

**UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E TOXICOLOGIA**  
**APLICADA**



**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROFARMACOLÓGICOS,  
GENOTÓXICOS E ANTIOXIDANTES DO EXTRATO ETANÓLICO DAS  
FOLHAS DA *Erythrina falcata***

Dissertação para obtenção do título  
de Mestre em Genética e  
Toxicologia Aplicada.

**SIMONE ALMEIDA DIAS**

Orientador(a): Dr.(a) PATRÍCIA PEREIRA  
Co-orientador: Dr. ALEXANDRE DE BARROS FALCÃO FERRAZ

CANOAS  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

O presente estudo foi desenvolvido nas instalações da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA campus Canoas/RS, nos laboratórios de Farmacologia e Toxicologia (sala 404, prédio 19) sob a responsabilidade da Profa. Dra. Patrícia Pereira, Fitoquímica (sala 416, prédio 19) sob responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Ferraz e Prof. Dr. Marc Richter, Genética Toxicológica (Sala 401, prédio 19) sob a responsabilidade da Profa. Dra. Jaqueline Nascimento Picada. Esta dissertação está disposta na seguinte forma: primeiramente uma introdução onde está incluída uma fundamentação teórica, que descreve as principais características de espécies da família Fabaceae e gênero *Erythrina*. Em seguida no capítulo 1 encontra-se um artigo que contém os resultados e a metodologia desta pesquisa, tal artigo será submetido a publicação da revista *Ethnopharmacology*. Por fim, está presente uma discussão que aborda de maneira geral os resultados, conclusões e perspectivas geradas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

A minha mãe pela paciência, amor e apoio incondicional,

Ao meu pai pelo amor, compreensão e carinho.

Ao meu irmão pelo amor, entusiasmo e incentivo.

Ao meu amor Camilo pelo amor e pelos ensinamentos de paciência e tolerância.

A minha dinda e tio Paulo pela disponibilidade, carinho e amor.

A professora Patrícia, por toda a orientação, por tudo o que me ensinou, pela credibilidade e amizade.

Ao professores Alexandre e Marc, pela paciência e disponibilidade.

A professora Jaqueline, pelo super auxílio.

Aos estagiários da ULBRA, pela colaboração. Em especial a Aline, Juliana e a Karen. Tenho muito carinho por vocês.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta pesquisa.

Muito Obrigada.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS.....  | 4  |
| RESUMO.....  | 5  |
| ABSTRACT .....   | 6  |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 7  |
| 1.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DO GÊNERO <i>Erythrina</i> .....  | 9  |
| 1.2 ASPECTOS FITOQUÍMICOS.....   | 9  |
| 1.2.1 ALCALÓIDES .....   | 9  |
| 1.2.2 FLAVONÓIDES .....  | 11 |
| 1.3 USOS POPULARES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....  | 11 |
| 1.4 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS .....  | 13 |
| 1.5 MODELOS DE AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL .....  | 14 |
| 1.5.1. Avaliação da atividade ansiolítica/ansio gênica.....  | 14 |
| 1.5.2 Avaliação da Atividade Exploratória .....  | 15 |
| 1.5.3 Habituação .....   | 16 |
| 1.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA .....  | 17 |
| 1.6.1 Ensaio Cometa .....  | 17 |
| 1.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....  | 19 |
| 1.7.1 Teste a base de radical livre DPPH.....  | 20 |
| 1.7.2 Ensaio a base de xantina oxidase.....  | 20 |
| 2 OBJETIVOS .....  | 22 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....  | 22 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 22 |
| 3. CAPITULO I - Neuropharmacological, Genotoxic and Antioxidant Evaluation of<br><i>Erythrina falcata</i> leaves ethanolic extract in rats ..... | 23 |
| 4. DISCUSSÃO .....   | 56 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 64 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 65 |

## LISTA DE FIGURAS

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Figura 1</b> | Estrutura básica dos alcalóides eritrínicos.....  | 10 |
| <b>Figura 2</b> | Folhas, sementes e flores da <i>Erythrina falcata</i> .....   | 13 |
| <b>Figura 3</b> | Imagens representativas de células cometa, das classes 0 a 4.. .....  | 18 |
| <b>Figura 4</b> | Estrutura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). .....   | 20 |
| <b>Figura 5</b> | Esquema do ensaio de avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> utilizando o sistema a base da xantina oxidase ..... | 21 |

## RESUMO

O gênero *Erythrina* é utilizado pela medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças. *Erythrina falcata* é uma espécie nativa do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. É usada como ansiolítico, anestésico para a região bucal e para o alívio de reumatismos. O objetivo deste estudo foi realizar uma análise fitoquímica e investigar os efeitos da administração intraperitoneal em ratos do extrato etanólico de *E. falcata* (100, 300 e 500mg/kg) nas tarefas do labirinto em cruz elevado e habituação ao campo aberto, avaliar seus possíveis efeitos genotóxicos, usando o ensaio cometa e avaliar a atividade antioxidante usando os testes do radical livre DPPH e hipoxantina/xantina oxidase *in vitro*. A análise fitoquímica das folhas de *E. falcata* indicaram a presença de flavonóides, saponinas e alcalóides. A dose letal média (DL<sub>50</sub>) de *E. falcata* em ratos foi estimada em 3309,0 mg/kg e a partir destes resultados foram escolhidas as doses (100, 300 e 500 mg/kg) para avaliação comportamental. Os resultados mostraram que o extrato etanólico das folhas de *E. falcata* nas doses testadas foi capaz de diminuir o número de respostas de orientação e número de cruzamentos no teste de campo aberto, diminuindo a atividade exploratória e locomotora dos animais. No teste do labirinto em cruz elevada não foram encontrados resultados significativos, sugerindo que este extrato nas doses testadas não causou efeito ansiolítico nem ansiogênico nos animais. Através do teste cometa, o extrato de *E. falcata* não induziu dano ao DNA de células de sangue periférico e cérebro. Apresentou atividade antioxidante nos testes do radical livre DPPH e hipoxantina/xantina oxidase. Resumindo, nossos resultados demonstram que a espécie estudada foi capaz de afetar a locomoção e exploração em roedores, mostrou atividade antioxidante e ausência de danos ao DNA em células de sangue periférico e cérebro.

**Palavras-chave:** *Erythrina falcata*, análise fitoquímica, DL<sub>50</sub>, labirinto em cruz elevado, campo aberto, ensaio cometa, teste de DPPH, hipoxantina/xantina oxidase.

## ABSTRACT

In popular medicine, several *Erythrina* species have been utilized in the treatment of many diseases. *Erythrina falcata* is a native specie in Rio Grande do Sul state, Brazil. It is used to anxyolitic, anesthetic for the buccal region and for rheumatisms. The aim of the present study was to conduct a phytochemical screening and to investigate the effect in rats of intraperitoneal administration of *E. falcata* (100,300 and 500mg/kg) on elevated plus maze and open field tasks, the possible genotoxic using the comet assay and the antioxidant activity using the test of the free radical DPPH base and hipoxantine/xanthine oxidase in vitro assay of *Erythrina falcata* (100, 300 and 500mg/kg). The phytochemical analysis of *E. falcata* leaves revealed the presence of alkaloids, flavonoids and saponins. The LD<sub>50</sub> of *Erythrina falcata* in rats were estimated to be 3,309 mg/kg and leaving from these results were chosen the doses for behavioral evaluation. The results showed that *E. falcata* ethanolic extract in the tried doses was able to decrease the crossings orientation and number answers in the open field test decreasing the animals the animals exploratory activity and locomotive. In pluz maze test wasn't found significant results suggesting this extract in the tried doses didn't cause anxiolytic effect neither anxiogenic effect in the animals. Through the comet assay, it verified in the same doses *E. falcata* extract didn't induce damage to the cells peripheric blood and brain DNA. The extract of *E.falcata* introduced antioxidant activity in the tests of the free radical DPPH and hypoxanthine/xanthine oxidase. Summarizing, our study demonstrate that studied species was able to affect the locomotion and exploration in rodents, introduces antioxidant activity and damages absence to the DNA in peripheric blood and brain cells.

**Key-words:** *Erythrina falcata*, labirinto em cruz elevado, campo aberto, teste de DPPH, hipoxantine/xanthine oxidase.



## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas com finalidades terapêuticas há milhares de anos, dessa maneira, seus usos populares vêm sendo propagados de geração em geração e atualmente, encontram-se descritas em diversas farmacopéias. A partir do desenvolvimento da química orgânica, tornou-se possível obter substâncias puras através do isolamento de princípios ativos de plantas, entre elas, a digoxina e a morfina. A partir da década de 1980, foram desenvolvidos novos métodos de isolamento de substâncias ativas, tornando-se possível identificar substâncias em amostras complexas como os extratos vegetais, ressurgindo o interesse por compostos de origem vegetal que pudessem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Apesar da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, poucos estudos são realizados com o objetivo de comprovar sua eficácia e segurança. Além disso, muitas plantas são comercializadas somente com base no seu uso popular (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, sendo que já foram comprovadas ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grande possibilidade de futuramente vir a serem aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL e YUNES, 1998).

Muitas das plantas que estão sendo estudadas são capazes de atuar no comportamento, humor, pensamento e sensações e o entendimento de seus mecanismos de ação, segurança e eficácia, é um desafio para os pesquisadores (CARLINI, 2003).

Existem mais de 100 espécies de *Erythrina* (Fabaceae) distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Extratos obtidos com as folhas, hastes e raízes tem significado histórico devido ao seu uso para o tratamento de doenças pela medicina indígena, tais como tumores na pele, patologias inflamatórias (TALLA et al., 2003), como contraceptivo (ORIHUELA e ISHIYAMA, 2006), entre outras.

O gênero *Erythrina* é utilizado pela medicina tradicional para o tratamento de diversas patologias, principalmente, infecções microbianas (RUKASHAISIRIKUL et al., 2006), tratamento de infecções causadas pela malária (SAIDU et al., 2000), no tratamento dos sintomas da menopausa (TANEE et al., 2006), e também em patologias que afetam o sistema nervoso central devido aos efeitos tranqüilizantes que as plantas deste gênero vem comprovando possuir (ONUSIC et al, 2003).

Sabe-se que estas plantas são ricas em alcalóides e flavonóides como, pterocarpanos, flavonas e isoflavonas. Algumas atividades biológicas têm sido atribuídas aos flavonóides, tais como, antimicrobiana, anti-HIV, antibacteriana, antiinflamatória e antiespasmódica (RUKASHAISIRIKUL et al., 2006). Os isoflavonóides são responsáveis pela atividade estrogênica (TANEE et al., 2006) e, os alcalóides, apresentam efeitos anticonvulsivantes, hipnóticos, analgésicos, hipotensivos, e são capazes de diminuir a agressividade, semelhante aos fármacos benzodiazepínicos (RIBEIRO et al., 2006).

