



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0504517-7 A**

(22) Data de Depósito: 20/10/2005  
(43) Data de Publicação: **25/09/2007**  
(RPI 1916)



(51) *Int. Cl.:*  
**A61K 36/48 (2007.01)**  
**A61K 31/439 (2007.01)**  
**A61P 25/00 (2007.01)**

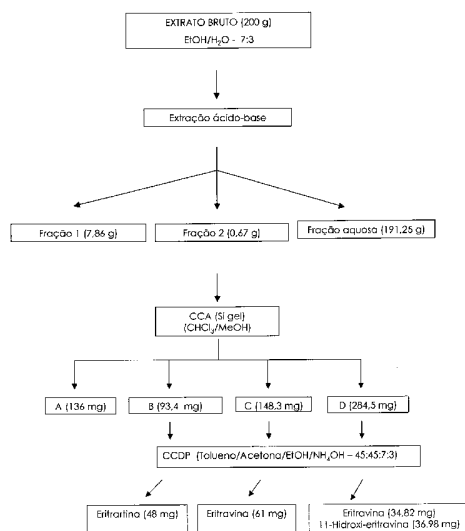
(54) **Título: USO, NA MODULAÇÃO DOS SISTEMAS COLINÉRGICO E/OU SEROTONÉRGICO E/OU GABAÉRGICO DE VERTEBRADOS, DE UM EXTRATOR BRUTO VEGETAL PADRONIZADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS ASSOCIADOS A DISFUNÇÕES DO SISTEMA COLINÉRGICO E/OU SEROTONÉRGICO E/OU GABAÉRGICO, E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEDICAMENTO PARA A MODULAÇÃO DOS SISTEMAS COLINÉRGICO E/OU SEROTONÉRGICO E/OU GABAÉRGICO DE VERTEBRADOS**

(57) **Resumo:** Uso, na modulação dos sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico de vertebrados, de um extrato bruto vegetal padronizado, Composição farmacêutica para o tratamento de distúrbios associados a disfunções do sistema colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico, Processo de produção de medicamento para a modulação dos sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico de vertebrados A presente invenção proporciona o uso moléculas para a modulação dos sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico, sendo reveladas composições farmacêuticas compreendendo extrato brutos vegetais padronizados, ou 11-OH-eritavina, eritavina, eritartina, seus Isómeros, sais, derivados e/ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos, ou ainda combinações dos mesmos, opcionalmente contendo outros derivados eritrínicos, para o tratamento de distúrbios da ansiedade; processos do obtenção das referidas composições farmacêuticas também são revelados.

(71) Depositante(s): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (BR/SP)

(72) Inventor(es): Otavio Aparecido Flausino Junior, Ricardo Luis Nunes de Souza, Vanderlan da Silva Bolzani

(74) Procurador: Flávia Maria de Aguiar Merola



## Relatório Descritivo

**Uso, na modulação dos sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico de vertebrados, de um extrato bruto vegetal padronizado,**  
**5 Composição farmacêutica para o tratamento de distúrbios associados a disfunções do sistema colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico, e**  
**Processo de produção de medicamento para a modulação dos sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico de vertebrados**

### 10 Campo da invenção

A presente invenção se refere a moléculas ativas sobre os sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico. Mais especificamente, a presente invenção se refere a derivados eritrínicos úteis na preparação de medicamentos ansiolíticos. São também providas composições farmacêuticas  
 15 compreendendo as referidas moléculas e processos de preparação das referidas composições.

### Antecedentes da Invenção

20 A *Erythrina mulungu* (Papilionaceae-Leguminoseae) 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  
 25 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. crita-galli*, *E. poeppigiana*, *E. fusca*, *E. falcata*, *E. speciosa* e *E. verna* (LORENZI, 1992).

30 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 comercialmente no mercado farmacêutico brasileiro e internacional, no entanto, sem nenhuma padronização quanto à qualidade do produto, podendo oferecer riscos à saúde do consumidor.

### Fitoquímica

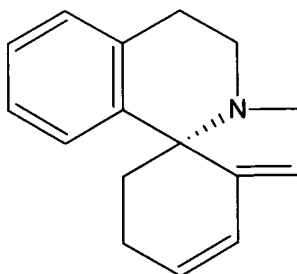
O interesse pelo estudo do gênero *Erythrina* teve seu início em 1877 quando Domínguez e Altamirano descobriram a ação farmacológica do extrato das sementes da *E. americana*, semelhante aos efeitos da *d*-tubocurarina (substância extraída de *Chondodendron tomentosum*) (HARGREAVES *et al.*, 1974; HIDER *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 colinérgica 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  $\alpha$ -eritroidina e  $\beta$ -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).

Após o isolamento de  $\alpha$  e  $\beta$ -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 (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, 1970; GHOSAL *et al.*, 1971; ITO *et al.*, 1971; MIANA *et al.*, 1972; GHOSAL *et al.*,  
 5 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).

10 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 na estrutura destes alcalóides, que  
 15 apresentam a fórmula geral abaixo, facilitando a identificação posterior de novos compostos.



A elucidação desta estrutura facilitou a posterior identificação de novos compostos, sendo atualmente conhecidos alcalóides eritrínicos três tipos: 1) os dienóides, que apresentam um sistema diênico nos anéis A e B; 2) os alquenóides, que possuem uma dupla ligação  $\Delta^{1,6}$  no anel A; e 3) um terceiro grupo de alcalóides eritrínicos que inclui: erisodienona, 3-desmetoxi eritratidinona,  $\alpha$ -eritroidina e  $\beta$ -eritroidina. Também foram isolados de espécies de *Erythrina* alguns outros alcalóides que não apresentam o esqueleto

20

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  
5 (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.*,  
10 1996; TANAKA *et al.*, 1996, 1997a,b; 1998; 2001; OH *et al.*, 1999; YENESEW *et al.*, 2000; NKENGFAK *et al.*, 2001).

