da *E. rotundifolium* que também apresentou esta mesma atividade (CHAVEZ, 2002).

O gênero compreende 230 espécies localizadas principalmente na região Neotropical e tem como principais centros de endemismo o Brasil e a Venezuela (PLOWMAN, 1982; DALY, 2004). No Brasil, o gênero *Erythroxylum* representa cerca de 144 espécies, sendo que a maior diversidade se encontra no Domínio da Mata Atlântica (118 espécies), especialmente na Região Nordeste onde são registradas 71 espécies (LOIOLA; COSTA-LIMA, 2014). No estado da Paraíba são encontradas 13 espécies endêmicas (LOIOLA *et al.*, 2007).

No nordeste brasileiro já foram encontradas uma variedade de espécies, dentro ela: *E. caatingae* Plowman.; *E. citrifolium* A. St.-Hil, O. E. Schulz.; *E. revolutum* Mart.; *E. paufferense* Plowman.; *E. passerinum* Mart.; *E. pulchrum* A. St-Hil.; *E. pungens* O. E. Schulz.; *E. subrotundum* A. St.-Hil. e *E. squamatum* Sw., encontradas na mais diversas formações como nas florestas úmidas da mata atlântica, nos Brejos de altitude, nas matas Serranas, nas Restingas e em áreas mais secas da Caatinga (LOIOLA, 2007).

A *Erythroxylum caatingae* possui uma distribuição restrita aos estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (PLOWMAN; HENSOLD, 2004). Entre as espécies é a mais estudada e com maior número de artigos relacionados as áreas de botânica, química, bioquímica e farmácia. Uma pesquisa realizada no âmbito da ação psicofarmacológica do extrato metanólico de *E. caatingae* em camundongos apresentou efeitos sugestivos de droga depressora e bons resultados para atividade antinociceptiva e/ou inibição da liberação de mediadores inflamatórios ou citocinas (MAIA, 2009). Outras pesquisas comprovam que o extrato metanólico de *E. caatingae* possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos (AGUIAR *et al.*, 2012).

Baseando-se pelos bons efeitos apresentados pela *E. caatingae* tornou-se relevante investigar o efeito de outras espécies do mesmo gênero que possam apresentar atividades semelhantes ou melhores. Estudos químicos de isolamento de alcalóides tropânicos, diterpenos, flavonóides e triterpenos realizados com o extrato metanólico das folhas da *E. revolutum* tiveram êxito e resultaram no isolamento de seis diterpenos (OLIVEIRA *et al.*, 2010), que podem ter atividades no sistema nervoso central (SNC) como estimulante, depressora ou mesmo provocar pequenas convulsões em doses elevadas.

De forma geral, a recorrente procura por novos fármacos e drogas que tenham atividade no SNC e que não possuam efeitos colaterais indesejáveis encontrados nos medicamentos atuais, atrelado a descoberta das atividades psicofarmacológicas do gênero *Erythroxylum* e sabendo que o estado paraibano possui uma gama de espécies *Erythroxylum* não estudadas (*E. revolutum*, *E. simonis*, *E. paufferrense* e *E. pulchrum*), torna necessário a avaliação farmacológica destas.

Desta forma a proposta desta pesquisa foi a triagem farmacológica, bem como a observação das atividades psicofarmacológicas dos extratos metanólicos das espécies *E. caatingae* (ECAA), *E. revolutum* (EREV), *E. paufferrense* (EPAU), *E. simonis* (ESIM) e *E. pulchrum* (EPUL) em camundongos e identificar possíveis atividades ansiolíticas, anticonvulsivantes e/ou antinociceptivas dos extratos.

A integração da bioprospecção com a farmacologia se tornou uma estratégia de vital importância para a inovação biotecnológica. Assim, seguindo esse contexto o trabalho tem como objetivo o surgimento de uma possível opção terapêutica, particularmente de origem biológica, que possa ser efetiva em eliminar e/ou diminuir os principais sinais e sintomas da dor, da epilepsia, da ansiedade e de outras síndromes e doenças que atingem o sistema nervoso, diminuindo a problemática da farmacoresistência e dos diversos efeitos colaterais, adverso e tóxicos causados pelos fármacos atualmente disponíveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o conhecimento Psicofarmacológico da família *Erythroxylum*, e das seguintes espécies ECAA, EREV, EPAU, ESIM e EPUL usando metodologias comportamentais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar os efeitos gerais dos extratos sobre o SNC.
- Investigar e identificar uma possível atividade psicodpressora.
- Avaliar a capacidade antinociceptiva dos extratos.
- Investigar o efeito anticonvulsivante dos extratos.
- Avaliar o possível efeito ansiolítico dos extratos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL: PERSPECTIVAS

O uso de plantas com fins medicinais tem sido uma prática antiga que permanece até os dias de hoje, isto se deve a recorrente utilização da medicina moderna, que apesar dos grandes avanços continua a produzir agentes terapêuticos derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005). Muitas culturas antigas fizeram uso de “remédios” naturais preparados a partir de plantas para o tratamento de várias doenças e para a melhoria da qualidade de vida da população (CÓRDOVA, 2012).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais foi passada principalmente pela cultura indígena (SOUSA *et al.*, 2008), enfatizando que o país possui a maior diversidade do planeta e que muitas plantas já vêm sendo usadas e testadas pelo mundo inteiro. A utilização dessa prática terapêutica se deve ao fato da deficiência dos serviços de saúde pública, com isso a alternativa terapêutica das plantas acaba por ser comum em toda a extensão territorial. As formas mais comuns do uso de plantas medicinais são: chás, infusões, banhos, pomadas, entre outros; manipulados, muitas vezes por raizeiros, que associam determinadas plantas à cura de certas enfermidades, baseados no conhecimento empírico passado de geração a geração (SOUZA *et al.*, 2004).

O interesse pelos fitoterápicos surgiu principalmente devido as crenças populares que estes agentes são isentos ou possuem poucos efeitos colaterais, e que são eficazes onde a medicina tradicional não alcançou resultados, o que não é seguro (CARVALHO *et al.*, 2008). Assim, com a intensa busca por plantas que possuíssem atividade, as indústrias farmacêuticas começaram a investir mais em pesquisas de novos fármacos. Segundo Tanaka e Amorim (2014), o Ministério da Saúde se aliou a 31 laboratórios, sendo 10 públicos e 21 privados, nacionais e estrangeiros, para produção de fármacos que envolvem os tratamentos de doenças como: doenças sexualmente transmissíveis, doenças degenerativas, antipsicóticos, hemofilia e tuberculose, gerando assim uma economia estimada de R\$ 400 milhões por ano.

A pesquisa de produtos naturais normalmente é realizada buscando obter princípios ativos com estruturas desconhecidas que possam conduzir a novos medicamentos através de rotas de síntese ou semi-síntese (MARINHO, 2006). Os fármacos sintéticos são a grande

maioria no mercado, em torno de 50%, os produtos naturais representam cerca de 4%, os derivados de produtos naturais (semi-sintéticos) 22% e os derivados por síntese total 24%, mas considerando os produtos naturais como molde (protótipo) (YUNES; FILHO, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2012).

No Brasil, apenas 8% das espécies vegetais foram estudadas em busca de compostos bioativos, sendo que estas pesquisas foram realizadas por indústrias estrangeiras, demonstrando a fragilidade do país já que possui uma rica biodiversidade (GUERRA; NORDARI, 2003). Estima-se que 20% do patrimônio genético do planeta esteja concentrado em território nacional, onde o índice de endemismo é altíssimo (PINTO *et al.*, 2002). Tendo em vista as perspectivas, as plantas medicinais endêmicas ainda são pouco conhecidas e constitui uma diversidade de linhas de pesquisa acadêmica de desenvolvimento, além de um amplo mercado nacional e internacional.

3. 2 ALGUMAS DROGAS QUE ATUAM NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) E SEUS EFEITOS

Segundo Gorenstein e Scavone (1999), a história da psicofarmacologia moderna inicia-se no final da década de 40, quando foram introduzidos os primeiros fármacos com finalidade específica no tratamento dos transtornos psiquiátricos. Essas substâncias químicas que possuem efeitos no SNC, obtiveram grande impacto na década de 50 com o aparecimento de cinco grupos capazes de aliviar doenças psíquicas: antipsicóticos, antidepressivos tricíclicos, antidepressivos inibidores de monoaminaoxidase (IMAO), ansiolíticos e antimania (GORESTEIN; SCAVONE, 1999; ALMEIDA, 2006).

As classes mais estudadas dos psicotrópicos são: os neurolépticos, os antidepressivos, anticonvulsivantes, ansiolíticos, hipnóticos, relaxantes musculares e analgésicos (POLATIN; DERSH, 2004).

Os neurolépticos foram descobertos no ano de 1952, são conhecidos como tranquilizantes maiores ou também agentes antipsicóticos e marcaram o início da Psicofarmacologia contemporânea (SILVA, 2006). Os antipsicóticos demoram dias até semanas para produzirem seus efeitos terapêuticos máximos. A ação consiste no bloqueio de receptores dopaminérgicos D₂ no SNC, pois há evidências da relação direta entre a potência terapêutica e capacidade de bloquear receptores D₂ (SNYDER, 1986). As principais

indicações para essas drogas são as psicoses e sintomas associados ao transtorno afetivo (Bipolar) e transtornos severos de personalidade (MAIA, 2009). Os medicamentos mais conhecidos são: de “alta potência” (haloperidol, flufenazina, trifluoperazina, tiotixene); os de “baixa potência” ou sedativos (clorpromazina e tioridazina) e os chamados de atípicos ou de segunda geração (clozapina, risperidona e sulpirida) (SILVA, 2006).

Ação anticonvulsivante ou antiepiléptica de barbitúricos e, especificamente, Fenobarbital (FB) foi descoberto em 1912 por Hauptman, que observou que os pacientes epiléticos que eram tratados com FB como um hipnótico apresentam menos crises de convulsões, por essa razão, o uso terapêutico expandiu-se rapidamente e foi o principal fenitoína antiepiléptica a ser descoberta (HERNÁNDEZ; BRAVO; SOLÍS, 2005). Esses medicamentos podem ser divididos em três categorias: os clássicos (Fenitoína, Fenobarbital, Carbamazepina, Clonazepam e Nitrazepam); de segunda geração (Progabida, Gabapentina, Lamotrigina, Vigabatrina, Tiagabina e Leviracetam) e as de terceira geração (Remacemida, Fosfenitína e Dezinamida). A fenitoína exerce uma atividade antiepiléptica que causa depressão geral no SNC, sendo eficaz inclusive contra convulsões tônico-clônicas, já os fármacos benzodiazepínicos são eficazes no tratamento de crises epiléticas parciais e generalizadas (NÓBREGA, 2012). Vários medicamentos anticonvulsivantes possuem a capacidade de bloquear os canais de sódio ou potencialização da ação do ácido gama-aminobutírico (GABA) (ATTAL, 2000; DWORKIN *et al.*, 2003).

Os ansiolíticos ou hipnóticos são medicamentos usados no tratamento dos sintomas de ansiedade e também no tratamento da insônia. Esses fármacos podem ser usados para ambas as finalidades, mas possuem objetivos diferentes: os ansiolíticos têm o efeito de calmante e os hipnóticos servem para a manutenção do sono normal. O mecanismo de ação se baseia na atuação nos sistemas inibitórios de retransmissão do GABA, além de provável ação direta na indução do sono R.E.M. (Movimento rápido dos olhos) (COELHO *et al.*, 2006). Os principais medicamentos para esta finalidade são os benzo diazepínicos (ex: diazepam), barbitúricos (ex: fenobarbital) e outras drogas.