Estudos prévios mostraram que o extrato aquoso do caule de *E. falcata* apresenta propriedades contraceptivas em ratas (ORIHUELA e ISHIYAMA, 2006), e *E. variegata* já pode ser considerada uma alternativa natural de reposição hormonal no tratamento e prevenção da perda óssea pós-menopausa (ZHANG et al., 2007).

Pesquisas realizadas com o extrato aquoso de *E. velutina* demonstraram que esta espécie afeta o sistema nervoso central de forma dose-dependente, causando sedação, interferindo na memória e bloqueando ações neuromusculares (DANTAS, OLIVEIRA e BANDEIRA, 2004) e estudos com extrato hidroalcoólico de *E. mulungu*, utilizada popularmente como tranquilizante, constatou atividade ansiolítica semelhante ao diazepam (ONUSIC et al., 2003).

O extrato bruto obtido com as folhas de *E. velutina* demonstrou em pesquisas, apresentar efeito sobre as convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ), em modelo crônico de epilepsia (*kindling*), e sobre a atividade excitatória em fatias do hipocampo de ratos, sugerindo uma ação anticonvulsivante (MARCHIORO et al., 2005).

Considerando que o gênero *Erythrina*, através de vários estudos, vem demonstrando diversas atividades farmacológicas, torna-se importante avaliar as espécies deste gênero nativas do RS, na tentativa de se obter moléculas com ação sobre o SNC.

## 1.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DO GÊNERO *Erythrina*

O gênero *Erythrina* (família Fabaceae) é amplamente conhecido, ocorrendo nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo. Possui cerca de 110 espécies, das quais 70 são nativas da América (VASCONCELOS et al., 2004). O nome *Erythrina* vem do grego “erythros” que significa vermelho em alusão a cor das suas flores. O gênero *Erythrina* é empregado como plantas ornamentais, sombreadores de lavouras de café e cacau, e também fornece madeira (ORIHUELA e ISHYAMA, 2006).

No Brasil são encontradas oito espécies de *Erythrina*: *E. mulungu*, *E. velutina*, *E. crista-galli*, *E. poeppigiana*, *E. fusca*, *E. falcata*, *E. speciosa* e *E. verna* (LORENZI, 1992).

A planta *E. mulungu* ocorre principalmente na região oeste do estado de São Paulo e triângulo mineiro (LORENZI, 1992), *E. velutina* encontra-se na região semi-árida do norte do Brasil (RODRIGUES e CARVALHO, 2001) e a *E. falcata* está na região litorânea do sul do Brasil (ORIHUELA e ISHIYAMA, 2006).

## 1.2 ASPECTOS FITOQUÍMICOS

### 1.2.1 ALCALÓIDES

O interesse pelo estudo do gênero *Erythrina* teve início em 1877 com Dominguez e Altamiro, que descobriram a ação farmacológica do extrato das sementes da *E. americana*, semelhante aos efeitos da d-tubocurarina (substância extraída de *Chondodendron tomentosum*) (GARIN-GUILAR et al., 2000). A partir de então outros extratos de diferentes espécies de *Erythrina* passaram a ter suas propriedades fitoquímicas pesquisadas.

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

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

Após o isolamento de alfa-eritroidina e beta-eritroidina de *E. americana*, e as descobertas das suas atividades farmacológicas, houve grande interesse no estudo de outras espécies de *Erythrina*, resultando em novos isolamentos de alcalóides do esqueleto eritrínico (SARRAGIOTO, 1981).

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

Os alcalóides eritrínicos podem ser de três tipos. Os dienóides apresentam um sistema diênico nos anéis A e B (figura 1). Os alquenóides possuem uma dupla ligação no anel. Um terceiro grupo de alcalóides eritrínicos inclui: erisodienona, 3-desmetoxi eritradinona,  $\alpha$ -eritroidina e  $\beta$ -eritroidina. Também foram isolados de espécies de *Erythrina* alguns alcalóides que não apresentam o esqueleto eritrínico: orientalina, N-noorientalina, protosinomenina, N- norprotosinomenina, isoboldina, eribidina, scourelina, coreximina, hipaforina e colina (BOEKLHEIDE et al., 1953).

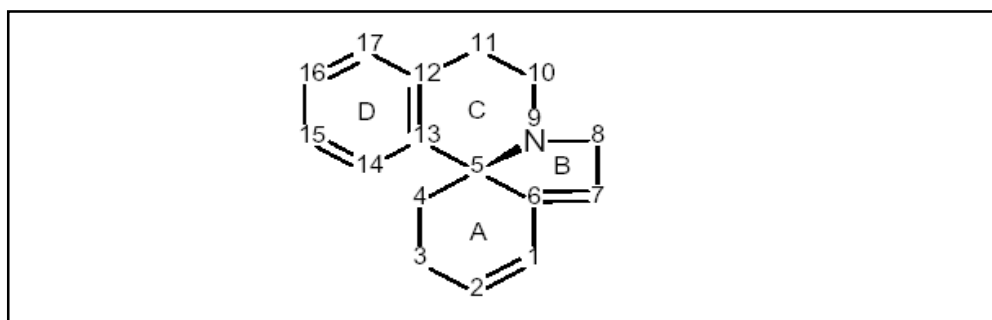


Figura 01 –Estrutura básica dos alcalóides eritrínicos.

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

### 1.2.2 FLAVONÓIDES

Outros estudos fitoquímicos têm demonstrado que o gênero *Erythrina* também é rico em flavonóides tais como: flavonas, isoflavonas, isoflavanonas e pterocarpanos (NKENGFACK et al., 2001). Seus isoflavonóides e flavonóides apresentam atividade bactericida e antifúngica, e também inibem a agregação plaquetária (NKENGFACK et al., 2000).

Nas últimas décadas, mais de cinquenta flavonóides foram isolados de várias partes de cerca de quinze espécies do gênero *Erythrina*, observa-se larga ocorrência da flavanonas preniladas e isoflavonas (NKENGFACK et al., 1994). Reporta-se o isolamento das seguintes isoflavonas: eritrinina A, B e C, osajina, alpinum isoflavona, oxiresveratrol estireno e diidroestilbeno, diidroxiresveratrol, warangalona, 5,7,4 -triidroxí-6,8- diprenilisoflavona, uma flavona (isobavachin), separados da casca de *E. variegata* (TELIKEPALLI et al., 1990).

O gênero *Erythrina* tem provado ser uma fonte em potencial de espécies contendo agentes antimicrobianos que pertencem a várias classes estruturais de flavonóides (TELIKEPALLI et al., 1990).

### 1.3 USOS POPULARES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

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

No Brasil são relacionadas cerca de oito espécies (EPAMIG,1993) sendo as duas principais *E. velutina*, originária do nordeste e *E. mulungu*, nativa do

sudeste (VASCONCELOS et al., 2004). A *E. velutina* é utilizada na medicina popular, sua casca é utilizada como sudorípara e calmante (RABELO et al., 2001) e também no tratamento de verminoses. Ao fruto seco da mesma planta, atribuí-se ação anestésica local, o infuso das cascas é empregado como calmante e sedativo de tosses e bronquites, bem como para tratamento de verminoses e hemorróidas. O decocto é utilizado para acelerar a maturação de abscessos gengivais (LORENZI e MATOS, 2002). Além destes usos, as plantas deste gênero, também parecem apresentar atividade sobre o SNC, uma vez que são consumidas popularmente como tranqüilizantes (ONUSIC et al., 2002). Um estudo prévio realizado com as folhas de *E. indica*, comprovou seu efeito sedativo (RATNASOORIYA e DHARMASIRI, 1999).

Outros representantes deste gênero demonstram atividades com interesse farmacêutico, como a *E. speciosa* que no Brasil é utilizada como analgésica, anti-inflamatória e bactericida (ONUSIC et al., 2002). A espécie *E. variegata* é utilizada na Índia, China e Indochina, onde sua casca é costuma ser usada como adstringente, anti-pirético, anti-séptico, tratamento de afecções do fígado e sedativo, e as folhas são utilizadas para o tratamento do trato gastrointestinal, diurética e para o alívio de dores nas articulações (DIAS FILHO et al., 2002) e no tratamento de epilepsia (TELIKEPALLI et al., 1990).

Em Camarões a *E. sigmoidea* é utilizada no tratamento de disenterias, asma, dores no estômago, infertilidade feminina e infecções microbianas (GHOSAL, DUTTA e BHATTACHARYA, 1972) e na bacia do rio Paraná, oeste do estado de São Paulo e triângulo mineiro a *E. mulungu* é utilizada como calmante e sedativo pela população (LORENZI e MATOS, 2002).

A atividade sobre o sistema serotoninérgico foi observada na *E. vespertilio*, afetando a atividade da adenosina di-fosfato (ADP) e induzindo agregação plaquetária e liberação de 5-HT (ROGER, GRICE e GRIFFITHS, 2001).

Foram analisados alguns alcalóides da casca *E. subumbrans* comprovando-se atividade anti-plasmódica, anti-micobacteriana e atividade citotóxica (RUKACHAISIRIKUL, 2007) também nas cascas da *E. addisoniae* foram atribuídos efeitos contra reumatismo, problemas hepáticos e até mesmo

contra alguns tipos de câncer (WATJEN, KULAWIK e SUCHOW-SCHNITKER, 2007).

Em relação à planta utilizada no presente estudo, a *E. falcata*, com seu nome popular de Corticeira-da-Serra, é usada popularmente na região litorânea do Rio Grande do Sul, mais especificamente na cidade de Osório como ansiolítico, analgésico para a região bucal e para reumatismos (XAVIER, 2006).

#### 1.4 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS

Árvore alta, de 10 a 30 metros de tronco reto, copa com folhas verde-escuras (figura 2). Sua casca apresenta alguns espinhos. Suas flores dão em cachos, de cor vermelho-alaranjado. O fruto é um legume marrom-escuro, levemente achatado (MARCUIZZO, 1998).

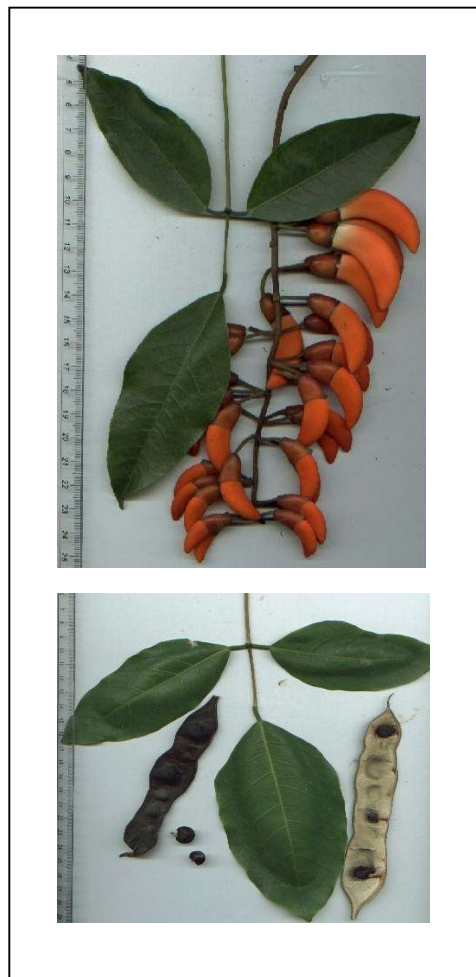


Figura 2 – Folhas, sementes e flores da *Erythrina falcata* – Disponível em <http://www.arvores.brasil.nom.br/eritrin/efalcata.htm>. Acesso realizado dia 07/10/2008.