### Atividades farmacológicas

Entre as principais ações farmacológicas de *Erythrina* destaca-se sua  
15 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- $\beta$ -eritroidina (DHBE), um antagonista de receptores nicotínicos (HIDER *et al.*, 1986) isolado de *E. americana* (BOEKELHEIDE e GRUNDON, 1953;  
20 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-HT<sub>3</sub>) (ELSELEÈ *et al.*, 1993). Atividade sobre o sistema serotoninérgico também foi observada em outro estudo (ROGER *et al.*, 2001), onde os autores demonstraram que o extrato  
25 bruto de *E. vespertilio* inibiu a liberação cálcio-dependente de serotonina plaquetária, uma das principais atividades dos antagonistas de receptores 5-HT<sub>3</sub>. 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  
30 atividades sobre o sistema nervoso central pode-se citar os 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-AGULIAR *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 labirinto em T elevado, 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 transição claro-escuro, 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 esquiva inibitória, quanto na fuga do braço aberto do labirinto em T elevado (ONUSIC *et al.*, 2003). No modelo da transição claro-escuro o extrato de *E. mulungu*, com a dose de 50 mg/kg, também apresentou efeito ansiolítico após tratamento crônico de 14 dias (ONUSIC *et al.*, 2003).

Apesar destas inúmeras abordagens, até o momento não é conhecido qualquer relato do desenvolvimento de medicamentos ansiolíticos a partir de preparações padronizadas, seja na forma de extratos brutos ou frações purificadas, de princípios ativos isolados de *Erythrina*, ou ainda a partir de sua

síntese química, nem tampouco processos de preparação de tais medicamentos.

### **Sumário da Invenção**

5           É um objeto da presente invenção fornecer composições farmacêuticas padronizadas contendo substâncias derivadas de plantas do gênero *Erythrina*. Em um aspecto, as composições farmacêuticas da invenção compreendem extratos brutos padronizados, frações purificadas ricas em alcalóides eritrínicos (F2) ou alcalóides isolados eritratina, eritravina e 11-hidroxieritravina, ou ainda  
10           combinações dos mesmos, de forma a atuar, direta ou indiretamente, nos sistemas colinérgico, serotoninérgico e gabaérgico.

          Em um outro aspecto são proporcionados processo de obtenção das referidas composições farmacêuticas e composições farmacêuticas compreendendo as mesmas.

15           Em outro aspecto, o extrato bruto, a fração purificada rica em alcalóides (F2) e as moléculas da presente invenção demonstraram-se ativas como ansiolíticos em modelos animais. É, portanto, um objeto da presente invenção proporcionar extratos, frações e/ou moléculas úteis no tratamento de distúrbios relacionados à ansiedade ou de outras manifestações clínicas que requeiram o  
20           uso de ansiolíticos.

          Em um outro aspecto, a preparação do extrato bruto padronizado, da fração purificada rica em alcalóides (F2) e o isolamento e caracterização estrutural das moléculas, bem como a avaliação da atividade farmacológica da presente invenção possibilitam o desenvolvimento de composições  
25           farmacêuticas padronizadas destinadas ao tratamento dos distúrbios da ansiedade. É, portanto, um outro objeto da presente invenção proporcionar composições farmacêuticas compreendendo preparações naturais e moléculas com propriedades ansiolíticas.

          Em ainda outro aspecto, a preparação do extrato, da fração purificada e  
30           o isolamento e/ou síntese das moléculas da presente invenção proporcionam facilitados processos de produção de composições farmacêuticas que

compreendam as referidas preparações naturais e/ou moléculas. É, portanto, um adicional objeto da presente invenção proporcionar processos de produção de composições farmacêuticas.

## 5 **Descrição da Figura**

A Figura 1 mostra um esquema geral ilustrativo das etapas de extração e fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto de *E. mulungu* e o isolamento dos alcalóides eritartina, eritravina e 11-OH-eritravina a partir do extrato hidroalcoólico bruto de *E. mulungu*.

10

## **Descrição Detalhada da Invenção**

Para efeito desta invenção, por "composições farmacêuticas" entende-se toda e qualquer composição que contenha um princípio ativo, com fins profiláticos, paliativos e/ou curativos, atuando de forma a manter e/ou restaurar a homeostase, podendo ser administrada de forma tópica, parenteral, enteral e/ou intratecal.

15

As composições farmacêuticas de que trata esta invenção pertencem à classe dos derivados de eritrina e incluem 11-OH-eritravina, seus isómeros, sais, derivados e/ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos, opcionalmente compreendendo, eritartina e/ou eritravina isolados de extrato bruto ou da fração purificada da *Erythrina mulungu* ou sintetizados quimicamente.

20

A avaliação aplicabilidade terapêutica dos compostos da presente invenção foi realizada em diversas etapas. São apresentados a seguir, e a título de exemplo, sem com isso limitar o escopo das reivindicações anexas, os experimentos realizados e os respectivos resultados.

25

### **Exemplo 1 – Fitoquímico**

#### **Coleta da planta e preparação do extrato**

Foram coletadas as flores de árvores adultas durante a estação do inverno, por exemplo na região de Araraquara (SP). O material vegetal fresco

30

(6 Kg) foi submetido à extração por processo de maceração com etanol/água (EtOH/H<sub>2</sub>O) (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.

- 5 Sua padronização em alcalóides totais foi realizada por volumetria de neutralização, segundo metodologia farmacopéica, e estabelecida como contendo, no mínimo, 0,1% em alcalóides expressos em eritrovina.