Opióides é um termo genérico utilizado para definir todas as substâncias, natural ou sintética, que possuam ação analgésica. Possuem como característica principal a diminuição ou até mesmo a erradicação da sensação de dor. Um dos exemplos de classe de analgésicos é a morfina, substância extraída das sementes das papoulas. Os receptores opióides estão localizados principalmente no SNC, mas também pode ser expresso no sistema nervoso

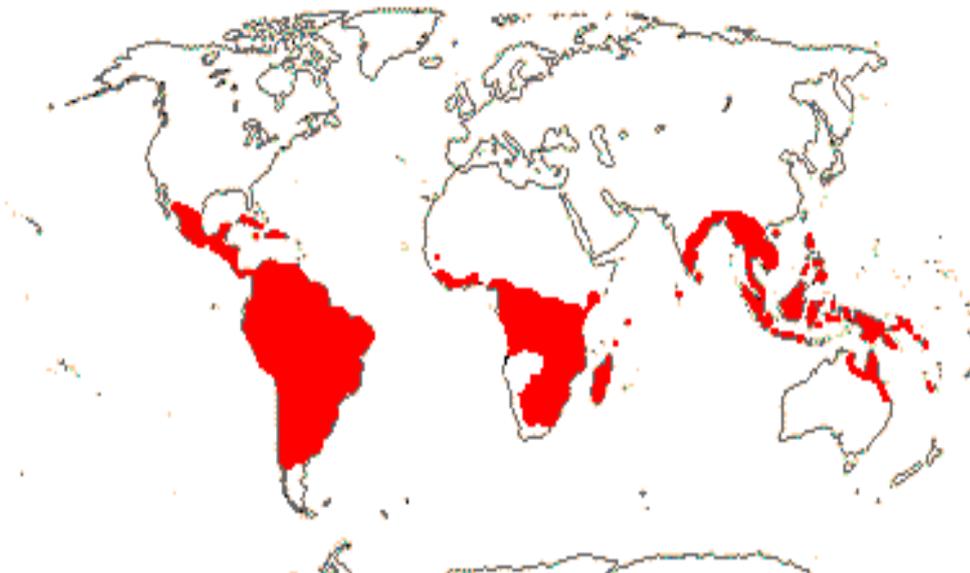
periférico. São universalmente utilizados no tratamento da dor em geral, são divididos em: opióides fracos (tramadol ou codeína) e opióides fortes (morfina, metadona, hidromorfona, oxicodona, etc) (RIBEIRO; SCHIMIDT; SCHMIDT, 2002).

Vários neurotransmissores e transmissores, como: a substância P, neurocinina A, galanina e aminoácidos excitatórios participam do fenômeno da neurofisiologia da dor (MILLAN, 1999). A neurofisiologia da dor foi amplamente estudada e, como se sabe, as vias que conduzem a dor têm numerosas interconexões com outras vias afetivas aferentes nociceptivas e fibras nervosas simpáticas (DE LUCA *et al.*, 1996). No entanto, o neurônio nociceptivo periférico utiliza dois neurotransmissores: o glutamato, que é o principal responsável pela ativação do neurônio pós-sináptico, e a substância P, que tem uma função moduladora e ajuda a sensibilidade do neurônio pós-sináptico à atividade de glutamato.

As drogas analgésicas podem ser divididas em três principais classes para a forma de atuação da droga no sistema nervoso: 1) aspirinas e outros analgésicos anti-inflamatórios não hormonais, os quais atuam nas terminações nervosas dos sítios de lesão e produzem analgesia por alterar o sistema das prostaglandinas; 2) analgésicos narcóticos (opióides), os quais atuam por se ligar a receptores opióides e ativar o sistema de supressão endógena da dor no SNC; e 3) analgésicos “auxiliares”, os quais atuam centralmente para produzir analgesia em certos tipos de dor (OLIVEIRA; GABBAI, 1998)

3.3 O GÊNERO *ERYTHROXYLUM*

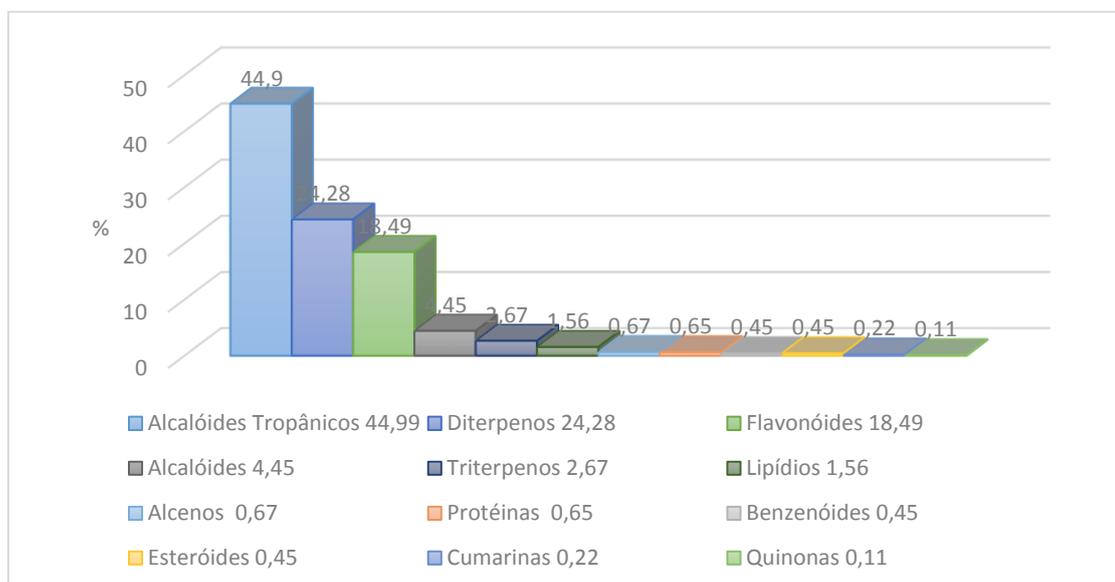
O gênero *Erythroxylum* pertence à família *Erythroxylaceae*, contudo é o maior dos quatro gêneros dessa família e compreende cerca de 230 espécies, distribuídas em todo os trópicos como demonstrado na **Figura 1**, mas com áreas de diversidade endêmica na América do Sul, mais precisamente, Brasil e Venezuela (ZANOLARI *et al.*, 2003; DALY, 2004; PLOWMAN; HENSOLD, 2004; LOIOLA, *et al.*, 2007). Possui espécies endêmicas no nordeste brasileiro mais precisamente nas florestas úmidas da mata atlântica, nos Brejos de altitude, nas matas Serranas, nas Restingas e na Caatinga.



Fonte: Oliveira, 2012, p. 32

O gênero ganhou notoriedade no século XIX, logo após a descoberta das atividades farmacológicas apresentadas pelas partes aéreas da *E. coca*, que já possuía grande empregabilidade pelos indígenas da América do Sul. A cocaína, famoso alcaloide natural e produzido a partir da *E. coca*, ficou muito difundida, graças as suas atividades psicoativas no SNC (LOIOLA *et al.*, 2007).

Levantamentos bibliográficos indicam que das 230 espécies existentes no gênero *Erythroxylum*, apenas 61 foram estudadas no âmbito da sua composição química, resultando no isolamento e caracterização de 449 compostos. A química do gênero é caracterizada principalmente pela presença de alcaloides tropânicos (GRIFFIN; LIN, 2000; ZUANAZZI *et al.*, 2001; CHIN *et al.*, 2006), diterpenos (ANSELL; PEGEL; TAYLOR, 1993; SANTOS *et al.*, 2005), flavonóides (CHAVES *et al.*, 1988; ZUANAZZI *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 2003) como é demonstrado na **Figura 2**. Também foram descritas a ocorrência de taninos (BONEFELD; FRIEDRICH; KOLODZIEJ, 1986) e triterpenos com esqueleto oleanano e lupano (CHÁVEZ *et al.*, 1996).

Figura 1: Principais constituintes do gênero *Erythroxylum*

Fonte: Oliveira, 2012, p 33

Atualmente essa família possui popularidade, já que é extensamente utilizada na medicina tradicional com diversas finalidade como: estimulante do SNC; supuração de furúnculos e abscessos; veneno; tratamento da dor abdominal; tratamento de tumores; antimicrobiano; atividade anti-herpes viral e atividade antinociceptiva (CHAVEZ, 2002; ZANOLARI, 2003; AGUIAR, 2011; AGUIAR *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2014).

4 METODOLOGIA

4.1 EXTRATOS

Os extratos das espécies ECAA, EREV, EPAU, ESIM e EPUL foram preparados e fornecidos pelo Laboratório de Fitoquímica Experimental do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, que tem como Coordenador o Prof. Dr. Josean Fechine Tavares. Esses extratos foram obtidos a partir do pó do caule seco, submetido à maceração exaustiva com metanol (MeOH) durante 72 horas. O processo foi repetido 4 vezes e a solução extraída e concentrada em rotavapor sob pressão reduzida a temperatura de 35°C o assim obtendo-se o extrato metanólico bruto.

4.2 ANIMAIS

Nos testes comportamentais foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss, albinos, adultos, saudáveis, machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas), pesando entre 20-40 g e entre 2 e 3 meses de idade. Esses animais foram obtidos do Biotério Prof. Dr. Thomas George, Centro de Biotecnologia (CBiotec) - da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os camundongos ficaram alojados em gaiolas de polipropileno devidamente higienizadas e mantidas sob condições laboratoriais padrão como: condições de temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com 12 horas de luz/escuro e sem uso de qualquer medicação, com acesso livre à comida e água potável em garrafas de polietileno, com bicos de inox.

Os experimentos comportamentais foram desenvolvidos no laboratório de Psicofarmacologia Professor Elizaldo A. Carlini e no Biotério Prof. Dr. Thomas George do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (CBiotec/UFPB).

Os animais foram alojados em outras gaiolas do mesmo material descrito, anteriormente a execução dos testes, por pelo menos 60 min de antecedência, tentando minimizar as possíveis alterações comportamentais dos animais e permitir a adaptação do mesmo ao novo ambiente. Os animais utilizados foram, após o experimento, eutanasiados por deslocamento cervical.

Os animais foram separados em grupos de 06 animais e nos procedimentos realizados foi dada preferência a testes que não provocavam sofrimento, do mesmo modo, estes procedimentos foram analisados previamente pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia (CEUA_CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba, sob o protocolo N° 0505/13.