## **1.5 MODELOS DE AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL**

Os modelos animais constituem um importante instrumento de investigação em pesquisa sobre os efeitos farmacológicos e os possíveis mecanismos de ação de novas drogas ou agentes terapêuticos (GRAEFF e ZANGROSSI, 2002).

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

De acordo com a natureza do estímulo que utilizam, os modelos animais de ansiedade podem ser classificados, segundo alguns autores (GRAEFF e ZANGROSSI, 2002) em dois tipos: os que utilizam estímulos neutros, que adquirem propriedades aversivas através de condicionamento, como os modelos baseados em aprendizagem associativa, e os baseados em estímulos inatamente aversivos, os chamados modelos etologicamente fundamentados, como o labirinto em cruz elevado e o labirinto em T elevado (GRAEFF, 1999).

### **1.5.1. Avaliação da atividade ansiolítica/ansiogênica**

O labirinto em cruz elevado (LCE) é provavelmente o modelo animal de ansiedade mais empregado atualmente (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). O comportamento exibido pelo animal durante o teste tem sido atribuído a aversão natural dos animais (ratos ou camundongos) a espaços abertos, representada pela esquiva dos braços abertos. Drogas ansiolíticas aumentam a exploração destas áreas sem alterarem a atividade motora dos animais (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). As medidas consideradas como representativas de ansiedade no LCE são as porcentagens de entradas e de tempo gasto pelos animais nos braços abertos do modelo (CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994 e



RODGERS, 1997). Como muitos compostos podem ter atividade sedativa ou estimulante, interferindo diretamente sobre a exploração dos braços do labirinto pelos animais, a frequência de entrada nos braços fechados pode ser utilizada para avaliar a atividade locomotora (CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994).

Com a administração de benzodiazepínicos (BZD's) e barbitúricos, é possível observar um aumento do número de entradas e de tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE o que indica um efeito ansiolítico (PELLOW et al., 1985). Por outro lado, tem sido proposto que o labirinto em cruz elevado não é um modelo capaz de detectar a atividade ansiolítica de compostos com atividade serotoninérgica (HANDLEY e MACBLANE, 1993).

Drogas ansiolíticas como a buspirona, um agonista de receptores do tipo 5HT-1A, e a ritanserina, um antagonista não seletivo de receptores 5HT, demonstraram em diferentes estudos, tanto efeito ansiolítico como ansiogênico, ou até ausência de efeitos (HANDLEY e MACBLANE, 1993). Devido a estes resultados contraditórios o LCE tem sido considerado um modelo misto de ansiedade (ZANGROSSI Jr. e GRAEFF, 1997).

### **1.5.2 Avaliação da Atividade Exploratória**

O modelo de teste comportamental em Campo Aberto (*Open Field*) analisa a atividade locomotora e exploratória dos animais. Este modelo é utilizado para observar como o animal se comporta em amplo ambiente, medindo seu estado emocional (CRUZ, 1994) e determinar o efeito de fármacos sobre a performance motora dos animais, independente de atuarem em nível de sistema nervoso central ou periférico. O aparelho consiste em um campo aberto (caixa de madeira) com a superfície inferior (assoalho) de superfície de cor branca (50x50x30 cm), dividido em 12 quadrantes, de igual área, com um dos lados da caixa de vidro, que permitindo visualizar o comportamento dos animais durante os cinco minutos do teste, cujas dimensões podem variar de acordo com o tamanho do animal estudado. O teste é simples de ser realizado, consiste na colocação do animal em estudo no referido aparelho e observação do tipo de movimento, distância percorrida, tempo despendido, tentativas de levantar-se (*rearings*),

tentativas de fugas, número de cruzamentos tempo de imobilização e latência. Outros parâmetros podem ainda ser avaliados, tais como, a área visitada do campo, interação com estímulos, números de vezes de autolimpeza (*groomings*), ato de cheirar, coçar, escavar, ranger os dentes, frequência cardíaca e respiratória (PEREIRA et al., 2006), e estas contagens de movimentos são utilizadas como medida de locomoção, exploração, motivação e ansiedade (MACHADO et al., 2006).

### **1.5.3 Habituação**

A habituação a um novo ambiente é uma das mais elementares tarefas de aprendizagem não associativa e não aversiva (ROESLER et al., 2000), ou seja, resulta da simples repetição de um estímulo, sem associá-lo com nenhum outro.

Para testar a memória de habituação ao campo aberto, 24 horas depois, os animais foram novamente colocados no campo para livre exploração, por outros 5 minutos e os mesmos parâmetros foram mensurados para avaliar a habituação do animal ao ambiente (PEREIRA et al., 2006).

Os laboratórios dedicados à avaliação da memória, entre os anos 60 e 80, empenharam-se na modulação da memória, ou seja, o efeito das drogas, hormônios, neurotransmissores e neuro-moduladores na consolidação dos processos de memória. Foi rapidamente compreendido que substâncias moduladoras podiam influenciar os mecanismos básicos do processamento da memória. Dessa forma, o estudo da modulação, foi considerado, uma abordagem útil, muito embora indireta, para a investigação dos mecanismos da formação da memória (QUEVEDO et al., 2003)

A memória é uma função do sistema nervoso e compreende três processos distintos: a aquisição, consolidação e evocação. Durante os primeiros minutos ou horas após a aquisição, ela é suscetível à interferência de outras memórias, de drogas ou tratamentos (IZQUIERDO, 2002). A aquisição também é denominada aprendizado. A consolidação depende de uma série de processos metabólicos compreendendo diversas fases e requer de três e oito horas para ser consolidada (IZQUIERDO e MEDINA, 1997). A evocação é fortemente modulada

pelas vias dopaminérgicas, noradrenérgicas, serotoninérgicas e colinérgicas. Em geral, os hormônios do estresse melhoram a evocação, à exceção de glicocorticóides que a inibem até mesmo em doses baixas (IZQUIERDO, 2002). Quanto a duração, a memória pode ser classificada em memória de trabalho, que dura de poucos segundos a minutos e não forma arquivos duradouros. Gerencia as informações do cérebro decidindo quais as memórias vamos formar ou evocar (LIU e MARTIN, 2001).

## **1.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA**

### **1.6.1 Ensaio Cometa**

O Ensaio Cometa, ou “Single Cell Gel Electrophoresis”, trata-se de um importante ensaio para a avaliação de danos que uma determinada substância pode causar ao DNA (FAIRBAIRN, OLIVE e O’NEILL, 1995; LIU e MARTIN, 2001; SMITH et al., 2008). Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo ensaio cometa são passíveis de correção. Uma vez que danos no DNA são frequentemente célula e tecido específicos, esta metodologia, que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada sub-população celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (TICE et al., 1994). A metodologia baseia-se fundamentalmente na lise celular, relaxamento do DNA e eletroforese, sendo possível observar, após a coloração, os fragmentos de DNA oriundos da quebra causada pelo agente xenobiótico. A eletroforese proporciona a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebra para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são consideradas normais, sem dano detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas, são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples. O tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado, mas é de consenso que a simples visualização do “cometa” já significa que danos estão

presentes no DNA, podendo ser quebras de fitas simples, duplas, “crosslinks”, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis (TICE et al., 2000).

Deve se ter em mente que não existe célula sem dano no DNA, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno de 1000 lesões diárias no DNA/célula. O que se faz, rotineiramente, é modular as condições técnicas (tempo de relaxamento e eletroforese) para que um mínimo de DNA migre da cabeça para a cauda do cometa (TICE et al., 1994).

A identificação do dano no DNA pode ser feita por diferentes maneiras, como por exemplo, medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular de medidas, ou ainda classificar visualmente conforme mostra a figura 3, em diferentes níveis de dano, as células analisadas, podendo-se obter um valor arbitrário que expresse o dano geral sofrido por uma população de células (BOEIRA et al., 2001).

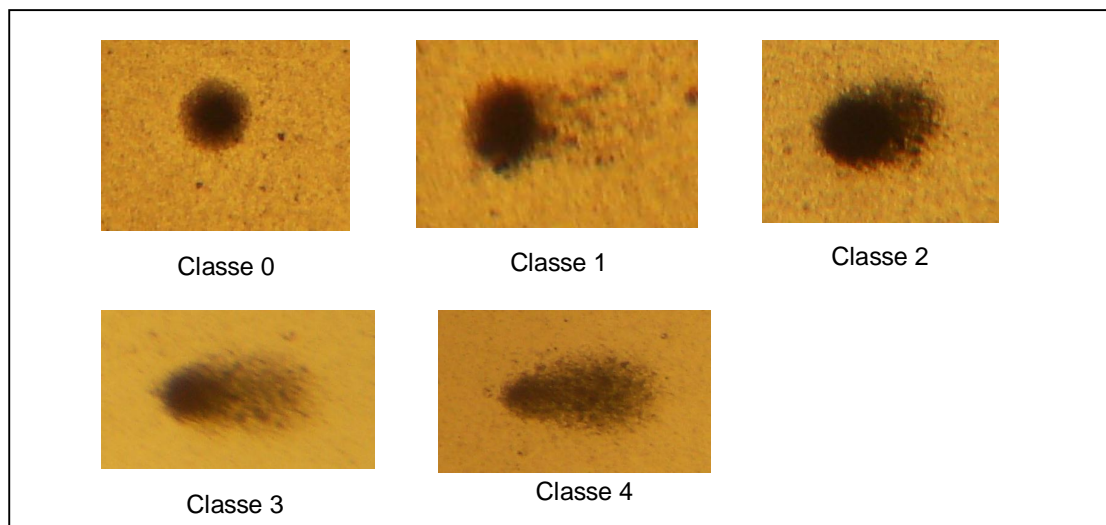


Figura 3 - Imagens representativas de células cometa, das classes 0 a 4. (PICADA et al.2003).

## 1.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O papel de espécies ativas de oxigênio (EAO) e de outros radicais livres no dano de tecidos em várias doenças humanas é cada vez mais estudado e conhecido (HARTMANN et al., 2003). Normalmente, os radicais livres são formados pela exposição a radiações ionizantes e luz ultravioleta (UV) do sol. Além deste fator, exposições a certos pesticidas, drogas, ozônio, fumaça de cigarros e vários outros poluentes são também considerados fatores responsáveis pela geração de EAO's (NAKAYAMA et al., 1983). As mais importantes classes de moléculas que compõem uma célula, como as proteínas, DNA, carboidratos e lipídeos são vulneráveis ao dano oxidativo por radicais livres. Os radicais livres provocam graves danos nas moléculas de DNA, que podem resultar em mutações e posteriormente a formação de células tumorais (HALLIWEL, 1991). As EAO's possuem papel muito importante na patologia de muitas doenças, existindo portanto um grande interesse no desenvolvimento de antioxidantes mais eficientes, que possam proteger as células contra dano oxidativo. Antioxidantes naturais, contidos nas plantas que fazem parte da dieta alimentar, bem como em outras plantas, são conhecidos por prevenir danos oxidativos induzidos por radicais livres, e assim são considerados importantíssimos na prevenção destas doenças.