#### Fracionamento biomonitorado e isolamento dos constituintes químicos

10 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. 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 (CHCl<sub>3</sub>).

15 A fase clorofórmica 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 (NH<sub>4</sub>OH) em volume suficiente para atingir pH entre 9-10 e submetida novamente à extração com CHCl<sub>3</sub>.

20 A fase clorofórmica foi separada e o solvente evaporado, resultando na fração purificada rica em alcalóides (**F2**) (670 mg). Esta fração foi avaliada por técnica de HPLC e padronizada como contendo, no mínimo, 20% em alcalóides totais e 10% em eritrovina. A F2 foi também utilizada no teste farmacológico do labirinto em T elevado.

#### Exemplo 2 - Cromatografia, instrumentação e espectrometria

Foram utilizados solventes de grau “para análise”.

25 Para a cromatografia analítica em camada delgada (CCD) de sílica, usou-se como sistema de solventes, CHCl<sub>3</sub>/metanol (MeOH) (9:1). O teste com o Dragendorff revelou positivo para alcalóides na **F2**, a qual foi submetida à cromatografia em coluna aberta (CCA) (5 cm de diâmetro e 15 cm de altura).

30 Para a CCA foi utilizada como fase estacionária sílica (0,035-0,070 mm,  $\phi$  6  $\eta$ m) e como fase móvel CHCl<sub>3</sub>/MeOH (10:0 – 8:2). Para a separação foram utilizados 670 mg da **F2** e coletadas 101 frações de aproximadamente 20 mL.

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).

5 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  $\text{NH}_4\text{OH}$  (45:45:7:3). A partir da fração B foi isolada a eritartina (48 mg), das frações C e D, a eritravina (61 e 34,82 mg, respectivamente) e da fração D, a 11-OH-eritravina (36,98 mg).  
10

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 ( $\text{CDCl}_3$ ).

### 15 **Exemplo 3 - Farmacologia**

#### **3.1 – Em Animais**

Foram utilizados camundongos suíços, pesando entre 25 e 35g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP/Araraquara.

20 Os animais foram alojados em grupos de 10 e 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 e umidade de 50-60%.

#### 25 **Exemplo 4 - Extratos bruto padronizado e Fração purificada rica em alcalóides, Droga padrão e Veículo**

Foi utilizado o extrato hidroalcoólico liofilizado – extrato bruto padronizado (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), administradas via oral (v.o) por gavagem.  
30 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 sonicado por 15 minutos. O diazepam foi dissolvido em 0,9% NaCl e Tween-80.

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

5

### **Aparelhos e procedimento experimental**

O labirinto em T elevado é feito com paredes de vidro transparente e o assoalho de madeira e consiste de um braço fechado (30 x 5 x 15 cm) unido perpendicularmente a dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm), elevados a 38,5  
10 cm do solo por um suporte de madeira. 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  
15 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 eram de 300 segundos. O aparelho era limpo com etanol 20% após a exposição de cada animal.

20 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.

O aparelho consiste em uma caixa de polipropileno branco com base retangular, preferencialmente 40 x 48 cm, cercada por paredes de  
25 preferencialmente 30 cm de altura. O assoalho é subdividido em preferencialmente 30 quadrados de 8 x 8 cm.

Para a realização do teste os animais foram 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  
30 levantamentos (WALSH e CUMMINS, 1976).

### Forma de análise dos resultados

Para a determinação das estruturas químicas dos alcalóides isolados foram utilizadas espectrometrias de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como espectrometria bidimensional de HMQC, HMBC e COSY. 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 a arena foram submetidos à ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

Foram considerados significativos os resultados que apresentaram valores de  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

### 1) Fitoquímico (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  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CDCl}_3$  para as substâncias 1, 2 e 3 (tabela 2) mostrou a presença de sinais característicos do esqueleto de alcalóides eritrínicos. Desta forma, foi possível identificar sinais de dois singletos de prótons aromáticos referentes aos hidrogênios H-4 e H-17 e de dois singletos atribuídos aos hidrogênios das metoxilas na posição dos carbonos C-15 e C-16. A presença de três sinais de prótons olefínicos (singlete

largo (sl), H-7; duplete largo (dl), H-1; duplo duplete (dd), H-2), podem ser atribuídos aos hidrogênios do sistema diênico do esqueleto eritrínico.

Sarragioto *et al.* (1982) determinaram as ressonâncias do C-1 e C-2 em  $\delta$  125.3 e  $\delta$  131.2, respectivamente. No entanto no presente trabalho, a correlação entre os deslocamentos químicos dos espectros bidimensionais de HMQC revelou estas ressonâncias em  $\delta$  131.5 e  $\delta$  125.5, respectivamente. Os valores dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento estão mostrados na tabela 1.

10 **Tabela 1** – Valores dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) e constantes de acoplamento ( $J$ ) da RMN (500 MHz) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (em  $\text{CD}_3\text{Cl}$ ) de eritratina, eritravina e 11-OH-eritravina.