4.3 DROGAS E REAGENTES

Todas as substâncias que foram utilizadas apresentaram grau de pureza analítica reconhecida: Água destilada (CBiotec/UFPB, Brasil); Diazepam (Sigma, EUA); Formalina 2,5 % (CBiotec/UFPB, Brasil); Pentilenotetrazol (PTZ) (Sigma, EUA); Tween 80 (Merck, EUA); Morfina (Sigma, EUA); Extrato metanólico de *Erythroxylum caatingae* (ECAA) (CBiotec/UFPB, Brasil); Extrato metanólico de *Erythroxylum revolutum* (EREV) (CBiotec/UFPB, Brasil); Extrato metanólico de *Erythroxylum paufferrense* (EPAU)

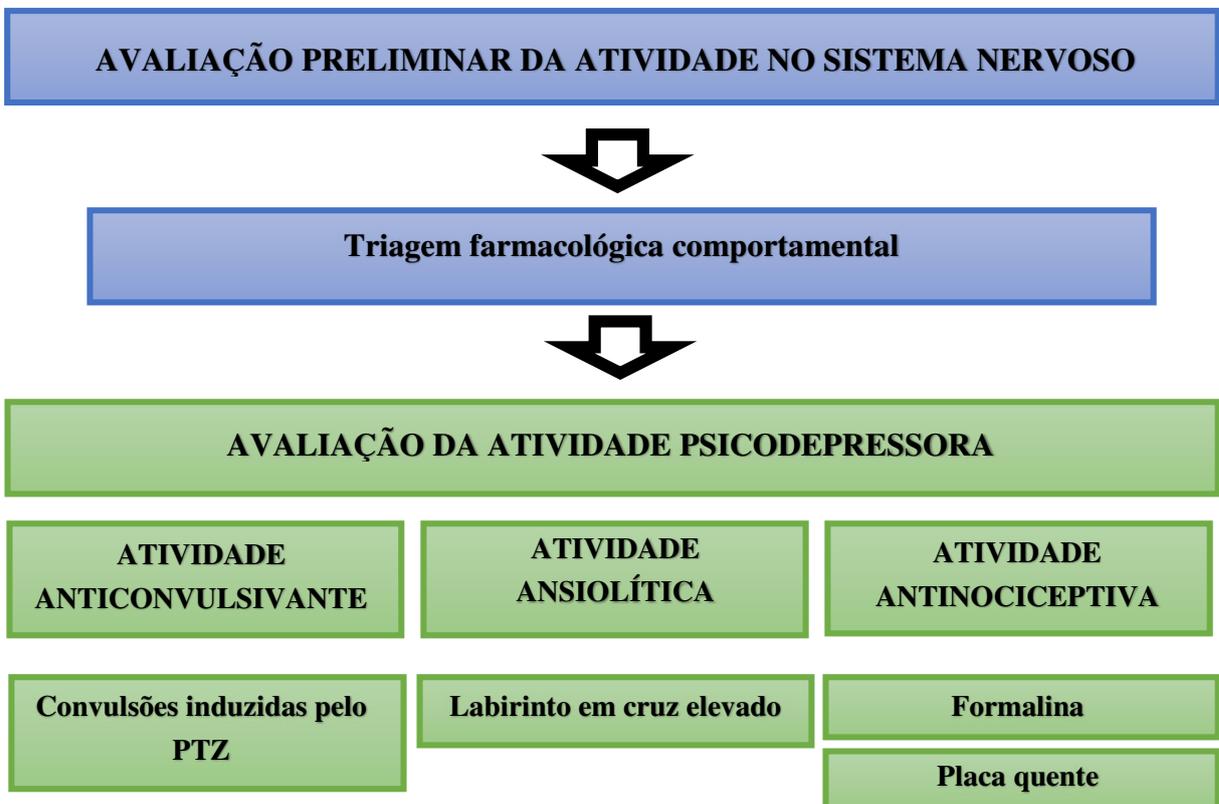
(CBiotec/UFPB, Brasil); Extrato metanólico de *Erythroxylum simonis* (ESIM) (CBiotec/UFPB, Brasil); Extrato metanólico de *Erythroxylum pulchrum* (EPUL) (CBiotec/UFPB, Brasil).

4. 4 SOLUBILIZAÇÃO DOS EXTRATOS

A escolha da forma de solubilização dos extratos foi determinada a partir de pesquisas na literatura e por meio de experimentos prévios, e assim ficou estabelecido o veículo e agente solubilizante, respectivamente, água destilada e duas gotas Tween 80 obedecendo a proporção de 0,05 mL do agente solubilizante (Tween 80) para cada mL do veículo (solução de Tween 80 a 5%).

4. 5 TESTES DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O delineamento experimental para a avaliação psicofarmacológica dos extratos ECAA, EREV, EPAU, ESIM e EPUL está representado pelo seguinte fluxograma:



4. 5. 1 Triagem farmacológica comportamental

A triagem farmacológica ou *screening* farmacológico trata-se de um teste preliminar de fácil execução e capaz de determinar de forma qualitativa algumas importantes ações centrais dos extratos em estudo (MAIA, 2009). De forma geral, o teste demonstra por meio de alterações comportamentais do animal um possível efeito da droga ou medicamento, possibilitando assim um direcionamento do estudo farmacológico. Segundo Almeida (2006), este é o primeiro passo para se pesquisar a ação de determinado fármaco e indicar alguma possível atividade farmacológica, bem como a dose a ser utilizada nos ensaios mais específicos.

Os camundongos foram divididos em grupos (n=6) e tratados (via i.p) com doses de 200 mg/Kg (grupos experimentais). Tais doses foram determinadas a partir de dados da literatura (MAIA, 2009). O grupo controle recebeu solução de Tween 80 a 5% (veículo), via i.p.

Após a administração, os animais foram colocados em gaiolas de polipropileno (em dupla) e observados a cada trinta minutos, durante quatro horas, seguindo-se um protocolo experimental padrão de avaliação comportamental (ALMEIDA, 2006) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Protocolo utilizado na Triagem Farmacológica.

ATIVIDADE FARMACOLOGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeitos, (-) efeito diminuído, (+) efeito aumentado, (++) efeito intenso				
	Até 30	1h	2h	3h	4h
1-SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outros					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose palpebral					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípiã					
2 – SN AUTÔMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

4. 6 AVALIAÇÃO ESPECÍFICA DA ATIVIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

4. 6. 1 Avaliação da atividade anticonvulsivante

4. 6. 1. 1 Teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ)

O pentilenotetrazol (PTZ) é uma substância muito utilizada nos modelos anticonvulsivantes. O motivo do seu uso intenso nas práticas laboratoriais é a facilidade do teste e a potência, ou seja, a capacidade de produzir convulsões e assim permitir a identificação eficaz de novos fármacos anticonvulsivantes.

O PTZ é um inibidor dos canais de cloreto associando a receptores GABA_A (LOSCHER; SCHMIDT, 2002). Assim, espera-se que as moléculas/extratos que suprimem ou diminuem os efeitos do PTZ, possuam uma atividade depressora do SNC, o que é característico de uma droga pertencente à classe dos anticonvulsivantes (ANCA *et al.*, 1993).

No experimento foram utilizados grupos de camundongos (n=6), divididos em grupos experimentais (ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL), grupo controle (veículo) e grupo padrão (diazepam, dose de 4 mg/Kg), todos administrados por via intraperitoneal. Após 30 minutos dos pré-tratamentos houve a administração em todos os animais de uma solução de PTZ na dose de 60 mg/Kg (i.p.). Os parâmetros analisados foram: latência da convulsão (tempo entre a administração do PTZ até a primeira convulsão clônica ou tônico-clônica), em segundos; outro parâmetro analisado foi o número de convulsões e o tipo (clônica ou tônico-clônica). O tempo de observação dos animais após a administração do PTZ foi de 15 minutos.

4. 6. 2 Avaliação da atividade ansiolítica e sedativa

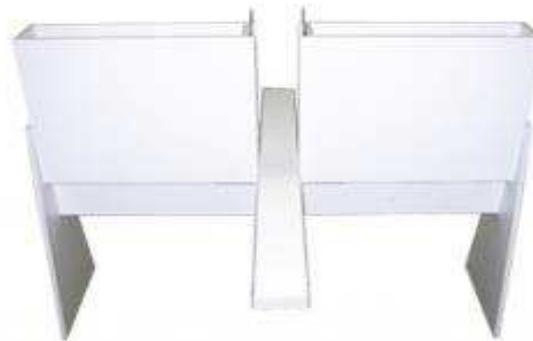
4. 6. 2. 1 Teste do labirinto em cruz elevado

Este teste é um dos principais modelos usados para o estudo da ansiedade, segundo Becerra (2004) consistindo em um modelo naturalista, já que mimetiza uma situação encontrada no ambiente natural dos animais. Primeiramente criado para ratos (PELLOW *et al.*, 1985) e mais tarde adaptado para camundongos (LISTER, 1987), baseia-se no ato de verificação de roedores que evitam locais abertos. O estímulo provocado pela novidade do confinamento, produz reações de conflito entre o medo e curiosidade causando efeitos como: congelamento, defecação, micção e o aumento do nível plasmático do hormônio de estresse, o cortisol (GRAEFF; GUIMARÃES, 2001).

O aparelho labirinto de cruz elevado (**Figura 3**), fabricado em acrílico, possui dois braços com paredes laterais e sem cobertura (braços fechados), que medem 30 cm de comprimento por 5cm de largura e 15 cm de altura, e dois braços desprovidos de paredes laterais (braços abertos) que medem 30 cm de comprimento por 5 cm de largura e 0,25 cm de altura. Os braços abertos e fechados cruzam-se numa plataforma central, onde os animais são colocados para explorar o labirinto.

O teste permite a avaliação do animal em um novo ambiente (labirinto de cruz elevado), onde o observador avalia o número de entradas e/ou o tempo de permanência nos braços abertos em relação aos braços fechados.

Figura 3: Aparelho do labirinto de cruz elevado.



Fonte: <http://www.scienlabor.com.br/geral/produtos/labirinto-cruz-elevado>

Foram submetidos camundongos em grupos (n=6, machos e fêmeas), divididos em grupos experimentais (ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL) na dose 200 mg/Kg, (i.p.), grupo controle (veículo) e grupo padrão (Diazepam, dose 2 mg/kg, via i.p). Os animais foram colocados no aparato individualmente, durante o período de 5 min. O aparelho foi tratado com álcool 10% entre cada animal testado, como forma de assepsia.

4. 6. 3 Avaliação da atividade antinociceptiva

4. 6. 3. 1 Testes da formalina

O teste da formalina é um modelo válido e confiável de nocicepção e é sensível para vários compostos com atividade de analgesia (HUNSKAAR; HOLE, 1987). O método

consiste na administração de uma solução de formalina na região subplantar (parte de baixo da pata) do camundongo que leva a estimulação dos nociceptores (SOUZA *et al.*, 2000), no qual resulta em um movimento de lambida persistente na pata do animal considerado indicativo de resposta nociceptora. Essa resposta é dividida em duas fases, onde será quantificado o tempo de lambida da pata. A primeira fase ocorre após cerca de 5 minutos da injeção da formalina (fase resultante da estimulação direta dos nociceptores), em seguida há uma fase intermediária de 10 minutos caracterizada pelo tempo de inibição da dor. A segunda fase é conhecida como fase de resposta inflamatória e ocorre dos 15 aos 30 minutos.

Foram utilizados camundongos em grupos (n=6, de ambos os sexos) que receberam por via i.p., os seguintes pré-tratamentos: veículo (grupo controle), os grupos experimentais (ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL) receberam a dose de 200 mg/Kg, (i.p.) e o grupo padrão que recebeu morfina 6 mg/Kg, (i.p.) (grupo padrão). Após 30 minutos os animais receberam a injeção subplantar (pata posterior direita) de 20 µL de solução de formalina 2,5%, em seguida os animais foram colocados nas caixas de observação, onde foi registrado o tempo total de lambida da pata (que recebeu a injeção) durante 5 minutos (1° fase). Com o término do período de 10 minutos (fase intermediária), contabilizou-se o tempo de 15 minutos (2° fase).