Os flavonóides são compostos polifenólicos encontrados muito frequentemente nas plantas e constituem uma das mais importantes classes químicas de compostos naturais com atividade biológica. Estes compostos têm apresentado propriedades antioxidantes muito potentes, devido a sua elevada capacidade de capturar radicais livres (BORS et al., 1990). Além disto, possuem também outras propriedades farmacológicas, como atividade antibacteriana, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antialérgica, antiulcerogênica e antiviral (MIDDLETON et al., 1994). Muitos estudos sobre a ação dos flavonóides como agentes antioxidantes vêm sendo desenvolvidos, mostrando que estes compostos derivados de plantas apresentam ser promissores no tratamento de várias doenças relacionadas a estresse oxidativo. A flora brasileira, rica em sua

diversidade de espécies, representa um enorme estoque de novas substâncias que podem vir a ser agentes antioxidantes potenciais (RICE et al., 1996).

### 1.7.1 Teste a base de radical livre DPPH

Um teste antioxidante *in vitro*, simples de se realizar, é a avaliação das propriedades antioxidantes de extratos ou compostos puros e/ou purificados frente ao método do radical livre 2,2 difenil – 1 – picrilidrazila (DPPH), conforme mostra figura 4.

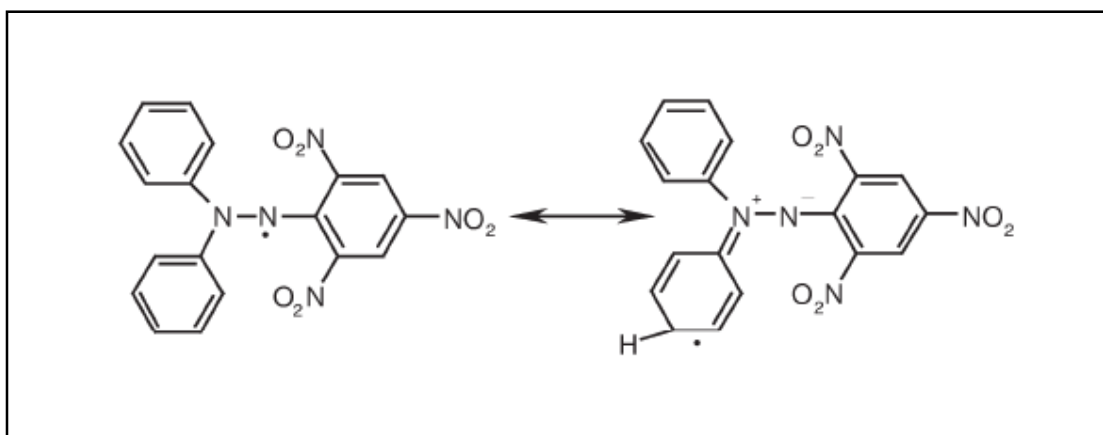


Figura 4: Estrutura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). (SOARES. et al.2003).

O teste baseia-se na capacidade do antioxidante em doar hidrogênio para o DPPH provocando a varredura deste radical livre e modificando a coloração da solução. Os resultados obtidos frente ao método do radical livre DPPH permitem fazer uma comparação do potencial antioxidante entre o material a ser analisado em relação a um padrão (SOARES et al., 2003).

### 1.7.2 Ensaio a base de xantina oxidase

Durante o processo de hidroxilação da hipoxantina em xantina e depois em ácido úrico (devido à presença da enzima xantina oxidase) são produzidos também o íon superóxido a partir do oxigênio e peróxido de hidrogênio a partir de água. Conforme mostra a figura 5, na presença de Fe (III) e de EDTA, o íon

superóxido é oxidado a oxigênio molecular, o que reduz o Fe (III) em Fe II. A presença de FeII é necessária para a transformação, numa segunda reação, do peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila, são muito reativos, a metodologia para quantificação dos radicais hidroxila produzidos no teste é baseada na reação de derivatização dos radicais hidroxila com o ácido salicílico. Desta maneira, são formados dois compostos estáveis: 2,3- e 2,5-dihidroxi-ácido-benzóico (2,3-DHBA e 2,5-DHBA), fáceis de serem medidos via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (OWEN et al,1996).

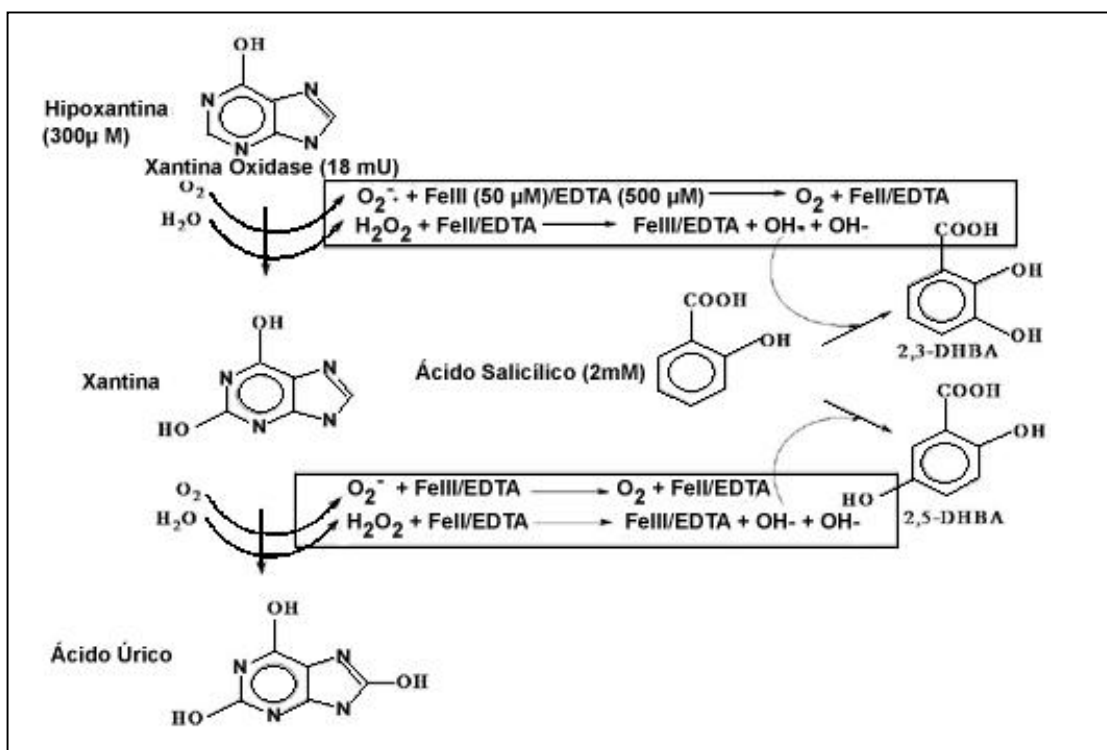


Figura 5 Esquema do ensaio para medir atividades antioxidantes *in vitro* utilizando o sistema à base da xantina oxidase (OWEN et al., 1996).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral realizar uma análise fitoquímica, avaliar os efeitos neurofarmacológicos, genotóxicos e antioxidantes das folhas de *E. falcata* em ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar triagem fitoquímica das folhas de *E. falcata*;
- Avaliar o extrato etanólico das folhas de *E. falcata* quanto aos seus efeitos neurofarmacológicos em ratos (atividade locomotora e ansiolítica/ansiogênica);
- Verificar o potencial genotóxico do extrato bruto etanólico das folhas de *E. falcata* através do ensaio cometa alcalino *in vivo* em células de sangue periférico e cérebro dos animais tratados e controles;
- Verificar o potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas de *E. falcata* através dos testes com DPPH e xantina oxidase.



**3. CAPITULO I - Neuropharmacological, Genotoxic and Antioxidant Evaluation of *Erythrina falcata* leaves ethanolic extract in rats**

Este artigo será submetido á revista Journal of Ethnopharmacology

Neuropharmacological, Genotoxic and Antioxidant Evaluation of *Erythrina falcata* in rats

Simone Almeida Dias, Aline Elisabeth de Oliveira, Juliane Garcia Semedo, Jaqueline Nascimento Picada, Alexandre de Barros Falcão Ferraz, Patrícia Pereira\*

Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Av. Farroupilha, 8001, Bairro São José, Canoas, RS, Brasil.

\*Corresponding author: E-mail address: patipere@yahoo.com.br

## Abstract

In popular medicine, several *Erythrina* species have been utilized in the treatment of many diseases. *Erythrina falcata* is a native species of Rio Grande do Sul state, Brazil. It is used as anxiolytic and as analgesic for the buccal region and rheumatism. The aim of the present study was to conduct a phytochemical screening and investigate (i) the effect of intraperitoneal administration on elevated plus maze and open field tasks, (ii) the possible genotoxic effect of intraperitoneal administration using the comet assay and (iii) the antioxidant activity using the test of the free radical DPPH base and Hypoxanthine/xanthine oxidase *in vitro* assay of *E. falcata* leaves ethanolic extract (100, 300 and 500 mg/kg). The LD<sub>50</sub> of *E. falcata* in rats was estimated to be 3,309 mg/kg. The results showed that *E. falcata* ethanolic extract in the doses tested was able to decrease the crossings' orientation and the number of answers in the open field test, which reveals that the animals' exploratory and locomotive activities decreased. There was no effect in the plus maze test, suggesting that extract in the doses tested did not show anxiolytic or anxiogenic effects in the animals. The comet assay did not indicate induction of DNA damage by administration of *E. falcata*, but it displayed a pronounced antioxidant capacity in a dose-dependent manner on the test of the free radical DPPH base and hypoxanthine/xanthine oxidase in the *in vitro* assay. The results demonstrated that the species studied was able to affect locomotion and exploration in rodents. The extract showed antioxidant activity.

**Keywords:** *Erythrina falcata*, plus maze, open field, comet assay, DPPH test, hypoxanthine/xanthine oxidase.

## 1. Introduction

There are more than 100 *Erythrina* species distributed in the tropical and subtropical regions of the world. Extracts obtained with the leaves, stems and roots have historical meaning due to their use in the native indians' medicine to treat diseases like skin tumors and inflammatory pathologies (TALLA et al., 2003) and to the application as contraceptives (ORIHUELA and ISHIYAMA, 2005), among others.

The genus is used in the traditional medicine to treat several diseases, mostly in microbial infections (RUKASHAISIRIKUL et al., 2006), infections caused by malaria (SAIDU et al., 2000). The species of the genus are also known for being used in folk as sedative, tranquilizer and antidiuretic agent (GARÍN-GUILAR et al. 2000).