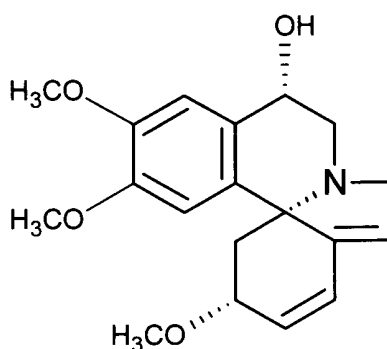
	Eritratina		Eritravina		11-OH-eritravina	
	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5.94 (d; 10,5)	131.52	5.9 (d 10,0)	134.18	6.01(d; 15,5)	135
2	6.52 (dd; 10,5; 2,5)	125.53	6.4 (dd; 10,0; 1,5)	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)	23.76	4.74 t	63.69
			2.6-2.7 m			
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	-----	148.28	-----	147.19	-----	141.32
16	-----	148.52	-----	147.77	-----	148.76
17	6.77 s	110.33	6.83 s	109.16	6.93 s	110.36

### 15 1.1) Eritratina

Após a identificação dos sinais característicos de hidrogênios do esqueleto eritrínico (tabela 2), foi observado que somente a substância 1 apresentava sinal em  $\delta$  3.24, 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  $^1\text{H}$  (tripletto (t) em  $\delta$  4.64) e de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  64.55) e as correlações obtidas com o teste de HMQC. Desta forma, o alcalóide **1** foi identificado como sendo a eritartina (figura 3). No entanto, diferentemente dos trabalhos anteriores, foi sugerida uma orientação equatorial para o grupo hidroxila em C-11, a partir dos valores das constantes de acoplamento entre  $\text{H}_{10\text{a-}11\text{e}}$  ( $J = 3.54$  Hz) e  $\text{H}_{10\text{e-}11\text{e}}$  ( $J = 3.07$  Hz).

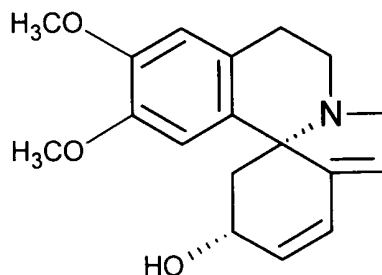
Abaixo encontra-se representada a estrutura química do alcalóide eritartina, isolado a partir do extrato bruto das flores de EM.



## 1.2) Eritravina

Diferentemente da substância anterior, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **2** não apresentou sinal de metoxila na posição C-3 (tabela 2). O multipletto (m) observado em  $\delta$  4.37 associado ao deslocamento químico observado em  $\delta$  67.73 do espectro de  $^{13}\text{C}$ , sugere a presença de um substituinte oxigenado nesta posição. Para a posição C-11 o duplo dubleto observado em  $\delta$  2.9 ( $J_{\text{H}11\text{ax-H}10\text{ax}} = 10,0$  Hz;  $J_{\text{H}11\text{ax-H}11\text{eq}} = 6,5$  Hz) e o multipletto observado na região de  $\delta$  2.65-2.69 foram atribuídos aos H-11 axial (ax) e equatorial (eq), respectivamente. Esta substância foi identificada como eritravina, um alcalóide eritrínico que não havia ainda sido isolado de EM (figura 4).

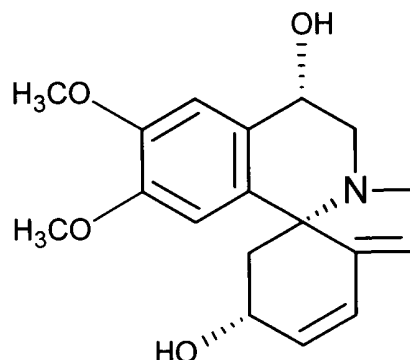
Abaixo encontra-se representada a estrutura química do alcalóide eritravina, isolado a partir do extrato bruto das flores de EM.



### 5 1.3) 11-hidroxi-eritravina (11-OH-eritravina)

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a 11-OH-eritravina (tabela 2), de forma semelhante à eritravina, também não foi observado sinal de hidrogênios de metoxila na posição C-3, mas somente um multiplete em  $\delta$  4.5 referente a um substituinte oxigenado, atribuído à posição C-3. Da mesma forma como observado para a eritrartina, os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , revelaram deslocamentos químicos em  $\delta$  4.74 (t) e  $\delta$  63.69, 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).

Abaixo encontra-se representada a estrutura química do alcalóide 11-OH-eritravina, isolado a partir do extrato bruto das flores de EM.



## 2) Farmacologia

### Extrato Bruto

#### 2.1) Labirinto em T elevado

5 Como demonstrado na tabela 3, o tratamento agudo com o extrato bruto padronizado de EM prejudicou o desempenho dos animais na esquiwa 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 ( $F(20,196) = 0,87$ ,  $p = 10$  0,628). A ANOVA de uma via mostrou que houve diferença significativa entre os grupos de tratamento na latência basal (LB) ( $F(5,49) = 2,34$ ;  $p = 0,056$ ), esquiwa 1 (E1) ( $F(5,49) = 3,97$ ;  $p = 0,004$ ), esquiwa 2 (E2) ( $F(5,49) = 3,75$ ;  $p = 0,005$ ); esquiwa 3 (E3) ( $F(5,49) = 3,39$ ;  $p = 0,01$ ) e esquiwa 4 (E4) ( $F(5,49) = 2,62$ ;  $p = 0,03$ ).

15 Na tabela 3 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 ( $F(5,49) = 3,48$ ;  $p = 0,009$ ). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que esta diferença era 20 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 (tabela 3), quando comparado ao grupo controle.

**Tabela 3** – Efeito (média + EPM) do tratamento agudo com o extrato 25 bruto de EM em camundongos submetidos ao teste do labirinto em T elevado ( $n = 9-10$ ).

Tratamentos	Esquiva Inibitória					Fuga
	LB	E1	E2	E3	E4	
SALINA	54,4±5,8	64,4±18,2	148,6±33,3	205,8±37,5	216,9±30,6	20,6±3,3
DZP 2 mg/kg	25,4±4,1	19,1±4,0*	25,3±7,0*	59,8±30,9*	91,3±40,3*	28,4±7,1
EM 50 mg/kg	41,7±11,8	120,5±45,1	120,6±41,1	153,4±35,9	209,3±36,8	25,4±9,7
EM 100 mg/kg	42,4±17,7	57,7±20,72	76,1±34,1*	126,2±45,6	138,5±43,6	32,1±19,3
EM 200 mg/kg	23,4±7,5	16,8±2,3*	52,1±31,1*	62,2±26,4*	142,1±46,8	17,6±4,5
EM 400 mg/kg	26,4±5,1	45, ±21,3	55,0±18,8*	130,8±29,9	131,2±35,4	6,7±1,1*

\*  $p < 0,05$ , Teste de Duncan.