4. 6. 3. 2 Testes da placa quente

O teste da placa quente foi originalmente realizado por Woolfe e Macdonald (1944), que estavam testando a inibição da resposta motora de camundongos colocados em contato com uma superfície quente mantida a temperatura constante entre 55 e 70 ° C. O método avalia e quantifica o tempo em que os animais permanecem sobre a placa aquecida (**Figura 4**) (55 ± 1 ° C) até reagirem ao estímulo térmico com o comportamento de levantar (tentativa de pular) ou lambe as patas (TITA *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2008). Lembrando que a latência (tempo de permanência até o primeiro estímulo) é quantificada em um período máximo de 30 segundos; para evitar lesão tecidual nos animais (ALMEIDA, 2006).

Figura 4: Aparelho de placa quente.



Fonte: http://www.bonther.com.br/fotos/img_produtos_ampliada/51_353_1265315518.jpg

Forma utilizados nesse teste camundongos (*Mus musculus*) Swiss, abinos, adultos, saudáveis e exclusivamente fêmeas (nulíparas e não grávidas).

Os animais foram divididos em grupos (n=6), onde o grupo controle recebeu veículo via i.p., os grupos experimentais receberam os seguintes tratamentos: Experimental 1 (Extrato de *E. simonis* 100mg/Kg); Experimental 2 (Extrato de *E. simonis* 50mg/Kg); Experimental 3 (Extrato de *E. revolutum* 100mg/Kg); Experimental 4 (Extrato de *E. revolutum* 50mg/Kg) e um grupo padrão (Morfina 10 mg/Kg).

Foram feitas leituras do comportamento nociceptivo após 30 e 60 minutos da administração dos extratos. Foi registrado o tempo de pulso para expressar a atividade protetora dos extratos.

4. 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizado o programa Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA). Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente por meio do teste de análise de variância (ANOVA) com classificação *one-way*, seguida do Teste de Dunnet.

Os valores obtidos foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.), sendo os resultados considerados significativos quando apresentaram um valor de $p < 0,05(*)$, $p < 0,01(**)$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITOS DOS EXTRATOS

Os efeitos apresentados no comportamento dos animais nos quais foram administradas as doses dos extratos estão descritos no **Quadro 1** (ECAA), **Quadro 2** (EREV), **Quadro 3** (EPAU), **Quadro 4** (ESIM) e **Quadro 5** (EPUL), respectivamente. As variações comportamentais sempre comparadas a um grupo que recebeu veículo (controle).

A triagem farmacológica foi utilizada para visualizar as principais alterações comportamentais nos camundongos, após os tratamentos com os extratos. Esse método é capaz de determinar qualitativamente as ações centras dos extratos no sistema nervoso/autônomo (ALMEIDA *et al.*, 1999). A dose escolhida foi de 200 mg/kg, pois foi observado em outra pesquisa (MAIA, 2009), depois de uma avaliação de toxicidade do extrato metanólico da *Erythroxylum caatingae*, que esta dose é segura.

No grupo de animais que recebeu a dose de 200 mg/kg de ECAA, foi observado (**Quadro 1**) já nos primeiros 30 min a presença dos efeitos de ptose palpebral, sedação, analgesia e a diminuição da resposta ao toque, ambulação, defecação e força para agarrar. Aos 60 min, puderam-se observar efeitos como ptose palpebral, sedação, analgesia e diminuição da resposta ao toque. Após 120 min, apenas os efeitos de ptose palpebral, analgesia e diminuição da resposta ao toque foram observados. Os efeitos de analgesia e diminuição da resposta ao toque ainda foram observados após 240 min. Os efeitos de ptose palpebral, sedação, analgesia, resposta ao toque diminuída são efeitos relacionados ao sistema nervoso central depressor, o que demonstra que esse extrato possui efeitos depressores SNC. De acordo com Mariz et al (2006), ptose palpebral é o fechamento das pálpebras, o qual pode ser medido em graus, sendo este efeito induzidos pela ação dos neurolépticos ou analgésicos de ação central.

Quadro 1: Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato ECAA, pela via intraperitoneal.

	Tempo de observação em minutos	Efeitos comportamentais
ECAA 200 (mg/kg)	Até 30	Ptose palpebral, Sedação, Analgesia, Resposta ao toque diminuído, Ambulação diminuída, Defecação diminuída, Força para agarrar diminuída
	Após 60	Ptose palpebral, Sedação, Analgesia, Resposta ao toque diminuído
	Após 120	Ptose palpebral, Analgesia, Resposta ao toque diminuído
	Após 240	Analgesia, Resposta ao toque diminuído

O grupo de animais que foram administrados com a dose de 200 mg/kg de EREV, foi observado (**Quadro 2**) primeiros 30 min efeitos como: Ptose palpebral, micção, contorções abdominais e a diminuição da ambulação, defecação e a resposta ao toque. Após 60 min, observou-se ptose palpebral, sedação, analgesia e a diminuição da ambulação e a resposta ao toque. Os mesmos efeitos foram observados após 120 minutos. A diminuição da ambulação e a resposta ao toque permaneceram após 240 minutos. Os efeitos de ptose palpebral, resposta ao toque diminuído, sedação e analgesia demonstram um possível efeito depressor no SNC.

Quadro 2: Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato EREV, pela via intraperitoneal.

	Tempo de observação em minutos	Efeitos comportamentais
EREV 200 (mg/kg)	Até 30	Ptose palpebral, Resposta ao toque diminuído, Ambulação diminuída, Contorções abdominais, Defecação diminuída, Micção
	Após 60	Ptose palpebral, Sedação, Analgesia, Resposta ao toque diminuído, Ambulação diminuída
	Após 120	Ptose palpebral, Sedação, Analgesia, Resposta ao toque diminuído, Ambulação diminuída
	Após 240	Resposta ao toque diminuído, Ambulação diminuída

No grupo que recebeu a injeção de 200 mg/kg de EPAU, após 30 min foram observados (**Quadro 3**) efeitos como: ato de levantar, escalar e contorções abdominais. Aos 60, 120 e 240 minutos não foram observados efeitos comportamentais relevantes decorrentes do tratamento. Os efeitos como ato de levanta, escalar e contorções abdominais estão relacionados a um provável efeito no SNC.

Quadro 3: Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato EPAU, pela via intraperitoneal.

EPAU	Tempo de observação em minutos	Efeitos comportamentais
200 (mg/kg)	Até 30	Levantar, Escalar, Contorções abdominais
	Após 60	-
	Após 120	-
	Após 240	-

Os animais que receberam a dose de 200 mg/kg de ESIM foi observado (**Quadro 4**) os seguintes efeitos no período até 30 min: Ptose palpebral, micção e diminuição dos efeitos de sedação, ambulação e defecação. Aos 60 min, observou-se ptose palpebral, sedação e diminuição da ambulação. Já aos 120 min foi verificado apenas o efeito de ptose palpebral. No tempo após 240 min, os efeitos como: ptose palpebral, sedação e diminuição da ambulação, resposta ao toque, tono muscular e força para agarrar, foram observados. Os efeitos como: ptose palpebral, reposta ao toque diminuído e sedação apontam um possível efeito depressor no SNC.

Quadro 4: Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato ESIM, pela via intraperitoneal.

	Tempo de Observação em minutos	Efeitos comportamentais
ESIM 200 (mg/kg)	Até 30	Ptose palpebral, Sedação diminuída, Ambulação diminuída, Defecação diminuída, Micção
	Após 60	Ptose palpebral, Sedação, ambulação diminuída
	Após 120	Ptose palpebral
	Após 240	Ptose palpebral, Sedação, Resposta ao toque diminuído, Ambulação diminuída, Tono muscular diminuído, Força para agarrar diminuída

No grupo de animais que foi administrado com 200 mg/kg de EPUL foi observado (**Quadro 5**) o efeito de cauda de straub aos 30, 60 e 120 minutos. A diminuição da resposta ao toque ocorreu aos 120 minutos. Após 240 minutos os efeitos de diminuição de limpeza e resposta ao toque foram notados. Conforme Malone (1977), cauda em straub é caracterizado pela visualização da cauda ereta e curvada, com extremidade quase atingindo a cabeça, onde pode-se observar a ocorrência de fortes espasmos na musculatura da base da cauda, que se trata do efeito causado por algumas drogas semelhantes à setonina, além dos opióides.

Quadro 5: Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato EPUL, pela via intraperitoneal.

	Tempo de observação em minutos	Efeitos comportamentais
EPUL 200 (mg/kg)	Até 30	Cauda de straub presente
	Após 60	Cauda de straub presente
	Após 120	Cauda de straub presente, Resposta ao toque diminuído
	Após 240	Resposta ao toque diminuído, limpeza diminuída

Os testes para avaliar ação psicofarmacológica foram realizados em seguida: Teste das convulsões induzidas por Pentilenotetrazol (PTZ), Teste do labirinto de cruz elevado, Teste da formalina e Teste da placa quente. Estes testes são considerados como testes específicos para

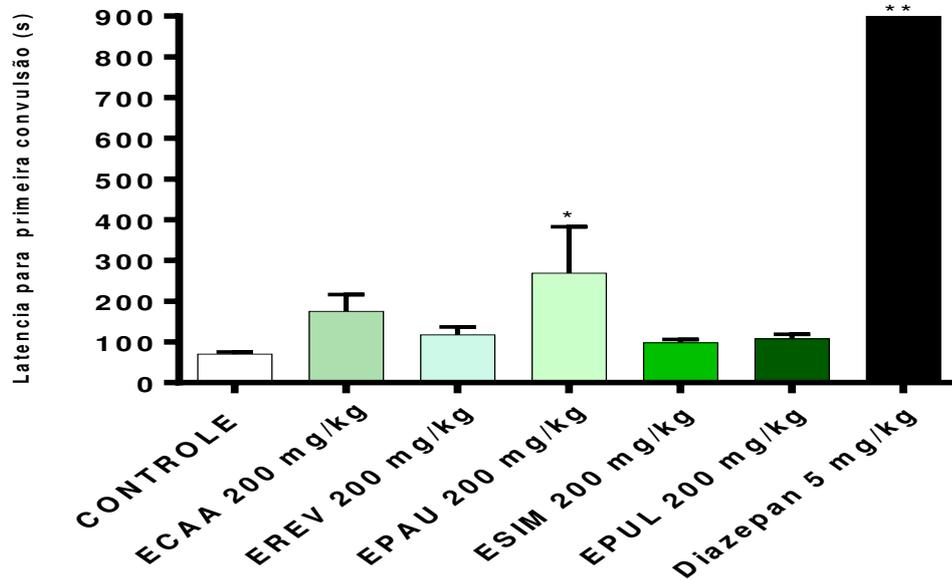
determinar atividade anticonvulsivante, ansiolítica e antinociceptiva dos extratos ECAA, EREV, ESIM, EPAU e EPUL.

5. 2 EFEITOS DOS EXTRATOS ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL NO TESTE DE CONVULSÕES INDUZIDAS PELO PENTILENOTETRAZOL (PTZ)

Iniciou-se com o Teste de convulsões induzidas por Pentilenotetrazol (PTZ), pois constitui um modelo considerado adequado para pesquisas e é considerado um modelo de triagem pré-clínica para drogas anticonvulsivantes, podendo ser utilizada como modelo de crises tônico-clônicas (QUINATANS; MELLO, 2006; SMITH et al, 2007). Essa substancia atua como inibidor de canais de cloreto associados aos receptores GABA_A (LÖSCHER *et al*, 1998).