These species are rich in alkaloids and flavonoids like pterocarpan, flavons and isoflavons. Some biological activities like antimicrobial, anti-HIV, antibacterial, anti-inflammatory and antispasmodic effects have been attributed to flavonoids (RUKASHAISIRIKUL et al., 2006). Isoflavonoids exert estrogenic action (TANEE et al., 2006) and alkaloids are able to reduce the aggressiveness, similarly to benzodiazepinic drugs (RIBEIRO et al., 2006).

Previous studies showed that *E. falcata* aqueous extract has contraceptive properties (ORIHUELA and ISHIYAMA, 2005). The "Corticeira da Serra", the species popular name, is largely used as anxiolytic drug and as analgesic for the buccal region and rheumatism by populations living in the coastal area of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, more specifically in the Osório city (XAVIER, 2006).

The aim of this study was to investigate the behavioral effect of ethanolic crude extract of *E. falcata* using the plus maze and open field tests. We have also

investigated genotoxic parameters of this species in peripheral blood and brain using the comet assay. In addition, the antioxidant activity using the test of the free radical DPPH base and hypoxanthine/xanthine oxidase *in vitro* assay with the same extract.

## 2. Material and Methods

### 2.1 *Animals*

Male Wistar rats (2-3 months of age; 200 – 250g) were used in this study. All animals were maintained in a controlled temperature environment. The rats were kept in cages with five animals maximum and under 12-h light/dark cycles. The animals were allowed free access to food and water. Minimum of nine rats were used for each treatment group. All procedures involving animals were conducted in accordance with the Ethics Committee, Universidade Luterana do Brasil and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH).

### 2.2 *Plant material*

*E. falcata* leaves were obtained from the coast area in the city of Osório, Rio Grande do Sul, Brazil. The plants were identified by the botanist Sérgio Bordignon of the Universidade Luterana do Brasil. The specimens were deposited in the herbarium of the same institution. The leaves of *E. falcata* were dried under the shade for several days and then macerated into fine powder.

### 2.3 *Preparation of extract*

Thirty grams of *E. falcata* leaves powder were treated with 300 mL EtOH at room temperature. After the extraction process, the solvent was filtered and the supernatant evaporated in a rotary evaporator at 40°C until dry.

*2.4. Acute toxicity study (LD<sub>50</sub>)* The acute toxicity experiment (LD<sub>50</sub>) was carried out as described by Navarro et al (2005) with minor modifications. The groups (N = 9-10 animals per group) received doses of 500, 1000, 1500 or 2000 mg/kg as intraperitoneal injections of plant extracts. The mortality of animals was noted for a 14-day period.

#### *2.5. Drugs and pharmacological procedures*

*E. falcata* were dissolved in 5% polysorbate 80 and saline. Thirty minutes prior to the behavior experiment, animals were given an intraperitoneal injection of saline, tween (5% polysorbate 80 solution), *E. falcata* 100, 300 or 500 mg/kg (volume of injection of the 0.1 mL/100g body weight). Doses were chosen based on LD<sub>50</sub> results. The animals were tested during the light exposure period and observed in a closed room poorly illuminated with red light.

#### *2.6. Phytochemical analysis*

The possible presence of alkaloids, anthraquinone, cardiac glycoside, coumarins, flavonoids, phenol compounds, saponins and tannins in the leaves were screened according to the procedure as described by Harborne (1984).

#### *2.7. Open field behavior and habituation*

Animals were exposed to a 40 X 50 X 60 cm open field divided into 12

identical white squares described by black lines. Animals were placed in the rear left square and allowed freedom to explore the environment for 5 minutes. Crossings of black lines and rearings performed and the time to start the locomotion were counted and used as measures of locomotion, exploration and motivation of the animals (PEREIRA et al., 2006).

The habituation test was conducted after 24 hours, when the same animals were again tested for open field behavior, for 5 minutes. Long-term retention of habituation to a novel environmental can be considered a type of learning. The decrease in the number of rearings performed between the first and the second exploration sessions was considered as a measure of habituation (VIANA et al., 2000).

### *2.8. Elevated plus-maze test*

The apparatus consists of a platform (10 X 10 cm), two open arms (50 X 10 cm) and two closed arms (50 X 10 X 40 cm), arranged in such a way that the two arms of each type are opposite to each other. The maze wall was 50-cm high, and the tests were conducted under dim red light. The animals received the injections 30 minutes before the test. They were then placed individually on the central platform of the plus-maze. During a 5-minute test period, the number of entries and the time spent in open and closed arms were recorded (PEREIRA et al., 2006).

### *2.9. Comet assay*

The alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay, a procedure for evaluating DNA lesions, involves the application of an electric current to cells, which results in the transport of DNA fragments into the nucleus (SILVA et al., 2000).

Animals were treated with an intraperitoneal dose of saline, vehicle, *E. falcata* (100, 300 or 500 mg/kg) and sacrificed by decapitation after 24 hours. The forebrain from each animal was placed in 0.5 mL of cold phosphate-buffered saline (PBS) and minced into fine pieces in order to obtain a cellular suspension. Cell suspensions from brain and peripheral blood (5  $\mu$ L) were embedded in 95  $\mu$ L of 0.75% low melting point agarose (Gibco BRL) and spread on agarose-precoated microscope slides. After solidification, slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0), with freshly added 1% Triton X-100 (Sigma) and 10% DMSO for 48 h at 4°C. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 minutes, at 4°C. An electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 minutes to electrophorese the DNA. The slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver, as described by Nadin et al. (2001), and analyzed under a microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each animal. Cells were also visually scored according to tail size into five classes, ranging from undamaged (0) to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal, and consequently, for each group studied. Therefore, the damage index (DI) ranged from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage, 100 x 4). Damage frequency (DF%) was calculated based on the number of cells with tail versus those with no tail (PICADA et al., 2003).

#### *2.10 Test the free radical DPPH base*

The extract antioxidant properties evaluation or pure, composed or purified front to the method of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The test

it based on the antioxidant capacity in donate hydrogen for DPPH, provoking the sweeping of this free radical and modifying the coloration of the solution. The results obtained using the method of the free radical DPPH allow to conduct a potential antioxidant comparison between material being analyzed against a standard (YAMAGUCHI et al. 1998).

#### *2.11 Hypoxantine/xanthine oxidase in vitro assay*

The *in vitro* antioxidant activity of the ethanolic extract was determined by monitoring the production of hydroxyl benzoic acids (DHBA) as a product of the hydroxyl radical attack on salicylic acid in the hypoxanthine-xanthineantio oxidase assay (OWEN et al., 1996).

#### *2.12. Statistical analysis*

Data from LD<sub>50</sub> were examined using the Probit's analysis. Data from elevated plus-maze, open field test and comet assay are expressed as mean ± S.E.M. These data were examined using the one-way ANOVA followed by the Duncan's test. Habituation results were analyzed using the t-test. The statistical evaluation of the comet assay was carried out using the one-way ANOVA and the Tukey's test. In all comparisons,  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  was considered to indicate statistical significance.

### 3. Results

#### *3.1. Phytochemical analyses*

The phytochemical analyses of *E. falcata* leaves revealed the presence of



alkaloids, flavonoids and saponins, while other phytochemicals such anthraquinone, a cardiac glycoside, coumarins, phenol compounds and tannins were not detected.

### 3.2. Acute toxicity study ( $LD_{50}$ )

The  $LD_{50}$  of *E. falcata* in rats was estimated to be 3,309 mg/kg in an observation period of 14 days.

### 3.3. Open field behavior and habituation

We verified the effect of pretest administration of *E. falcata* leaves ethanolic extract (100, 300 and 500 mg/kg) on open field behavior in rats. The extract in all the doses tested was able to decrease the number of rearings in the open field test when compared with the control group ( $p < 0.05$ ; Figure 1).

A reduction in the crossings numbers was observed for the dose of 100 mg/kg, although it was not significant (mean  $\pm$  S.E.M =  $60 \pm 8.5$ ;  $p > 0.05$ )., However, the groups that received 300 and 500 mg/kg of the extract showed a decrease in the crossings number when compared with the control group ( $p < 0.05$ ). (Figure 1).

The i.p. administration of 300 and 500 mg/kg of *E. falcata* extract showed to change the motivation, increasing latency to start the locomotion ( $p < 0.05$ ; figure 1).

When the animals were exposed again to the open field apparatus (24 hours after training) the groups that received *E. falcata* (all doses) increased the number of rearings compared to the first exposure, although these results were not significant ( $p > 0.05$ ). This behavior was different from the saline and tween groups, which showed a decrease in the rearings number after a 24-hour period ( $p < 0.05$ ; Figure 2).

### 3.4. Elevated plus-maze test

In the plus maze test the extracts of *E. falcata* were not able to produce effect

( $p > 0.05$ ), as shown in Figure 3.

### 3.5 Comet assay

In the present study no DNA damage was observed 24 hours after intraperitoneal administration of any of the doses of *E. falcata* extract in the peripheral blood and brain (Tables 1 and 2).

### 3.6. Scavenging of DPPH free radical

The free radical scavenging effect of the three samples, as well as of ascorbic acid and rutin(positive controls) was tested using the DPPH free radical scavenging assay (YAMAGUCHI et al. 1998). The free radical scavenging activity of *E. falcata* was 87.73 % at a concentration of 1000  $\mu\text{g/mL}$ , 42.57% at a concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ . The respective  $\text{IC}_{50}$  value for the ethanolic extract was 132.88  $\mu\text{g/mL}$ . In comparison, the results of the free radical scavenging effect of ascorbic acid ( $\text{IC}_{50} = 4.03 \mu\text{g/mL}$ ) and rutin ( $\text{IC}_{50} = 18.93 \mu\text{g/mL}$ ) as shown in Table 3.

### 3.7. Hypoxanthine/xanthine oxidase *in vitro* assay

The *in vitro* antioxidant activity of the ethanolic extract was determined by monitoring the production of hydroxyl benzoic acids (DHBA) as a product of the hydroxyl radical attack on salicylic acid in the hypoxanthine-xanthine oxidase assay (OWEN et al., 1996). The extract displayed a pronounced *in vitro* antioxidant capacity in a dose-dependent manner. The ethanolic extract of *E. falcata* ( $\text{IC}_{50} = 0.425 \text{ mg/mL}$ ) promoted significant activity, reducing the formation of both DHBA species to 43.9 % at a concentration of 0.5  $\text{mg/mL}$ , and to 15.3 % at the highest concentration used (2  $\text{mg/mL}$ ), as shown in Figure 4.

#### 4. Discussion

One of the aims of this study was to perform a preliminary investigation of the phytochemical constituents of the leaves of *E. falcata* for future correlation with behavioral effects caused by the extracts. For this purpose, tests were conducted to detect the possible presence of the alkaloids anthraquinone, cardiac glycoside, coumarins, flavonoids, phenol compounds, saponins and tannins. The positive results indicated the presence of saponins, flavonoids and alkaloids. The alkaloids were characterized by precipitation assays (Bertrand, Bouchardat, Dragendorff and Mayer's tests). To prove the presence of alkaloids, the extraction for Stas-Otto, thin-layer chromatography and revelation with Dragendorff were conducted (COSTA, 2001).