## 2.2) 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 (tabela 4).

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 ( $F(5,49) = 1,90$ ;  $p < 0,11$ ).

10

**Tabela 4** – Efeito (média + EPM) do tratamento agudo com o extrato bruto de EM sobre atividade locomotora dos camundongos na arena ( $n = 9-10$ ).

Tratamentos	Cruzamentos	Levantamentos
SALINA	159,0±14,8	32,5±3,7
DZP 2 mg/kg	167,4±23,6	27,33±2,3
EM 50 mg/kg	178,8±8,7	40,4±3,1
EM 100 mg/kg	166,1±4,4	37,8±2,5
EM 200 mg/kg	199,4±19,5	40,67±4,2
EM 400 mg/kg	167,3±18,3	38,4±5,37

## 15 3) Fração Purificada - rica em alcalóides Eritrínicos (F2)

### 3.1) Labirinto em T elevado

O tratamento agudo com a F2 prejudicou a aquisição da esqui-  
 va inibitória do braço aberto do labirinto em T elevado, como demonstrado na  
 tabela 5. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do tratamento  
 ( $F(4,40) = 7,00$ ;  $p < 0,0001$ ) e das tentativas ( $F(4,160) = 11,18$ ;  $p < 0,0001$ ),  
 5 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  $F(6,69) = 2,7$ ;  $p = 0,02$ ), 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  
 ( $F(6,69) = 7,83$ ;  $p < 0,0001$ ). A diferença entre os grupos de acordo com o teste  
 10 *post hoc* de Duncan pode ser observada na tabela 5.

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 (tabela 5).

15 **Tabela 5** – Efeito (média + EPM) do tratamento agudo com a F2 em  
 camundongos submetidos ao teste do labirinto em T elevado ( $n = 8-16$ ).

Tratamentos	Esquivas Inibitória					Fuga
	LB	E1	E2	E3	E4	
SALINA	32,5±5,9	37,5±7,4	58,1±6,5	148,1±25,7	206,7±26,1	22,1±4,6
DZP 2 mg/kg	25,6±5,9	11,4±1,4*	14,4±2,2*	22,3±4,9*	29,1±7,6*	27,1±4,6
F2 3 mg/kg	21,7±3,2	32,0±13,2	18,5±2,12*	109,3±34,9	91,0±26,7*	20,1±4,1
F2 6 mg/kg	26,5±6,2	24,5±16,2	23,1±2,1*	45,3±14,0*	90,7±34,4*	18,0±2,9
F2 10 mg/kg	24,6±4,3	29,5±7,9	26,1±6,7*	44,5±12,2*	74,1±29,2*	23,8±6,8
F2 17 mg/kg	13,3±2,4	14,3±2,3*	25,5±11,2*	59,5±22,7*	69,6±18,2*	23,8±7,5
F2 30 mg/kg	56,1±21,8	65,0±34,0	78,6±38,7*	85,1±35,6*	121,2±41,2	30,1±8,4

\*  $p < 0,05$ , Teste de Duncan.

### 3.2) Atividade locomotora - Arena

20 A atividade locomotora dos animais medida na arena não foi alterada  
 pelo tratamento agudo com nenhuma das doses da F2 (tabela 6).

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 ( $F(4,40) = 0,81$ ;  $p = 0,52$ ).

- 5 **Tabela 6** – Efeito (média + EPM) do tratamento agudo com a fração purificada rica em alcalóides (F2) sobre atividade locomotora dos camundongos na arena (n = 8-16).

Tratamentos	Cruzamentos	Levantamentos
SALINA	173,75±19,0	27,25±4,0
DZP 2 mg/kg	169,11±33,2	21,11±6,7
F2 3 mg/kg	164,54±12,5	31,18±4,5
F2 6 mg/kg	116,0±16,8	21,5±4,1
F2 10 mg/kg	145,00±9,8	31,11±3,5
F2 17 mg/kg	146,22±25,1	22,5±5,5
F2 30 mg/kg	161,00±16,4	26,00±2,8

### Novos Resultados com Alcalóides Isolados

#### 10 1) Eritravina

Os resultados obtidos com a Eritravina em camundongos submetidos ao modelo da transição claro escuro estão demonstrados na tabela 7.

- 15 A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento na medida de tempo gasto no compartimento iluminado. ( $F(3,39) = 4.27$ ;  $P = 0.01$ ). 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 ( $F(3,39) = 1.13$ ;  $P = 0.34$ ).
- 20

**Tabela 7** – Efeito (média + EPM) do tratamento agudo com a eritravina em camundongos submetidos ao modelo da transição claro escuro (n = 10-12).

Tratamentos	Tempo gasto no compartimento iluminado	Número de transições entre os dois compartimentos
SALINA	69,67±14,51	14,69±2,73
DZP (2 mg/kg)	144,20±17,52*	20,10±2,93
ERI (3 mg/kg)	115,40±18,58*	19,70±2,96
ERI (10 mg/kg)	112,00±10,95*	19,80±1,32

\* p < 0,05 versus Salina (Teste *post hoc* de Duncan)

## 2) 11-OH-ERITRAVINA

Na tabela 8 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 ( $F(3,38) = 3.14$ ;  $P < 0.05$ ) e também no número de transições entre os dois compartimentos ( $F(3,38) = 3.36$ ;  $P < 0.05$ ). O teste *post hoc* de Duncan revelou que a 11-hidroxi-eritravina, na dose de 10 mg/kg e o DZP 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 ( $P < 0.05$ ).