A respeito à ocorrência de ataques convulsivos durante os testes com PTZ, os grupos experimentais e o grupo controle apresentaram convulsões dos tipos clônica e tônico/clônica, sendo grande maioria convulsões tônico-clônicas seguidas de morte como é demonstrado no **Gráfico 1**. Em comparação ao grupo controle (70,0±5,3) apenas o EPAU (269,2±113,5) promoveu um significativo aumento da latência. Já o grupo tratado com a droga padrão Diazepam (900,0±0,0) na dose 4 mg/Kg (i.p.) demonstrou resultados significativos quando comparado ao grupo controle (**p<0,01)

Gráfico 1: Efeito dos extratos ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL sobre convulsões induzidas pelo Pentilenotetrazal (PTZ). Os valores estão expressos em medias \pm e.p.m Teste de Dunnet. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando com o veículo (controle)



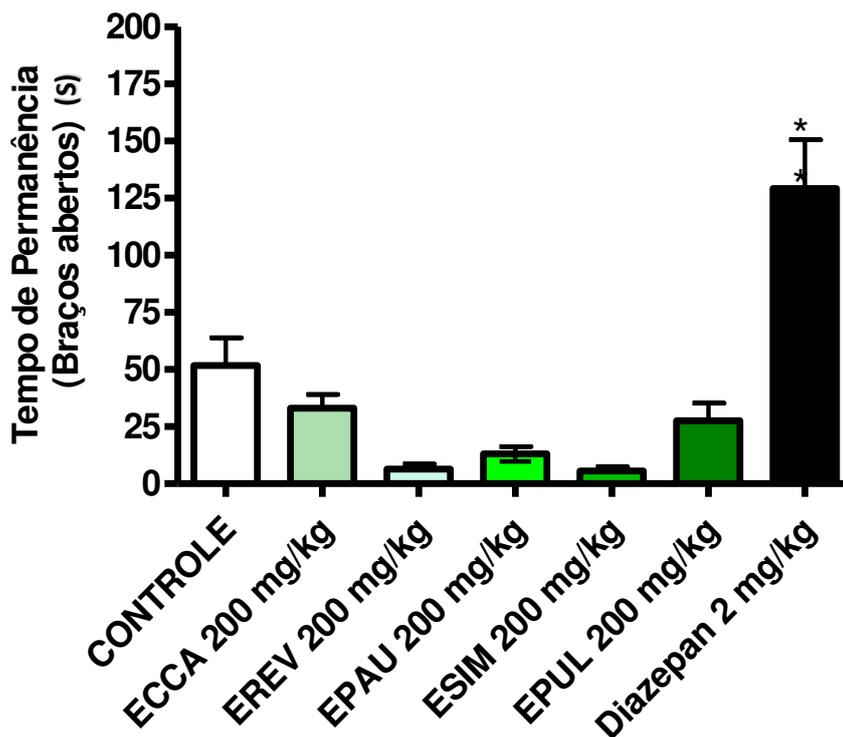
Os extratos não foram capazes de inibir as convulsões mioclônicas e tônico/clônicas no teste das quimioconvulsões induzidas pelo PTZ como pode ser visto nos resultados, sendo que apenas o extrato EPAU conseguiu promover um pequeno aumento na latência em relação ao grupo controle.

5. 3 EFEITOS DOS EXTRATOS ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL NO TESTE DO LABIRINTO DE CRUZ ELEVADO

O segundo teste a ser realizado foi o labirinto de cruz elevado, que se baseia na condução do animal e seus conflitos entre o medo (espaço aberto e a novidade) e a exploração (toda a região do labirinto de cruz elevado). A quantidade de entradas nos braços abertos tem sido usada como índice de ansiedade (MARTINS *et al.*, 2004). Normalmente, os camundongos têm a preferência pelos braços fechado, evitando os braços abertos, ou seja, espera-se um tempo maior nos braços fechados (RODGERS *et al.*, 1997).

Os resultados apresentados no **Gráfico 2** demonstram que os animais tratados com os extratos ECAA ($33,0 \pm 6,1$ s), EREV ($6,3 \pm 2,3$ s), EPAU ($13,0 \pm 3,3$ s), ESIM ($5,7 \pm 1,8$ s) e EPUL ($27,7 \pm 7,7$ s) na dose de 200 mg/kg (via i.p.) não obtiveram aumento significativo no tempo de permanência nos braços abertos em relação ao grupo controle ($51,7 \pm 12,2$ s). Contudo, o grupo tratado com a droga padrão (129,3 \pm 21,3 s) tratado com Diazepam na dose 2 mg/Kg (i.p.) demonstrou resultados significativos quando comparado ao grupo controle (* $p < 0,05$).

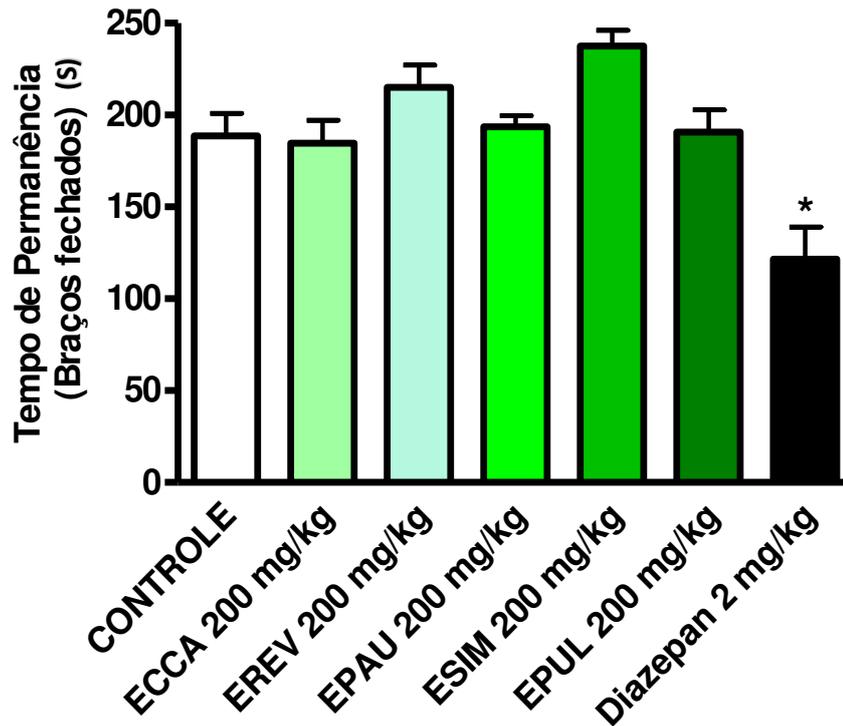
Gráfico 2: Efeito dos extratos ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL sobre o tempo de permanência nos braços abertos no teste do Labirinto de Cruz Elevado. Os valores estão expressos em médias \pm e.p.m Teste de Dunnet. * $p < 0,05$ e comparando com o veículo (controle).



Conforme ilustrado no **Gráfico 3**, os animais tratados com os extratos ECAA ($184,7,0 \pm 12,3$ s), EREV ($215,0 \pm 12,2$ s), EPAU ($193,7 \pm 6,1$ s), ESIM ($237,7 \pm 8,5$ s) e EPUL ($190,7 \pm 12,2,7$ s) na dose de 200 mg/kg (via i.p.) não apresentaram aumento significativo no tempo de permanência nos braços fechados quando comparado com o grupo controle ($188,7 \pm 12,3$ s). Todavia, o grupo tratado com a droga padrão ($121,5 \pm 17,6$ s) tratado com

Diazepam na dose 2 mg/Kg (i.p.) demonstrou resultados significativos quando comparado ao grupo controle (* $p < 0,05$).

Gráfico 3: Efeito dos extratos ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL sobre o tempo de permanência nos braços fechados no teste do Labirinto de Cruz Elevado. Os valores estão expressos em médias \pm e.p.m Teste de Dunnet. * $p < 0,05$ e comparando com o veículo (controle).



Não foi observado nenhuma modificação comportamental que sugerisse uma possível atividade ansiolítica, já que todos os extratos não produziram um aumento significativo no tempo de permanência nos braços abertos.

5. 4 EFEITOS DOS EXTRATOS ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL NO TESTE DA FORMALINA

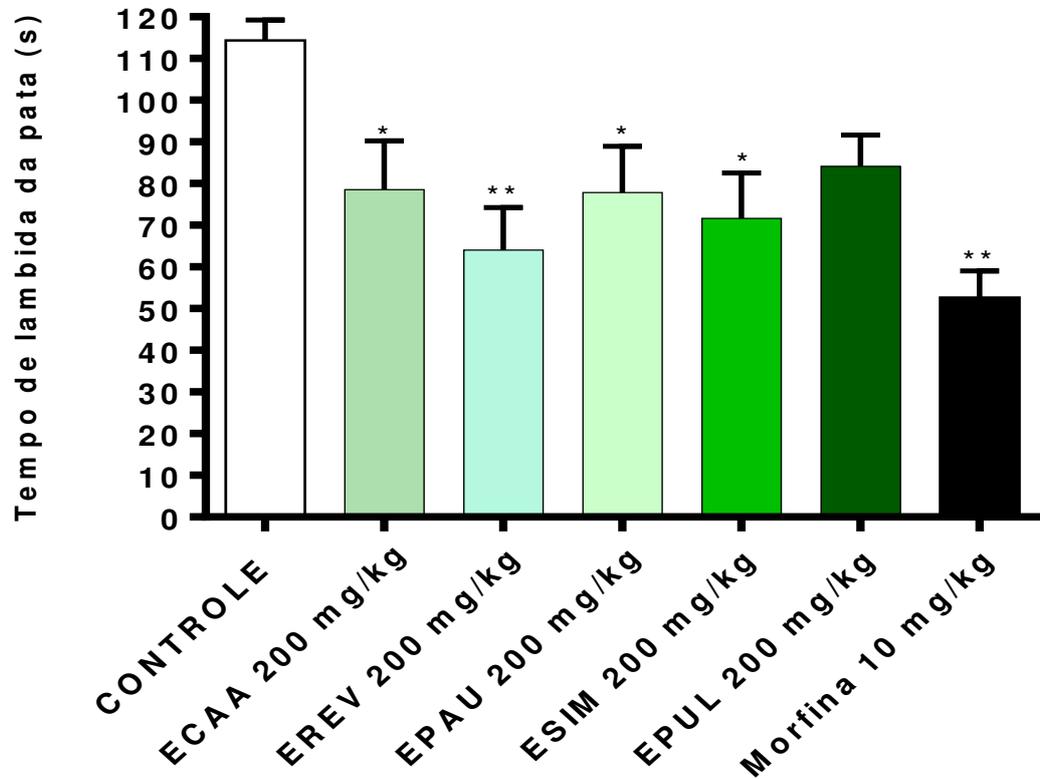
Em seguida foi realizando o teste da formalina que avalia a atividade antinociceptiva/anti-inflamatória, que consiste em um modelo válido e seguro de nociceção e sensível a diversas classes de substâncias com princípios analgésicos. Para que o modelo seja válido ele precisa apresentar algumas características: ser específico (o estímulo nociceptivo

deve elicitar uma resposta que possa ser diferenciada em nociceptiva e não-nociceptiva), sensível, realizável e reproduzível (CELEDONIO, 2008).