*Erythrina* plants are known to produce alkaloids, flavonoids and terpenes (ONUSIC et al., 2003, SARRAGIOTO et al., 1981, BARTON, et al., 1970), and though the presence of saponins is not common, these have already been reported for this genus (KOUM et al., 2007; KOUM and NKENGFACK, 1991).

The results obtained in the phytochemical analyses are in accordance with the literature published about the plants of the genus, as seen in DECKER et al. (1995); NKENGFACK et al. (1994); NKENGFACK et al. (2000); AMER et al. (1991); SOTO-HERNANDEZ and JACKSON (1994); GHOSAL, DUTTA and BHATTACHARYA (1972).

Flausino Jr. (2006) describes the presence of three alkaloids in the phytochemical analysis conducted with the flowers of *E. mulungu*, erythravine and erythartine, and the presence of a newly discovered alkaloid, 11-hydroxi-erythravine. Y Sarragiotto and collaborators (1981) already reported the presence of erythartine,

N – oxide-erythartine, erysotrine and N – oxide erysotrine in the methanolic extract of *E. mulungu*. Erythravine has been already isolated from the seed extracts of *E. folkersii* (MILLINGTON et al., 1974) and of *E. cochleata* (CHAWLA et al. 1985). The erythrinian alkaloid dihydro- $\alpha$ -erythroidine antagonizes excitatory effects of serotonin (5-HT) acting as anxiolytic (EILSELÉ and BERTRNAD, 1993).

Several authors studied the presence of alkaloids as related with the activity in the central nervous system. Lorenzi and Matos (2002) conducted pharmacological studies with *E. velutina* in laboratory animals and verified a significant spasmolytic activity of the crude extract, as well as antimuscarinic and depressive effects on the central nervous system. The oral treatment effects with the flower extract of *E. mulungu* in several models of anxiety tests were compared with the benzodiazepinics standard and demonstrated that the extract exerts anxiolytic effect on specific kinds of defense behaviors (ONUSIC et al., 2002). VASCONCELOS et al. (2003) demonstrated that the extract of *E. velutina* and *E. mulungu* exert significant antinociceptive effects in different experimental models and that the analgesic effects of these plants are independent from the opioid system. The authors have also demonstrated that these extracts have depressive effects on the central nervous system, which explains the popular use of these plants as tranquilizers in the Brazilian folk medicine.

The LD<sub>50</sub> was determined to be 3309.0 mg/kg for the ethanolic extract of *E. falcata*. According to Veerappan et al. (2007), the LD<sub>50</sub> of 1,000 mg/kg, calculated from intraperitoneal administration, may indicate a relatively safe use of the compound or extract in study. The values of LD<sub>50</sub> found in this study are above this value, and thus may indicate that the extract *E. falcata* offers a high safety margin.

The acute administration of 300 and 500 mg/kg of the extract of *E. falcata*

decreased the crossings number performed in the open field task. We could observe a decrease in the number rearings in all groups that received the extracts when compared to the control group. These results suggest that *E. falcata* extract decreased the locomotor and exploratory activity in rats. The time to start locomotion was increased only in the groups that received *E. falcata* 300 or 500 mg/kg, indicating a reduction in the motivation of the animals. When the animals were exposed again to the apparatus (24 hours after the training), the extract of *E. falcata* increased the number of crossings in all doses, but not significantly. The group that received saline or tween showed a significant decrease in the rearings number after 24h, demonstrating that there was habituation to the apparatus. We believe that this extract should be tested in other memory model, as inhibitory avoidance or recognition of objects task, to investigate the effect observed here about the habituation of the animals.

We believe that the effect on the locomotor and exploratory activities may be related to the presence of alkaloids in the species studied, since previous studies showed that some alkaloids extracted from different species of *Erythrina* showed the neuromuscular blocking action (LEHMAN, 1937; MEGIRIAN et al. 1995).

The possible anxiolytic effect of the species of *Erythrina* are all explained by the presence of erythrinian alkaloids. In this work we investigated the crude extract effect of *E. falcata* in the plus maze task. The groups that received the extract did not show significant difference as compared to the group control. The absence of anxiolytic effect in the plus maze task with *E. falcata* extract corroborates previous results, where same genus vegetable extract as the *E. mulungu* that in the same acute treatment. using doses varying between 200 and 800 mg/kg the plant extract did not change the anxiety measures when compared with the group control

(VASCONCELOS et al., 2004). Raupp (2006) investigated the extract of *E. velutina* and did not observe any anxiolytic effect in acute treatment, which agrees with previous results that used bark and stem and extracts at the doses of 200 and 400 mg/kg did not promote anxiolytic activity (VASCONCELOS, et al. 2004). However, an anxiolytic effect was observed in the chronic treatment, revealed as an increase in the number of entries in the open arms in plus maze task, though without similar locomotor activity alteration to the other species of the *Erythrina* genus (VASCONCELOS, et al. 2004).

Data from the World Health Organization indicate that 70 to 80% of the world's population use some form of unconventional medicine, like plants. Some medicinal plants produce various biological effects and generally very little is known of their toxicity. Therefore, it is essential to evaluate the toxic effects of plant species in order to guarantee safe use for medical purposes (MUKINDA and SUCE, 2007). The comet assay is a versatile and sensitive method to measure DNA single and double strand breaks (COLLINS et al., 2008). But this technique does not provide the mutagenic potential of the substances tested, since changes in DNA can be repaired or not with efficiency (GUECHEVA et al., 2006).

In this study no DNA damage was observed 24 hours after intraperitoneal administration of the extracts of *E. falcata* in blood and brain tissues, as no dose generated significant results. In the study of the *E. falcata* that proved the contraceptive activity of the plant, another test was also carried out and reported the mutagenicity with the dose of 2g/20 mL of extracts of the plant stem. The extract presented mutagenic activity and damages to the DNA in the micronucleus test (ORIHUELA and ISHIYAMA, 2006). As these results were different from those of this study, other tests to test the extract of *E. falcata* at different concentrations and

different types of parts of the plants are necessary.

Effects of flavonoids on central nervous system are found in literature (FERNANDÉS et al., 2006; PAULKE et al., 2006), confirming the ability of these compounds to cross the blood-brain barrier. Epidemiological studies have shown the beneficial effects of flavonoids on neurodegeneration and that these compounds may protect the brain because of their ability to modulate intracellular signals, promoting the cellular survival (YUTING et al. 1990). However, several studies have reported the genotoxic effects of flavonoids, like kaempferol (SILVA, et al. 1997).

Four different concentrations (1,10,100 and 1000 µg/mL) of the *E. falcata* extract were used in the analysis of antioxidant activity for DPPH. A significant antioxidant activity for *E. falcata* extract was observed in a dose-dependent manner. With the inhibitory concentration of 132.88 µg/mL and concentration of 1000 µg/mL of ethanolic extract of *E. falcata* inhibited in 87.73 % the presence of DPPH radical. Inhibitory concentration values (IC<sub>50</sub>) were also investigated, which is the concentration of a substance that necessary for the inhibition of 50% in one mixture, which in the present study is the radical DPPH. We compared the extract values of *E. falcata* with the flavonoid rutin and ascorbic acid, that are positive control for antioxidant activity. The results obtained revealed a significant antioxidant activity for the *E. falcata* extracts tested, in a dose-dependent manner. The IC<sub>50</sub> of 132.88 µg/mL and concentration of 1000 µg/mL of *E. falcata* ethanolic extract inhibited the presence of the radical DPPH by 87.73 %.

The antioxidant activity is explained by the presence of flavonoids in the extract of plants of the genus *Erythina*, because flavonoids cause significant inhibition of the radical DPPH (WANJALA et al. 2002). The flavonoid 3-isoflavon can be considered a substance with significant antioxidant activity (BRAND-WILLIAMS,

CUVELIER and BERSETI, 1995). In the study conducted with the extract of *E. latissima* which isolated and characterized the flavonoids erylatissim A, erylatissim B and erylatissim C, a weak activity inhibition of the radical of these flavonoids was proved (CHACHA and BOJASE-MOLETA, 2004). The alkaloids 11- $\beta$ -hydroxierysothramidine, 11- $\beta$ -methoxierysothramidine and 11- $\beta$ -hydroxierysothrina were isolated from the extracts of flowers and pods of *E. lysistemon*, though without revealing any significant inhibition of the DPPH radical (JUMA and MAJINDA, 2004). On the other hand, a study about the extract of *E. latissima* isolated the flavonoids erylatissim A, erylatissim B and erylatissim C showed that they inhibit the activity of DPPH (CHACHA, BOJASE-MOLETA and RUNNER, 2005). Investigations on the extract of *E. mildbraedii* isolated the pterocarpane called erycristagallin, which promoted expressive inhibition of DPPH (NJAMEN, et al. 2003).

Other study that assessed the antioxidant activity of the ethanolic extract was conducted by monitoring the production of hydroxyl benzoic acids (DHBA) as a product of the hydroxyl radical attack on salicylic acid in the hypoxanthine-xanthine oxidase assay (OWEN et al., 1996). The extract displayed a pronounced *in vitro* antioxidant capacity in a dose-dependent manner.

#### Acknowledgements

This research was supported by Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).



## References

AMER, M. A.; EL-MASRY, S.; SHAMA, M.; FREYER, A., J. **Three novel glycodienoid alkaloids from *Erythrina lysistemon***. Journal of Natural Products, v.54, p. 161- 6, 1991.

BARTON, H. R. D. et al. ***Erythristemine, a new alkaloid from *Erythrina lysistemon*: a spectroscopic and crystallographic study***. Chem. Comm., p.391, 1970.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E.; BERSET, C . ***Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity***. Lebensm. Wiss. U. Technol., v.28, p. 25-30, 1995.

CHACHA, M.; BOJASE- MOLETA. J.; RUNNER, R. T. ***Majinda, antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem Wood of *Erythrina latissima****. Phytochemistry, v.66, p. 99-104, 2005.

CHAWLA, A. S. et al. ***Alkaloids in seeds of fours *Erythrina* species***. Phytochemistry, v.24, n.8, p. 1821-1823, 1985.

COLLINS, A. R. et al. ***The comet assay: topical issues***. Mutagenesis, v.23, p. 143-151, 2008.

COSTA, A. F. ***Farmacognosia experimental***. 3ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2001.

DANTAS M. C.; DE OLIVEIRA, F. S.; BANDEIRA, S. M. **Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* in rodents.** Journal of Ethnopharmacology, v.94, p. 129-133, 2004.

DECKER, M. W. et al. **Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors.** European Journal of Pharmacology, v.280, p.79-89, 1995.

FERNÁNDES, S. P. et al. **Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides.** European Journal of Pharmacology, v.539, p. 168-176, 2006.