15

**Tabela 8** – Efeito (média + EPM) do tratamento agudo com a 11-hidroxi-eritravina em camundongos submetidos ao modelo da transição claro escuro (n = 8-10).

Tratamentos	Tempo gasto no compartimento iluminado	Número de transições entre os dois compartimentos
SALINA	72,33±11,27	15,58±2,48
DZP (2 mg/kg)	130,00±16,76*	13,92±1,34
11-OH (3 mg/kg)	98,67±13,35	22,67±2,66*
11-OH (10 mg/kg)	127,22±21,83*	14,00±1,93

\* p < 0,05 versus Salina (Teste *post hoc* de Duncan)

20

### 3) ERITRARTINA

Os efeitos obtidos com a eritratina no modelo de transição claro-escuro podem ser observados pelos dados apresentados na tabela 9.

A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo na medida de tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado ( $F(3,49) = 3.66$ ;  $P < 0.01$ ). 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, entretanto, não mostrou efeito significativo do tratamento na medida do número de transições entre os dois compartimentos do modelo ( $F(3,49) = 1.19$ ;  $P < 0.31$ ).

**Tabela 9** – Efeito (média + EPM) do tratamento agudo com a eritratina em camundongos submetidos ao modelo da transição claro escuro (n = 8-9).

Tratamentos	Tempo gasto no compartimento iluminado	Número de transições entre os dois compartimentos
SALINA	70,59±6,48	16,65±1,67
DZP (2 mg/kg)	140,67±18,59*	17,42±2,40
ERIT (3 mg/kg)	67,67±8,33	13,00±1,56
ERIT (10 mg/kg)	83,42±14,17	14,25±1,59

\*p < 0,05 versus Salina (Teste *post hoc* de Duncan)

15

Foram isolados a partir do extrato hidroalcoólico bruto de *Erythrina mulungu* três alcalóides eritrínicos, a eritratina, a eritravina e a 11-OH-eritravina. Previamente, Sarragioto e colaboradores (1981) já haviam reportado a presença da eritratina, da N-óxido-eritratina, da erisotrina e da N-óxido-erisotrina, no extrato metanólico bruto de *E. mulungu*. No entanto, por meio do teste bidimensional de gHMQC, os valores atribuídos às constantes de acoplamento dos carbonos C-1 e C-2 foram corrigidos pelo presente trabalho.

20

A Eritravina já havia sido isolada anteriormente do extrato das sementes de *E. folkersii* (MILLINGTON *et al.*, 1973) e de *E. cochleata* (CHAWLA *et al.*,

1985). Pela primeira vez na literatura está sendo reportado o isolamento da 11-OH-eritravina.

Os resultados da presente invenção mostram que a fração purificada rica em alcalóides de *E. mulungu* apresentam efeito ansiolítico no modelo animal de ansiedade do labirinto em T elevado. Foi observado efeito ansiolítico do extrato bruto de *E. mulungu* tanto na esquiiva inibitória quanto na fuga do braço aberto do labirinto em T elevado. As doses de 100, 200 e 400 mg/kg administradas agudamente prejudicaram a aquisição da esquiiva inibitória dos braços abertos. Estes resultados confirmam evidências recentes que demonstraram efeito ansiolítico do extrato de *E. mulungu*, também com a dose de 200 mg/kg, na medida de esquiiva no labirinto em T para ratos (ONUSIC *et al.*, 2002). Neste mesmo trabalho, o efeito ansiolítico do extrato de *E. mulungu* também foi relatado com o modelo da transição claro-escuro (ONUSIC *et al.*, 2002). Foi observado que as doses de 200 e 400 mg/kg, quando administradas agudamente em ratos, aumentaram o número de transições entre os dois compartimentos do modelo e o tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado.

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 (LADER, 1998; DAVIDSON JR., 2001; RICKELS *et al.*, 2001), apresentam efeito ansiolítico na medida de esquiiva 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), alguns autores sugerem que estes testes apresentam validade de predição para o estudo da ansiedade generalizada (GRAEFF *et al.*, 1993; VIANA *et al.*, 1994; GRAEFF *et al.*, 1998; GRAEFF e ZANGROSSI, 2002; BOURIN e HASCÖET, 2003).

Os resultados obtidos com a F2, uma fração purificada rica em alcalóides eritrínicos como substâncias majoritárias, demonstraram 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 à droga padrão utilizada, o diazepam, indicando um efeito ansiolítico. Estes resultados reforçam a conclusão de que o efeito ansiolítico observado com o extrato bruto está relacionado com a presença de alcalóides eritrínicos em sua composição. Isto pôde ser confirmado com os testes realizados com os alcalóides isolados nos experimentos realizados com o modelo da transição claro-escuro.

O teste da transição claro-escuro, um modelo animal de ansiedade clássica para o estudo de drogas gabaérgicas e serotoninérgicas, foi utilizado para a avaliação do efeito ansiolítico da eritratina, eritravina e 11-OH-eritravina.

Foi observado efeito ansiolítico do extrato bruto padronizado (100 e 200 mg/kg) e dos alcalóides eritravina (3 e 10 mg/kg) e 11-hidroxi-eritravina (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 reportados recentemente (ONUSIC *et al.*, 2002). Foi observado que as doses de 200 e 400 mg/kg, quando administradas agudamente em ratos, aumentaram o número de transições entre os dois compartimentos do modelo e o tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado.