A formalina age como um estímulo e induz uma dor moderada e de longa duração que possui uma conexão com a lesão no tecido da pata. O teste se divide em duas fases: a primeira fase ocorre devido a ação direta sobre as terminações nociceptoras periféricas (principalmente pela ativação das fibras C) (HEAPY *et al.*, 1987). Já a segunda fase está relacionada a mediadores inflamatórios locais, como: prostaglandinas, serotonina, histamina, bradicinina (FONSECA *et al.*, 2007).

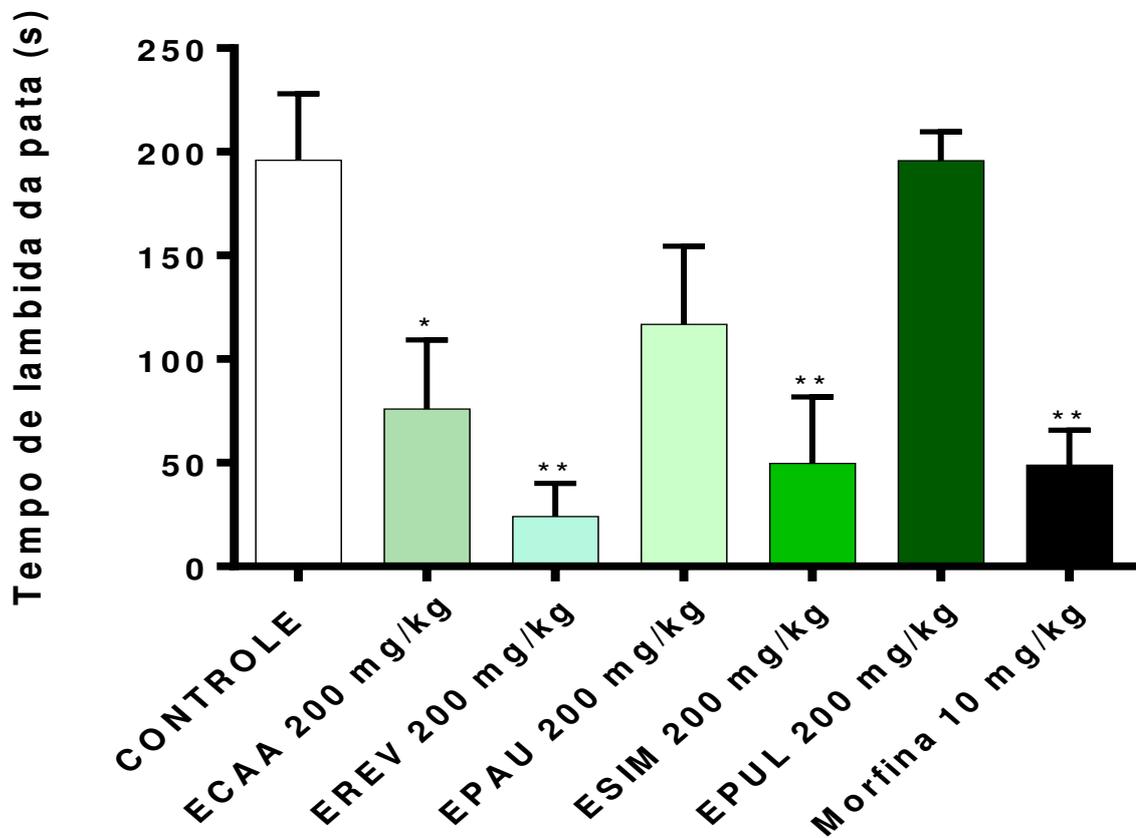
Conforme é demonstrado no **Gráfico 4**, durante a 1ª fase deste teste, durante os cinco minutos após a injeção subplantar na pata posterior direita da solução de formalina a 2,5%, os camundongos tratados previamente com os extratos ECAA ($78,5 \pm 11,8$ s); EREV ($64,0 \pm 10,3$ s); EPAU ($77,8 \pm 11,1$ s); ESIM ($71,7 \pm 10,9$ s), todos na dose de 200 mg/Kg, via i.p. demonstraram alterações significativas quanto ao tempo de lambida da pata em relação ao controle. Podemos perceber que o extrato EREV demonstrou maior nível de significância estatística na redução do tempo de lambida da pata, se comparado ao controle ($114,3 \pm 4,9$ s) e ao grupo tratado com ECAA, que já evidenciou resultados semelhantes para esta atividade em trabalhos relatados na literatura (MAIA, 2009).

Gráfico 4: Efeitos dos Extratos ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL na 1ª fase do teste da formalina. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando com o veículo (controle).



Como é representado no **Gráfico 5**, a respeito da 2ª fase do teste da formalina os animais administrados com ECAA ($75,8 \pm 33,5$ s), EREV ($24,0,0 \pm 16,0$ s) e ESIM ($49,7,7 \pm 32,2$ s) demonstraram uma diminuição no tempo de lambida da pata se comparado ao controle ($196,0 \pm 32,1$ s). Os extratos EREV ($24,0,0 \pm 16,0$ s) e ESIM ($49,7,7 \pm 32,2$ s) mostraram-se especialmente eficazes nesse teste, pois o tempo de lambida na 2ª fase do teste apresentou mesmo nível de significância do grupo padrão (controle positivo) tratado com Morfina, na dose de 10 mg/Kg (i.p.) ($48,8 \pm 16,9$ s).

Gráfico 5: Efeito dos extratos ECAA; EREV; EPAU; ESIM; EPUL na 2ª fase do teste da formalina. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m Teste de Dunnet. *p <0,05 e **p<0,01 comparando com veículo (controle).



Com os dados apresentados (Gráfico 4 e 5) observou-se que os extratos ECAA, EREV, EPAU, ESIM, EPUL na 1ª fase produziram uma redução da resposta nociceptiva se comparado ao controle, no entanto apenas os extratos EREV e ESIM obtiveram uma redução abaixo do ECAA (extrato já pesquisado e com potencial antinociceptivo). Na 2ª fase do teste, os extratos ECAA, EREV, EPAU e ESIM obtiveram redução do tempo de lambida da pata se comparados ao controle, porém apenas os extratos EREV e ESIM conseguiram resultados abaixo do extrato ECAA. Esses resultados demonstram que os extrato EREV e ESIM possuem atividade antinociceptiva e anti-inflamatório.

É interessante considerar que os medicamentos de ação central como os opióides inibem ambas as fases do teste da formalina, já drogas que atuam em periféricos, tais como drogas anti-inflamatórias são eficazes apenas na segunda fase (MOTA *et al.*,2011).

5. 5 EFEITOS DOS EXTRATOS EREV E ESIM NO TESTE DA PLACA QUENTE

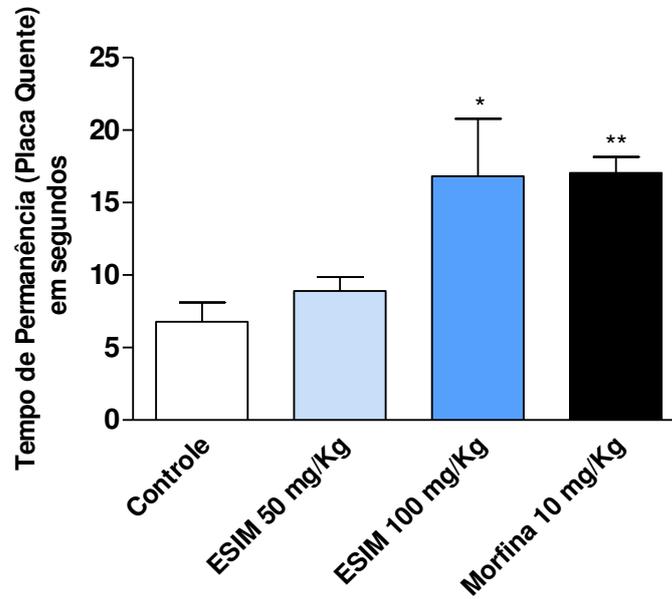
Para certificação da potencial ação antinociceptiva dos extratos EREV e ESIM no teste da formalina seguiu-se com teste da placa quente que avalia o tempo de permanência e a reação do animal a estímulos térmicos. O método tem maior especificidade para atividade antinociceptiva de drogas que atuam no SNC, como analgésicos narcóticos (POMPEU *et al.*, 2012).

Os roedores têm a tendência de reagir a estímulos térmicos com uma certa latência como: lambe uma das patas, levantar uma das patas, levantar e até mesmo pular, reações que indicam nocicepção. Para preservar o animal e evitar lesões teciduais o tempo de permanência máxima para uma boa resposta é de 30 s (ALMEIDA, 2006). Nesse teste foram utilizadas duas doses de 50 e 100 mg/kg, via i.p. dos extratos EREV e ESIM. A resposta ao estímulo foi quantificada em duas etapas: 30 min e 60 min após o tratamento com as doses mencionadas. Foi observado que ambas as doses de 100 mg/kg sugeriram uma atividade antinociceptiva, com eficácia semelhante à da Morfina, mas com uma potência bastante inferior já que a dose dos extratos é muito superior a droga padrão.

No teste da placa quente, após 30 minutos da administração foi observado (**Gráfico 6**) aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo de permanência dos animais tratados com o extrato de ESIM na dose de 100 mg/kg ($16,82 \pm 3,955$ s), valor próximo ao da droga padrão Morfina na dose 10 mg/Kg ($17,05 \pm 1,102$ s).

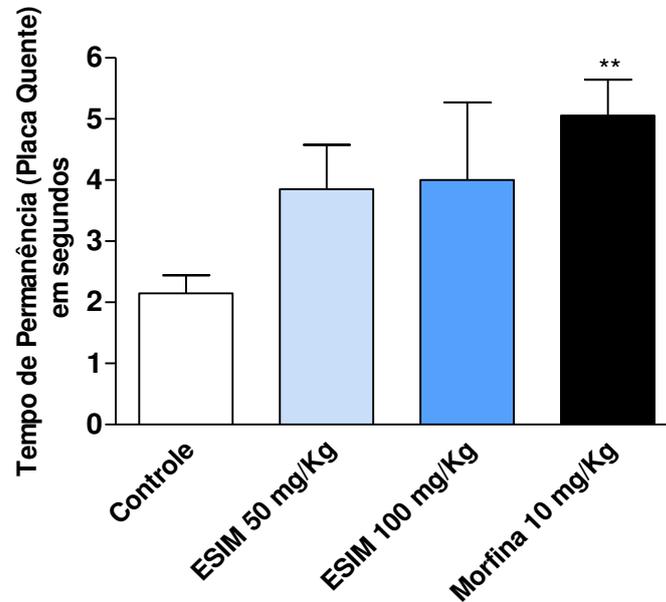
Entretanto, quando tratado com o ESIM na dose de 50 mg/kg ($8,90 \pm 0,9626$ s), após 30 minutos da administração, não houve nenhuma alteração significativa no tempo de permanência na placa em relação ao grupo controle (veículo) ($8,90 \pm 0,9626$ s).

Gráfico 6: Efeito do extrato ESIM nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg no teste da placa quente, após 30 minutos da administração. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando com o veículo (controle) pelo Teste de Dunnett.