FLAUSIANO Jr. **Análise fitoquímica e estudo biomonitorado da atividade ansiolítica de *Erythrina mulungu* em camundongos submetidos a diferentes modelos animais de ansiedade.** São Paulo: USP, 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2006.

GARIN-AGUILAR, M. E. et al. **Effect of crude extracts of *Erythrina Americana* on aggressive behavior in rats.** Journal of Ethnopharmacology, v.69, p. 189-196, 2000.

GHOSAL, S.; DUTTA, S. K.; BHATTACHARYA, S. K. ***Erythrina* - Chemical and pharmacological evaluation II: alkaloids of *Erythrina variegata* L.** Journal of Pharmaceutical Sciences, v.61, p. 1274-1277, 1972.

GUECHEVA, D. P. T. et al. **Toxicidade e genotoxicidade do sulfato de cobre em planárias de água doce e camundongos.** Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v.1, p. 171-175, 2006.

HARBORNE, J. B. ***Phytochemical Methods***. Oxford: Clarendon Press, 1984.

KOUM. et al. ***Sigmoiside E: A new antibacterial triterpenoid saponin from Erythrina sigmoidea (HUA)***. Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia, v.21, p. 373-378, 2007.

KOUM, V. F.; NKENGFAK, M. A. ***Two new triterpenoid saponins from Erythrina sigmoidea***. Journal of Natural Products, v.54, p. 1288-1292,1991.

LEHMAN, A. J. ***Actions of Erythrina americana, a possible curare substitute***. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, p. 60-69, 1937.

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

MEGIRIAN, D. et al. ***The action of some derivates of beta-eritroidina on peripheral neuro-effector system***. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, p. 113-222, 1995.

MILINGTON, D. F.; STEIMAN, D. H.; RINEHART Jr., K. L. ***Isolation, gass chromatography- mass spectrometry and structures of new alkaloids from Erythrina folkersii krukoff, Moldenke and Erythrina saviiflora krukoff and Barneby***. J. Am. Chem. Soc., p. 1907- 1917,1974.

MUKINDA, J. T.; SYCE, J. A. ***Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of Artemisia afra in rodents***. Journal of Ethnopharmacology, v.112, p. 138-144, 2007.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, M. L.; CIOCCA, D. R. ***A silver staining for single-cell gel assay.*** The Journal of Histochemistry and. Cytochemistry, v.49, p. 1183-1186, 2001.

NJAMEN, D. et al. ***Anti-inflammatory activity of erychristagallin, a pterocarpene from Erythrina mildbraedii.*** Eur. J. of Pharmacology, p. 67-74, 2003.

NKENGFACK, A.E, et al. ***Prenylated isoflavanone from the roots of Erythrina sigmoidea.*** Phytochemistry, v.36, n.4, p. 1047-1051, 1994.

NKENGFACK, A. E. et al. ***Indicanine A, a new 3-phenylcoumarin from root bark of Erythrina indica.*** Journal of Natural Products, v.63, n.6, p.855-856, 2000.

ONUSIC, G.M. et al. ***Effects of chronic treatment with a water–alcohol extract Erythrina mulungu on anxiety-related responses in rats.*** Biol. Pharm. Bull, v.26, n.11, p. 1538-1542, 2002.

ORIHUELA, P. A.; ISHIYAMA, V. ***Postcoital ingestion of the aqueous extract of Erythrina falcata Benth prevents pregnancy in the mouse.*** Journal of Ethnopharmacology, v.73, p. 307-310, 2005.

OWEN, R.W. et al. ***A high performance liquid chromatography method for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids.*** European Journal of Cancer Prevention, v.5, p. 233-240,1996.

PAULKE, A. et al. **Determination os *St. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection***. Journal of Chromatography, v.832, p. 109-113, 2006.

PEREIRA, P. et al. **Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats**. Basic Clin. Pharmac. Toxicol, v.99, p. 374 - 378, 2006.

PICADA, J. N. et al. **DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine**. Brain Research. Molecular Brain Research, v.114, p. 80-85, 2003.

RABELO, L. A. et al. **Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina***. Biochemical Systematics and Ecology, v.29, p. 543- 544, 2001.

RAUPP, I. F. M. **Efeito ansiolítico da administração prolongada do extrato de *Erythrina velutina* no labirinto em cruz elevado**. Faculdade de Ciência Biológicas, UFPR, TESE DE MESTRADO, 2006.

REX, A.; MORGENSTERN, E.; FINK, H. **Anxiolytic-like effects of kava-kava in the elevated plus maze test – a comparison with diazepam**. Prog. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.26, p. 855-859, 2002.

RIBEIRO, M. D. et al. **Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.39, p. 263-270, 2006.

RUKASHAISIRIKUL. et al. **Antibacterial Pterocarpans from *Erythrina subumbrans***. Journal of Ethnopharmacology, v. 5, p. 95-100, 2006.

SAIDU, K. et al. **Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis***. Journal of Ethnopharmacology, v.71, p. 275-280, 2000.

SARRAGIOTO, M. H. **Isolamento e síntese do alcalóides eritrínicos**. São Paulo: UNICAMP. Tese de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, 1981.

SILVA, I.D. et al. **Involvement of rat cytochrome 1 A 1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin**: relevance to the genotoxicity of kaempferol. Mutagenesis, v.12, p. 383-390, 1997.

SILVA, J. et al. **An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with natives rodents**. Genetics and Molecular Biology, v.23, p. 241-245, 2000.

SOTO-HERNANDEZ, M.; JACKSON, A. H. ***Erythrina* alkaloids: isolation and characterisation of alkaloids from Seven *Erythrina* Species**. Planta Medica, v.60, p. 175-177, 1994.

TANNE, F. S. F. et al. **Estrogenic effects of the ethyl-acetate extract of the stem bark of *Erythrina lysistemon***. Phytomedicine, v.17, p. 260-264, 2006.

TIEPPO, J. et al. ***Evaluation of protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome.*** Food Chem. Toxicol, v.45, p. 1140, 2007.

VASCONCELOS, S. M. M. et al. ***Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from Erythrina velutina and Erythrina mulungu in mice.*** Biological Pharmaceutical Bulletin, v.26, p. 946 -949, 2003.

VEERAPAPAN, A. et al. ***Acute and subacute toxicity studies of Aegle marmelos Corr., in Indian medicinal plant.*** Phytomedicine, v.14, p. 209-215, 2007.

VIANA, C. C. S. et al. ***Gamma-decanolactone effect on behavioral and genotoxic parameters.*** Life Sci. 80, p. 1014, 2007.

WANJALA, C. C. W. et al. ***Erythraline alkaloids and antimicrobial flavonoids of Erythrina latíssima.*** Planta Medica, v.68, p. 640-642, 2002.

XAVIER, C. A. G. ***Perfil da população usuária de plantas medicinais e investigação fitoquímica das espécies nativas da mata atlântica na região de Osório.*** Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Luterana do Brasil, 2006.

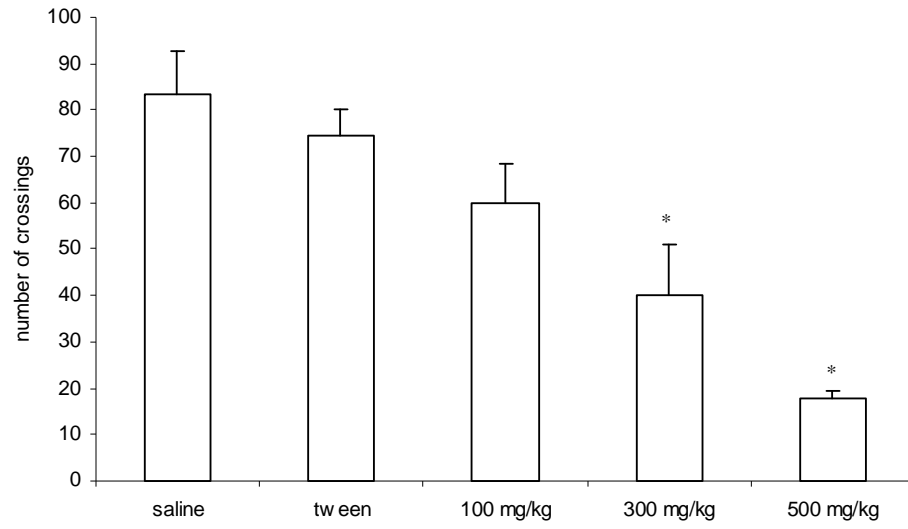
YAMAGUCHI T. et al. ***HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenil-2-picrylhidrazyl.*** Biosciences, Biotechnology and Biochemistry, v.62, p. 1201-1204, 1998.

ZHANG, Y. et al. ***Anti-osteoporotic effect of Erythrina variegata L. in ovariectomized rats.*** Journal of Ethnopharmacology, v.109, p.165-169, 2007.

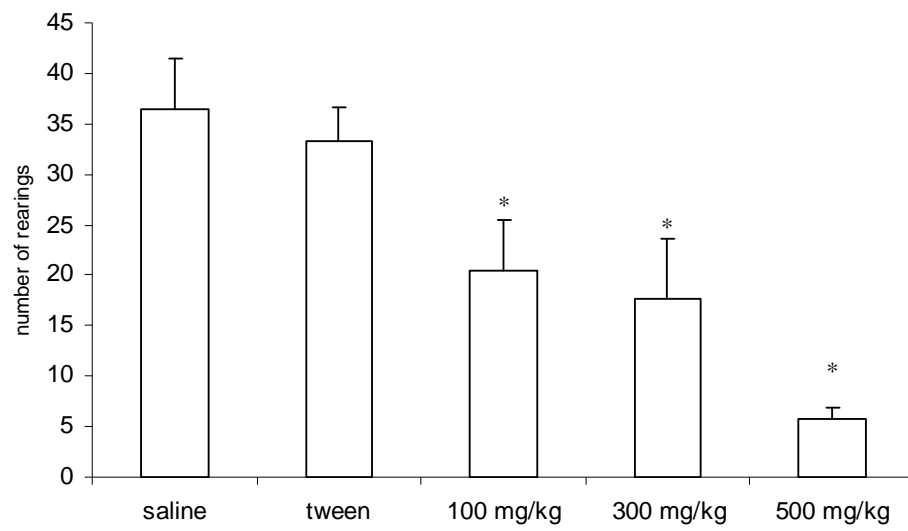


Figure 1

A



B



C

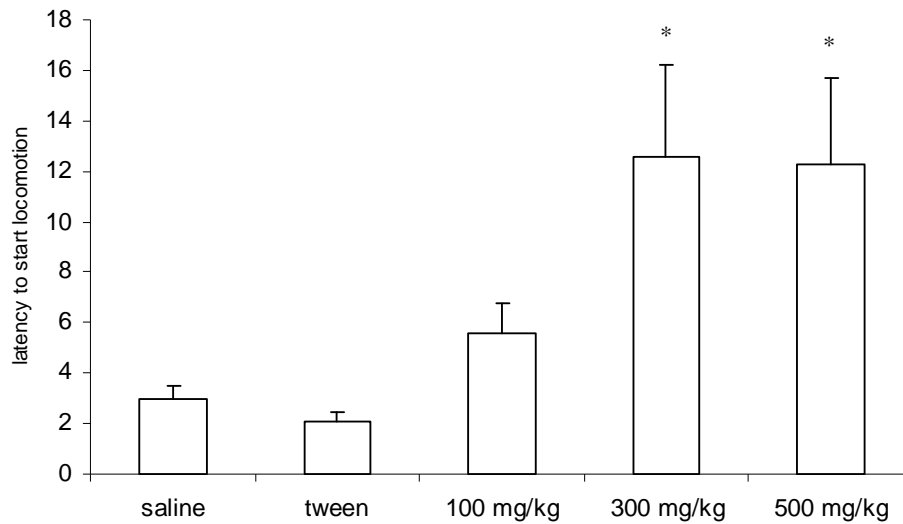


Figure 1. Effect of pretest administration of *Erythrina falcata* leaves ethanolic extract (100, 300 and 500 mg/kg) on number of crossings (A) performed, number of rearings (B) performed during a 5-minute exploration of an open field and the latency to start locomotion (C). Animals received an intraperitoneal injection of saline, vehicle and *Erythrina falcata*, 30 minutes prior to being exposed to the locomotor behavior task in the open field. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. N = 10 animals per group. There were significant differences comparing between the control groups and groups that received *Erythrina falcata*.