Na presente invenção foi ainda observado que a 11-hidroxi-eritravina, administrada na menor dose (3 mg/kg), aumentou o número de transições entre os dois compartimentos do modelo. Este aumento das transições pode ser considerado como um efeito ansiolítico, resultado da desinibição comportamental, e não como um efeito estimulante da atividade dos animais, uma vez que não houve um aumento desta resposta no teste da atividade locomotora na arena. Pode-se concluir, portanto, que:

- a presente invenção descreveu novos resultados obtidos com o teste do labirinto em T elevado, os quais demonstraram o efeito ansiolítico tanto do extrato hidroalcoólico de *Erythrina Mulungu* (EM) (100 - 400 mg/kg) como dos

alcalóides dele isolados, i.e., 11-OH-eritravina, eritravina e eritartina (3 e 10 mg/kg) quando administrados via oral (v.o);

- ficou demonstrado com os resultados aqui descritos - obtidos pelo teste da arena - que o EM e as substâncias testadas não alteraram a atividade locomotora dos animais;

- os resultados mostraram que um extrato bruto contendo, no mínimo, 0,1% de alcalóides eritrínicos totais e uma fração purificada (F2) contendo, no mínimo, 20% em alcalóides eritrínicos totais e 10% do alcalóide eritrínico eritravina, além de outros alcalóides em menores concentrações e outras substâncias polares e apolares, também apresentou efeito ansiolítico no LTE (3 - 30 mg/kg; v.o), sem alterar a atividade locomotora dos camundongos;

- os resultados obtidos com o modelo da transição claro-escuro, um clássico instrumento de *screening* farmacológico *in vivo*, demonstraram que a 11-OH-eritravina e a eritravina apresentaram efeito ansiolítico quando administrados v.o nas doses de 3 e 10 mg/kg;

- teste piloto de toxicidade aguda (7 dias, v.o) demonstrou que o extrato bruto não causou a morte de camundongos machos ou fêmeas com as doses utilizadas (200 - 3600 mg/kg), mostrando-se portanto de baixa toxicidade.

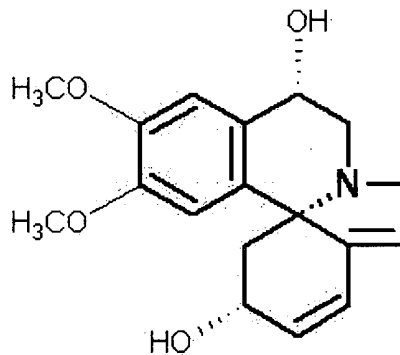
Desta forma, os dados do presente documento corroboram resultados anteriores mostrando que os alcalóides isolados de *Erythrina mulungu*, i.e., 11-OH-eritravina, eritravina e eritartina são os principais ativos relacionados ao efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico e mantêm esta atividade mesmo quando administrados em extrato bruto ou fração purificada (F2), o que explica a ampla utilização popular desta planta como "calmante", além de proporcionar a preparação de composições farmacêuticas padronizadas e de ação farmacológica adequada aos requerimentos de terapias específicas, sem com isso enfrentar os problemas comuns ao uso da planta *in natura*. Além disso, pode-se dizer que o efeito ansiolítico observado com o extrato bruto em estudos anteriores é resultado da presença de alcalóides eritrínicos em sua constituição, o que pode ser observado tanto com os testes feitos com os alcalóides isolados quanto com a fração purificada rica em alcalóides.

**Reivindicações**

1. Uso, na modulação dos sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico de vertebrados, de um extrato bruto vegetal padronizado caracterizado por compreender:

5 - pelo menos, 0,1% de alcalóides eritrínicos totais; sendo uma fração purificada contendo, no mínimo, 20% em alcalóides eritrínicos totais; e  
 - pelo menos, 10% do alcalóide eritrínico eritravina, ou seus isósteros, sais, derivados e/ou solvatos farmacologicamente aceitáveis dos  
 10 mesmos.

2. Uso, na modulação dos sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico de vertebrados, da substância ativa caracterizada por apresentar fórmula geral:



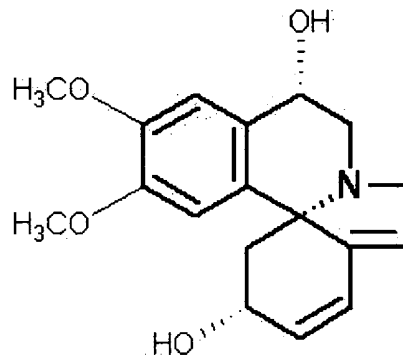
15 ou seus isósteros, sais, derivados e/ou solvatos farmacologicamente aceitáveis dos mesmos.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por a referida substância ser aplicada como ansiolítico.

4. Composição farmacêutica para o tratamento de distúrbios associados a disfunções do sistema colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico caracterizada por compreender:

- 5 - pelo menos, 0,1% de alcalóides eritrínicos totais, sendo uma fração purificada contendo, no mínimo, 20% em alcalóides eritrínicos totais; e
- pelo menos 10% do alcalóide eritrínico eritravina, ou seus isómeros, sais, derivados e/ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos

10 5. Composição farmacêutica para o tratamento de distúrbios associados a disfunções do sistema colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico caracterizada por compreender um veículo farmacêuticamente aceitável e pelo menos uma substância ativa de fórmula geral:



ou seus isómeros, sais, derivados e/ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos.

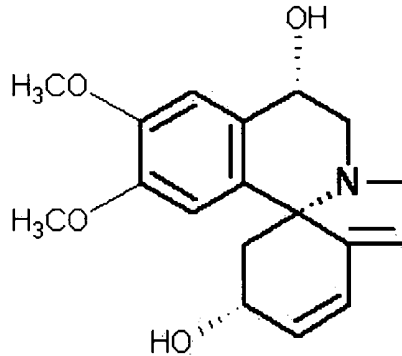
15 6. Composição, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizada por a referida substância ser aplicada como ansiolítico.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por adicionalmente compreender eritratina e/ou eritravina.