No teste da placa quente realizado após 60 minutos da administração (**Gráfico 7**), apenas a Morfina na dose 10 mg/kg ($5,06 \pm 0,581$ s) apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) frente ao controle ($2,15 \pm 0,291$ s). A permanência na placa quente para os tratamentos ESIM 50 mg/kg, ESIM 100 mg/kg foram respectivamente: $3,85 \pm 0,726$; $4,00 \pm 1,273$ segundos.

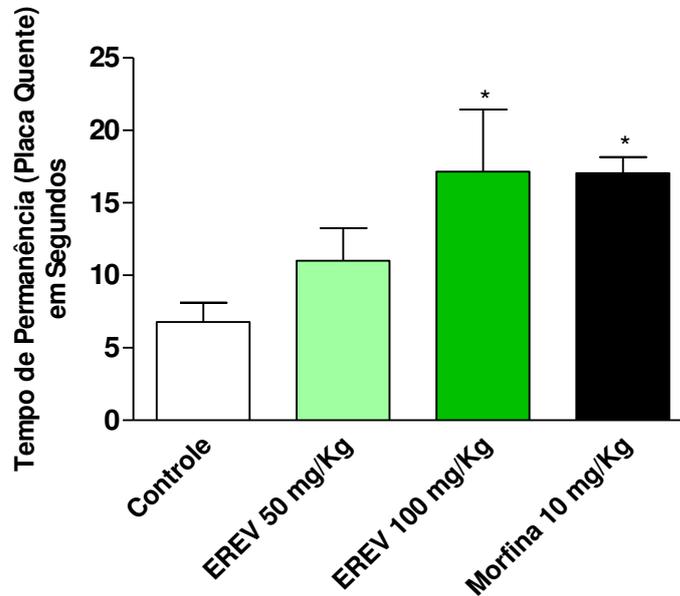
Gráfico 7: Efeito do extrato ESIM nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg no teste da placa quente, após 60 minutos da administração. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando com o veículo (controle) pelo Teste de Dunnett.



No teste da placa quente após 30 minutos de administração do EREV foram obtidos resultados semelhantes ao ESIM. Conforme mostra o **Gráfico 8**, os grupos tratados com o EREV 100 mg/kg ($17,15 \pm 4,288$ s) e com a Morfina 10 mg/kg ($17,05 \pm 1,102$ s) apresentaram resultados significativos ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($6,78 \pm 1,331$ s).

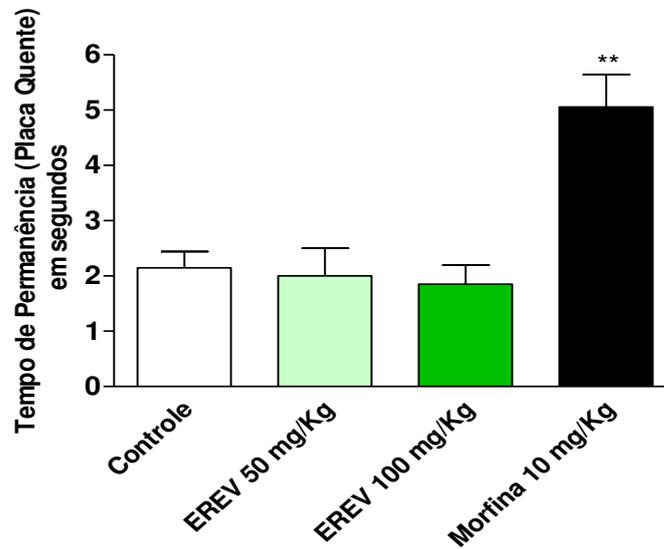
O grupo EREV administrado com a dose de 50 mg/kg ($11,00 \pm 2,264$ s) não apresentou tempo de permanência significativo em relação ao grupo controle ($6,78 \pm 1,331$ s) pelo teste de Dunnett.

Gráfico 8: Efeito do extrato EREV nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg no teste da placa quente, após 30 minutos da administração. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando com o veículo (controle) pelo Teste de Dunnett.



No teste da placa quente realizado após 60 minutos da administração (**Gráfico 9**), apenas a Morfina na dose 10 mg/kg ($5,06 \pm 0,581$ s) apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) frente ao controle ($2,51 \pm 0,291$ s). A permanência na placa quente para os tratamentos com ESIM 50 mg/kg e ESIM 100 mg/kg foram respectivamente: $2,00 \pm 0,503$; $1,85 \pm 0,345$ segundos.

Gráfico 9: Efeito do extrato EREV nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg no teste da placa quente, após 60 minutos da administração. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando com o veículo (controle) pelo Teste de Dunnett.



As plantas desempenham um papel de extrema importância na descoberta de novas drogas e medicamentos fitoterápicos. Isto demonstra claramente a grande importância no papel socioeconômico da pesquisa no Brasil, mas também porque permite um conhecimento maior da cultura e de como aproveitar essa biodiversidade de forma consciente e com o máximo de aplicação (ALMEIDA, 1993).

A região Nordeste do Brasil apresenta uma diversidade de espécies nativas que são conhecidas pelas suas propriedades medicinais e pelo uso contínuo da população na medicina tradicional (MENDES, 2012). Nesse sentido, uma diversidade de estudos está sendo realizadas com intuito de descobrir novas substâncias com princípios farmacológicos (MAIOR, 2011; LOIOLA, 2013)

O gênero *Erythroxylum* engloba aproximadamente 31% das espécies registradas para o nordeste brasileiro sendo 13 espécies endêmicas no estado da Paraíba (LOIOLA et al, 2007). Pesquisas relacionadas a atividade farmacológica das espécies desse gênero demonstraram ótimos resultados com atividades psicoativas, antimicrobiana e antitumoral (AGUIAR, 2011; MAIA et al., 2014).

A presente pesquisa buscou investigar os efeitos psicofarmacológicos dos extratos metanólicos das espécies *Erythroxylum caatingae*, *Erythroxylum revolutum*, *Erythroxylum simonis*, *Erythroxylum paufferense* e *Erythroxylum pulchrum* em camundongos e para determinar possíveis atividades ansiolíticas, anticonvulsivantes ou antinociceptiva dos extratos.

Desta forma, demonstrou-se que com base nos dados experimentais é possível concluir que os extratos ECAA, EREV e ESIM possuem efeitos psicofarmacológicos que sugerem ação de droga depressora do SNC e com propícia atividade antinociceptiva.

6 CONCLUSÕES

A investigação dos efeitos psicofarmacológicos dos extratos metanólicos obtidos das espécies *Erythroxylum caatingae*, *Erythroxylum revolutum*, *Erythroxylum simonis*, *Erythroxylum paufferense* e *Erythroxylum pulchrum* em camundongos, na dose e na via testada, permitiu elaborar as seguintes considerações finais:

- Nenhum dos extratos evidenciou efeito de inibição das convulsões induzidas por pentilenotetrazol, o que demonstra ausência de atividade anticonvulsivante.
- No teste de labirinto de cruz elevado, os extratos não evidenciaram nenhuma atividade ansiolítica.
- Os extratos ECAA, EREV, EPAU e ESIM demonstraram alterações significativas quanto ao tempo de lambida da pata na 1ª fase do teste da formalina.
- Os extratos ECAA, EREV e ESIM obtiveram bons resultados diminuindo o tempo de lambida da pata na 2ª fase do teste da formalina, sugerindo uma possível atividade antinociceptiva.
- Os extratos EREV e ESIM demonstraram o aumento da latência no teste da placa quente após 30 min na dose de 100 mg/kg, indicando possível atividade antinociceptiva.

- O estudo psicofarmacológico das espécies do gênero *Erythroxylum* levou a descobertas notáveis, não só pela atividade antinociceptiva dos extratos metanólicos EREV e ESIM, mas também pelo fato de não haver registros na literatura sobre suas atividades psicofarmacológicas. Esse fato engradece essa pesquisa, sendo o primeiro relato sobre a atividade antinociceptiva dessas duas espécies *E. revolutum* e *E. simonis*.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. S. **Estudos das atividades antimicrobiana e anticâncer de *Erythroxylum caatingae* Plowman e *Erythroxylum subrotundum* A. St – Hill.** Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Área de concentração- Biologia Química para a Saúde, Pernambuco, 2011.
- AGUIAR, J. S.; ARAÚJO, R. O.; RODRIGUES, M. D.; SENA, K. X. F. R.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P.; OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; NASCIMENTO, S. C.; SILVA, T. G. **Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman.** International Journal of Molecular Sciences, v. 13, p. 4124-4140, 2012.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. **Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18 p 472-508. 2008.
- ALBUQUERQUE, C. H.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, T. S.; GONÇALVES, G. F.; COSTA, V. C. O.; AGRA, M. F.; PESSÕA, H. L. F.; SILVA, M. S. **Flavonoides glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St,-Hil. (*Erythroxylaceae*).** Quim. Nova, v. 37, n. 4, p. 663-666, 2014.
- ALMEIDA, E. R. Plantas Medicinais Brasileiras. São Paulo: Hemus; 1993.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAUJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista brasileira de farmácia**, v. 80, n. 3-4, p 72-76, 1999.
- ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos.** Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.
- ANCA, J. M.; LAMELA, M., CALLEJA, J. M. **Activity on the central nervous system of *Himantalia elongata*.** Planta médica, v. 59, p. 218-221, 1993.
- ANSELL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. **Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum* species.** Phytochemistry, v. 32, n. 4, p. 953-959, 1993.
- ATTAL, N. **Chronic neuropathic pain: mechanisms and tratment.** Clinical Journal of Pain, v. 16, p. 118-130, 2000.
- AZEVEDO, L. G.; PERAZA, G. G.; LERNER, C.; SOARES, A.; MURCIA, N.; BAISCH, A. L. M. **Investigation of the anti-inflammatory and analgesic effects from na extract of**

aplysina caissara, a marine sponge. Fundamental e Clinical Pharmacology. v. 22, n. 5, p. 549-556, 2008.

BECERRA, A. M. G. **Efeitos de drogas ditas ansiolíticas e ansiogênicas administradas em ratos testados no labirinto em cruz elevado na presença e ausência de luminosidade.** Dissertação de Mestrado em Ciências. Departamento de Psicologia e Educação. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, São Paulo, 2004.

BONEFELD, M.; FRIEDRICH, H.; KOLODZIEJ, H. **(+)-catechin 3-rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*.** Phytochemistry, v. 25, n. 5, p. 1205-1207, 1986

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

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. **Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil.** Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 18, p. 314-319, 2008.

CELEDONIO, N. R. **Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e antiedematogênico do óleo essencial de *Croton angyrophylloides* e seus constituintes: alfa-pineno e trans-cariofileno.** Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará- UEC, Fortaleza, 2008

CHAVES, F. R.; ROMALDINI, J. H. **Diabetes millitus tipo 2.** Revista Brasileira de Medicina. p.83-90, 2002.

CHAVES C. G.; SCHAPOVAL E. E. S.; ZUANAZZI J. A.; DIEHL, E.; SIQUEIRA N. C. S.; HENRIQUES A. T. ***Erythroxylum argentinum*: assays for anti-inflammatory activity.** Journal of Ethnopharmacology, v.22, p.117-120, 1988.