20 8. Composição, de acordo com as reivindicações 4, 5 ou 6 caracterizada por compreender extrato hidroalcoólico de *Erythrina mulungu* contendo as referidas substâncias ativas.

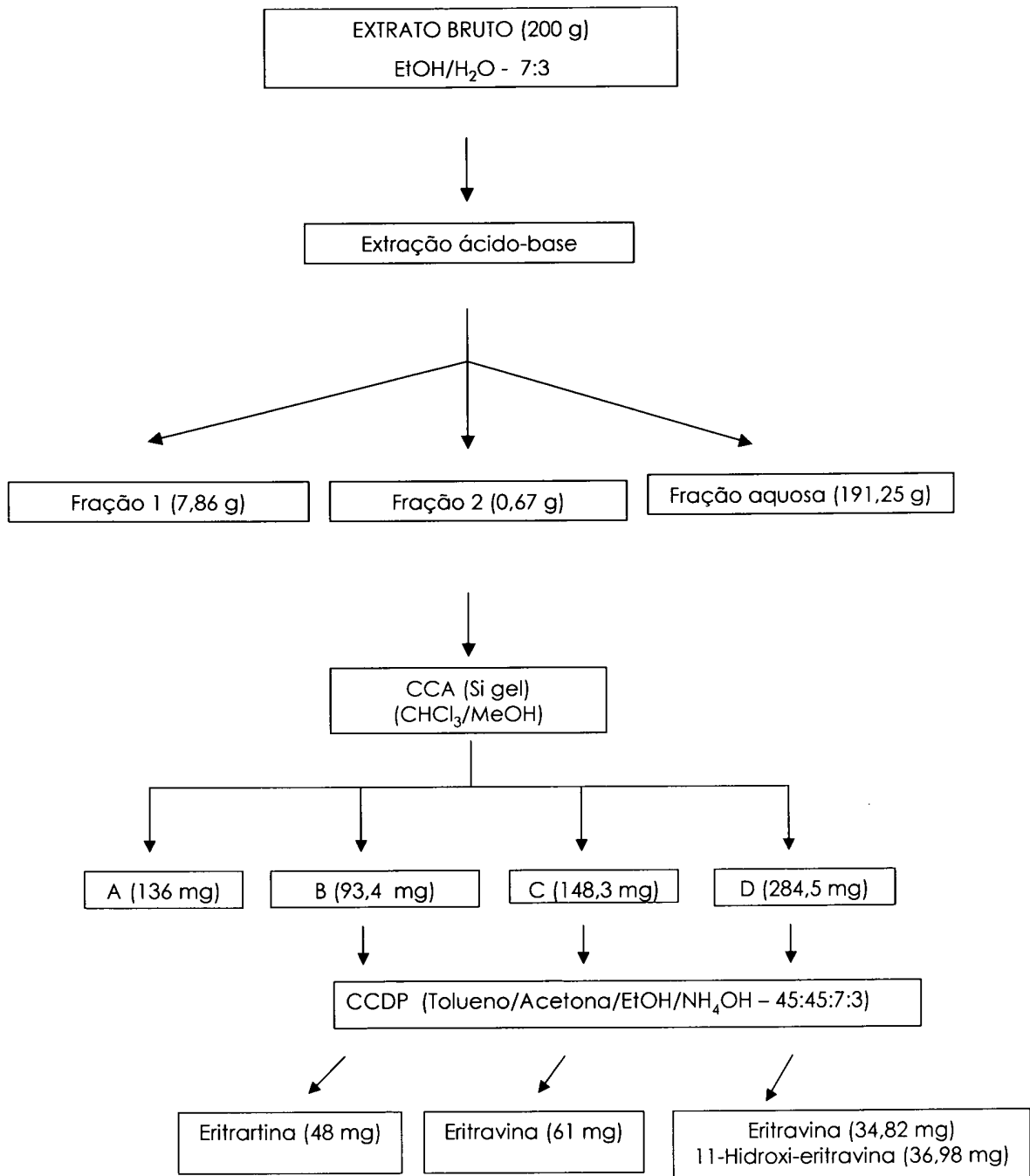
9. Processo de produção de medicamento para a modulação dos sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico de vertebrados caracterizado por compreender as etapas de:

- preparação de um veículo farmacologicamente aceitável; e
- incorporação, ao referido veículo, de pelo menos uma substância ativa de fórmula geral:



- 5 ou seus isómeros, sais, derivados e/ou solvatos farmacologicamente aceitáveis dos mesmos.
10. Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a referida substância ativa ser obtida por síntese química.
11. Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a substância ativa eritratina e/ou eritrovina ser adicionalmente incorporada ao referido veículo.
12. Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a referida substância ativa ser obtida a partir da extração hidroalcoólica de plantas do gênero *Erythrina*.
- 15 13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por a referida substância ativa ser obtida a partir da extração hidroalcoólica de plantas de *Erythrina mulungu*.

**FIGURA 1**



Resumo

- Uso, na modulação dos sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico de vertebrados, de um extrato bruto vegetal padronizado,**
- 5 Composição farmacêutica para o tratamento de distúrbios associados a disfunções do sistema colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico, e**
- Processo de produção de medicamento para a modulação dos sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico de vertebrados**
- 10 A presente invenção proporciona o uso moléculas para a modulação dos sistemas colinérgico e/ou serotoninérgico e/ou gabaérgico, sendo reveladas composições farmacêuticas compreendendo extrato brutos vegetais padronizados, ou 11-OH-eritrovina, eritrovina, eritratina, seus isómeros, sais, derivados e/ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos, ou ainda
- 15 combinações dos mesmos, opcionalmente contendo outros derivados eritrínicos, para o tratamento de distúrbios da ansiedade; processos de obtenção das referidas composições farmacêuticas também são revelados.