CHÁVEZ, J. P.; SANTOS, I. D.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. **Flavonoids and triterpenes ester derivatives from *Erythroxulum leal costae*.** Phytochemistry, v. 41, n. 3, p. 941-943, 1996

CHIN, Y. W.; JONES, W. P.; WAYBRIGHT, T. J; MCCLOUD, T. G.; RASOANAIVO, P.; CRAGG, G. M.; CASSADY, J. M.; KINGHORN, A. D. **Tropane aromatic ester alkaloids from a large-scale re-collection of *Erythroxylum pervillei* stem bark obtained in Madagascar.** Journal of Natural Products, v. 69, p. 414-417, 2006.

COELHO, F. M. S.; ELIAS, R. M.; POYARES, D.; HALLIMAN, M. P.; BITTENCOURT, L. R. A.; TUFIK, S. **Benzodiazepínicos: uso clínico e perspectivas.** Rev. Bras. Med, v. 63, n. 5, p 196-200, 2006.

CÓRDOVA, W. H. P. **Isolation and ifentification of antioxidante phytochemicals from Cuban species pf the genera *Erythroxylum* P. Browne and *Pluchea* Cass.** Doctoral theses in Biochemistry, biophysics e mocelular biology, Université de Liège, 2012.

- COSTA-LIMA, J. L.; LOIOLA, M. I. B.; ALVES, M. **A new species of *Erythroxylum* (*Erythroxylaceae*) from northeastern Brazil**. *Brittonia*, v. 66, n. 1, p. 60-64, 2014.
- DALY, D., *Erythroxylaceae*. Pp 143-145. In: N. Smith; S. A. Mori, A. Henderson *et al.* (eds.). **Flowering Plants of Neotropics**. USA, The New York Botanical Garden. Princeton University Press, 2004.
- DE LUCA, A.; CINGOLANI, A.; LINZALONE, A.; AMMASSARI, A. ET AL. **Improved Detection of JC Virus DNA in Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of AIDS – Related Progressive Multifocal Leukoencephalopathy**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 5, p 1343-1345, 1996.
- DWORKIN, R. H, BACKONJA, M, ROWBOTHAM, M. C., et al. **Advances in neuropathic pain: diagnosis mechanisms, and treatment**. *Arch Neurol*, v. 60, p. 1524-1534, 2003.
- FONSECA, A. P. N. D.; SILVA, G. D. F.; CARVALHO, J. J.; SALAZAR, G. D. C. M.; DUARTE, L. P. **Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Mayrtnus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto**. *Quim. Nova*, v. 30, n. 4, 842-847, 2007.
- GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. *Fundamentos de psicofarmacologia*. São Paulo: Athenus, p.135, 2001.
- GRIFFIN, W. J.; LIN, G. D. **Chemotoxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids**. *Phytochemistry*, v. 53, p. 623-637, 2000.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R.O. 2003. **Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. Farmacognosia da Planta ao medicamento**. 5º Ed. Porto Alegre/ Florianópolis p.1102.
- HEAPY, C. G.; JAMAIESON, A.; RUSSEL, N. J. W. **Afferent C-fibre and A- δ activity in models of inflamamation**. *British Journal of Pharmacology*, v. 90, p. 164, 1987.
- HEINZMANN, B. M.; BARROS, M. C. **Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*)**. *Saúde, Santa Maria*. v. 33, p. 43-48, 2007.
- HERNÁNDEZ, E. L.; BRAVO, J.; SOLÍS, H. **Epilepsia y antieilépticos de primeira y segunda generación: Aspectos básicos útiles em la práctica clínica**. *Revista Facultad Medicina, UNAM*, v. 48, n. 5, p. 201-209, 2005.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. **The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain**. *Pain*, v. 30, p. 103-114.
- JOHNSON, E. L.; SCHIMIDT, W. F.; EMCHE, S. D.; MOSSOBA, M. M.; MUSSER, S. M. **Kaempferol (rhamnosy) glucoside, a new flavonol from *Erythroxylum coca* var. ipadu**. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 59-67, 2003.

LISTER, R. G. **The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.** *Psychopharmacology*, v. 92, p. 180-185, 1987.

LOIOLA, M. I. B. **A new species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) from the Brazilian semiarid region.** *Phytotaxa*, v. 150, p. 61-64, 2013

LOIOLA, M. I. B.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; QUEIROZ, R. T. **Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth.** *Acta botanica. Brasilica*, .v. 21, n. 2, p 473-487, 2007.

LÖSCHER, W. **New versions in the pharmacology of anticonvulsion.** *European Journal of Pharmacology*. v.342, p. 1-13. 1998

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. **New horizons in the development of antiepileptic drugs.** *Epilepsy Research*, v. 50, p. 3-16, 2002.

MAIA, A. K. H. L. **Avaliação dos efeitos psicofarmacológicos do extrato metanólico bruto isolado da espécie *Erythroxylum caatingae* Plowman (*Erythroxylaceae*) em camundongos.** Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba-UFPB, Paraíba, 2009.

MAIA, A. K. H. L.; QUEIROZ, R. B.; FONSECA, D. V.; PINHO, A. S.; SANTOS, S. G.; ALENCAR, J. L. TAVARES, J. F.; ALMEIDA, R. N.; MORAIS, L. C. S. L. **Antinociceptive activity of the extract of *Erythroxylum caatingae*.** *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, v. 13, p 152-162, 2014.

MAIOR, F. N. S. **Atividade ansiolítica e antinociceptiva do óxido de linalol em modelos animais.** Tese de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba-UFPB, Paraíba, 2011.

MALONE, M. H. **Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation.** In: *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity.* Springer Berlin Heidelberg, p. 23-53, 1977.

MARINHO, V. M. C. **A biodiversidade e a geração de novas oportunidades para a indústria farmacêutica nacional,** XXVI ENEGEP – Fortaleza, CE, Brasil, Outubro 2006.

MARIZ, S. R.; CERQUEIRA, G. S.; ARAÚJO, W. C. DUARTE, J. C.; MELO, A. F. M.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A. **Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 3, p. 372-378, 2006.

MARTINS, J. V. C.; OTOBONE, F. J.; SELA, R. V.; OBICI, S.; TROMBELLI, M. A.; CORTEZ, D. A. G.; AUDI, E. A. **Activity of hydroethanolic extract from *Kielmeyera coriácea* stems on central nervous system in rats.** *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 26, n. 2, p. 365-368, 2004.

MENDES, S. S. **Estudo químico e farmacológicos da *Lippia gracilis* Schauer.** Tese de Doutorado em Biotecnologia pelo Programa RENORBIO, Sergipe, 2012.

- MILILAN, M. J. The induction of pain: na integrative review. *Prog Neurobiol*, 1999, v. 57, p.1-164.
- MOTA, V. G.; CARVALHO, F. L.; MORAIS, L. C. S. L.; BHATTACHARYYA, J.; ALMEIDA, R. N.; ALENCAR, J. L. **Antinociceptive activity of the chloroform fraction of *Dioclea virgata* (Rich) Amshoff (Fabaceae) in mice.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2011, p. 10, 2011.
- NETO, J. P. **Farmacologia aplicada à Avicultura.** Editora Roca, 2005.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010.** *J. Nat. Prod.*, v. 75, p. 311-335, 2012.
- NOBREGA, F. F. F. **Montepeno 4-terpineol – uma molécula com atividade anticonvulsivante: estudos comportamentais e eletrofisiológicos.** Tese de Doutorado em Biotecnologia pelo Programa RENORBIO, João Pessoa, 2012.
- OLIVEIRA, A. S. B.; GABBAI, A. A. **Abordagem terapêutica da dor neuropática na clínica neurológica.** *Revista de Neurociências*, v. 6, n. 2, p. 87-95, 1998.
- OLIVEIRA, L. E. G. **Estudo da atividade psicofarmacológica do Tetrahidrolinalol em roedores e seus possíveis mecanismos de ação.** Tese de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba-UFPB, Paraíba, 2010.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. **Validation of open: closed arm entries in na elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.** *Jounal fo Neuroscience Methods*, v. 14, p. 149-167, 1985.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. **Produtos naturais: atualidade, desafio e perspectivas.** *Química Nova*, v. 25, p 45-61, 2002.
- PLOWMAN, T. C. **Three new species of *Erythroxylum* (*Erythroxylaceae*) from Venezuela.** *Brittonia*, v. 34, n. 4, p. 442-457, 1982.
- PLOWMAN, T. C.; HENSOLD, N. **Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (*Erythroxylaceae*).** *Brittonia*, v. 56, n. 1, p. 1-53, 2004.
- POLATIN, P. B.; DERSH, J. D. **Psychotropic medication in chronic spinal disorders.** *The Spine Journal*, v. 4, p. 436-450, 2004.
- POMPEU, D. R.; ROGEZ, H.; MONTEIRO, K. M.; TINTI, S. V.; CARVALHO, J. E. D. **Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*.** *ActaAmazonica*, v. 42, n. 1, p. 165-172, 2012.
- PULCHEAULT, M. **Natural products: chemical instruments to apprehend biological symphony.** *Org Biomol Chem*, v. 6, p 424-432, 2008.

RIBEIRO, S.; SCHMIDT, A. P.; SCHMIDT, R. G. **O uso de opiodes no tratamento da dor crônica não oncológica: o papel da metadona.** Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 52, n. 5, p. 644-651, 2002.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. **Animal models of anxiety: na ethological perspective.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 30 n. 3, p. 289-304, 1997.

RODRIGUES, W.; BARBOSA, G. F. **Plantas medicinais: uma alternativa econômica para conservação do cerrado brasileiro.** Revista. Gepec, v. 85903, 2012.

QUINATANS, J. L. J.; MELO, L. E. A.; ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia- Fundamentos práticos.** 1^a ed. Editoria Guanabara Koogan, 2006.

SANTOS, C. C.; SOUSA, L. M. A.; BRAZ-FILHO, R.; SIMONE, C. A.; SILVEIRA, E. R. **NMR assignment and X-ray diffraction spectra for two unusual kaurene diterpenes from *Erythroxylum barbatum*.** Magnetic Resonance in Chemistry, v. 43, n. 12, p. 1012-1015, 2005

SILVA, R. C. B. **Esquizofrenia: uma revisão.** Psicologia USP, v. 17, p.263-285, 2006.

SNYDER, S. H. **Drugs and the brain.** (1986). Scientific American Library, p 23-45, New York.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. **Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potencial benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, p.642-654, 2008.

SOUZA, M. M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R. A.; CECHINELFILHO, V. **Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Iponomea pes-caprae* I (L.) R. Br.** Journal of Ethnopharmacology, v.69, p. 85-90, 2000.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON-POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. **Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil.** Journal of Ethnopharmacology, v. 90, p. 135-143, 2004.

TANAKA, R. L.; AMORIM, M. C. S. **O mercado e as possibilidades da indústria de biofármacos no Brasil.** Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba. ISSN (impresso) 1517-8242 (eletrônico) 1984-4840, v. 16, n. 2, p. 86-92, 2014.

TITA, B.; ABDEL-HAQ, H.; VILATONE, A.; MAZZANTI, G.; SASO, L. **Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test.** II Farmaco, v.56, n. 5, p. 341-343, 2001.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. **The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol)**. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 80, n. 3, p. 300-307, 1944.

YUNES, R. A, FILHO, C. V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 2º ed p. 319, 2009.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. Q.; HOSTETTMANN, K.; J. NAT. Prod. 2005, 68, 1153.

ZUANAZZI, J. A. S.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T. 2001. Biochemical Systematics and Ecology 29: 819-825.