Figure 2

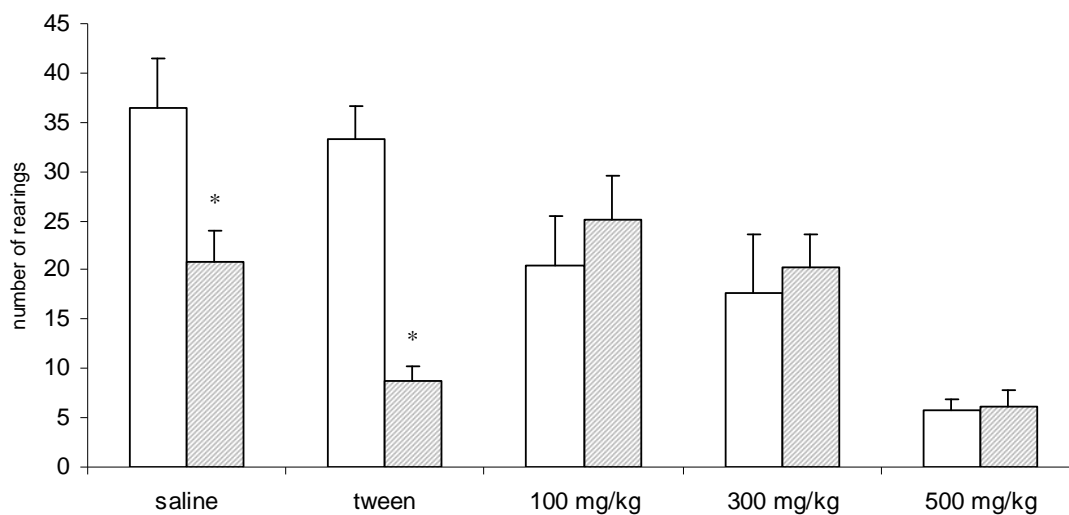
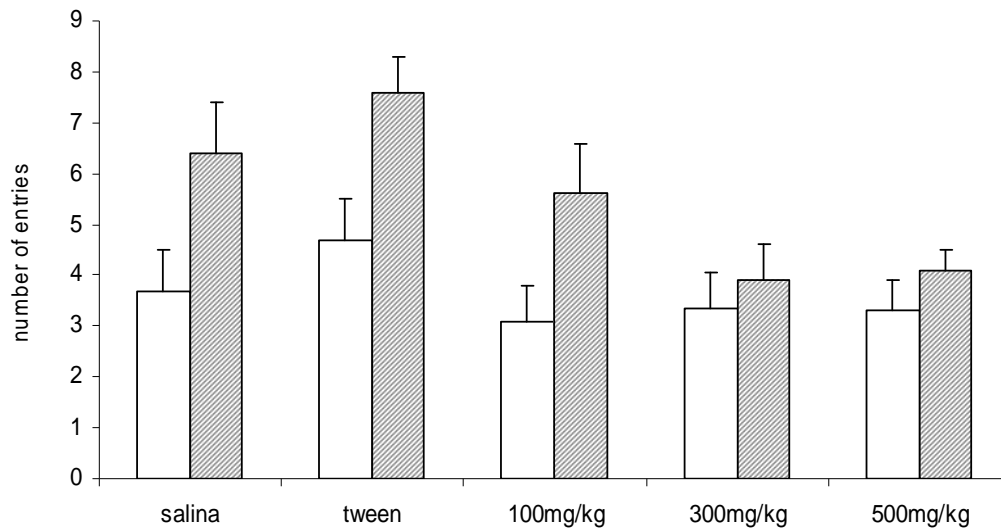


Figure 2. Effect of pretest administration of *Erythrina falcata* ethanolic extract (100, 300 and 500 mg/kg) When the animals were exposed again to the open field apparatus (after 24 hours to the training). This behavior was different of the saline and tween groups, that showed a decrease in the rearings number after a 24 hours period;  $p < 0.05$ . Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. N = 10 animals per group.

Figure 3

A



B

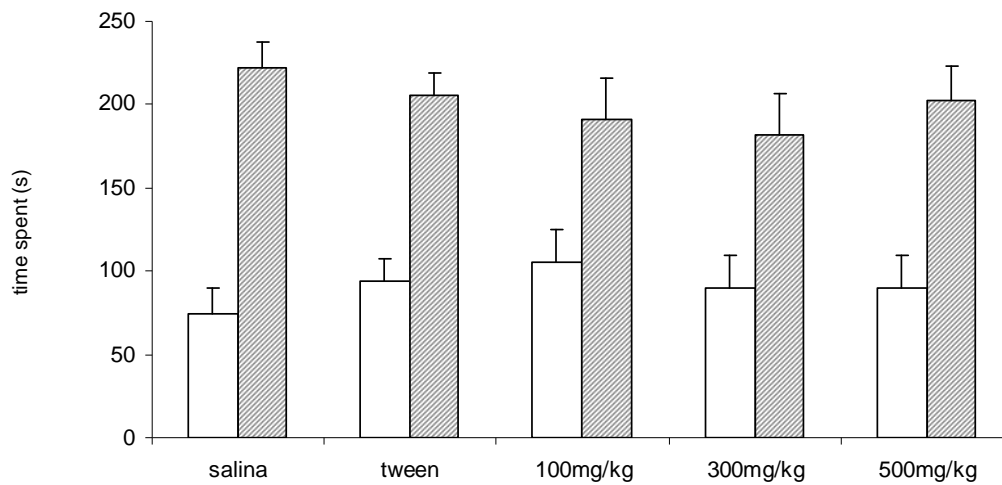


Figure 3. Effect of pretest administration of *Erythrina falcata* ethanolic extract (100, 300 and 500 mg/kg) on the number of entries (A) and time spent (B) in open and closed arms. Animals received an intraperitoneal injection of saline, vehicle and *Erythrina falcata* 30 minutes prior to being exposed to the plus maze. White columns: open arms, gray columns: closed arms. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M.,

N=10 animals per group; \* $p < 0.05$  compared to the control groups; ANOVA/Duncan's test. There were no significant differences comparing between the control groups and groups that received *Erythrina falcata*.

Table 1. Comet assay in peripheral blood from mice treated with tween 5% solution (negative control), saline solution (NaCl 0.9%) or extract of *Erythrina falcata* 100, 300 or 500 mg/kg.

| Group                                  | Damage index<br>mean $\pm$ S.E.M. | Damage frequency<br>mean $\pm$ S.E.M. |
|--|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Saline                                 | 2.08 $\pm$ 0.71                   | 1.58 $\pm$ 0.47                       |
| Tween 5%                               | 2.00 $\pm$ 0.86                   | 1.25 $\pm$ 0.50                       |
| 100 mg/kg <i>E. Falcata</i><br>extract | 2.07 $\pm$ 0.90                   | 1.43 $\pm$ 0.57                       |
| 300 mg/kg <i>E. Falcata</i><br>extract | 1.56 $\pm$ 0.46                   | 1.13 $\pm$ 0.31                       |
| 500 mg/kg <i>E. Falcata</i><br>extract | 1.81 $\pm$ 0.65                   | 1.38 $\pm$ 0.55                       |
| Positive control                       | 121.7 $\pm$ 23.5**                | 57.0 $\pm$ 8.0**                      |

Damage index: can vary of 0 (without apparent damage. 100 cells x 0) until 400 (with maximum of damage 100 cells x 4);

Damages frequency (%): percentile of cells with damage

Positive control: peripheral blood of the saline group treated *ex vivo* with hydrogen peroxide 0.20 mM.

\*\*P < 0.01, statistical significant of the saline group (ANOVA. Tukey test).

Table 2. Comet assay in brain tissue from mice treated with tween 5% solution (negative control), saline solution (NaCl 0.9%) or extract of *Erythrina falcata* 100, 300 or 500 mg/kg.

| Group                                  | Damage index       | Damage frequency  |
|--|--------------------|-------------------|
|  | Mean $\pm$ S.E.M.  | Mean $\pm$ S.E.M. |
| Saline                                 | 34.30 $\pm$ 6.62   | 23.30 $\pm$ 4.71  |
| Tween 5%                               | 31.33 $\pm$ 7.44   | 19.42 $\pm$ 3.42  |
| 100 mg/kg <i>E. Falcata</i><br>extract | 24.00 $\pm$ 5.47   | 15.79 $\pm$ 3.53  |
| 300 mg/kg <i>E. Falcata</i><br>extract | 50.44 $\pm$ 8.99   | 30.13 $\pm$ 6.10  |
| 500 mg/kg <i>E. Falcata</i><br>extract | 37.63 $\pm$ 3.36   | 25.00 $\pm$ 1.80  |
| Positive control                       | 302.5 $\pm$ 15.4** | 99.4 $\pm$ 0.45** |

Damages index: can vary of 0 (without apparent damage 100 cells x 0) until 400 (with maximum of damage 100 cells x 4);

Damages frequency(%):percentile of cells with damage

Positive control: brain tissue of the saline group treaty with *ex vivo* with hydrogen peroxide 0.20 mM.

\*\*P < 0.01, statistical significant of the saline group (ANOVA. Tukey test).

Table 3. Inhibition of DPPH\*, IC<sub>50</sub> values for the DPPH assay of the *Erythrina falcata* ethanolic extract, rutin and ascorbic acid, as well as the AEAC\*\*.

| Sample                   | Inhibition (%) |       |       |       | IC <sub>50</sub> (µg/mL) | AEAC (µg/g) |
|--------------------------|----------------|-------|-------|-------|--------------------------|-------------|
|                          | 1              | 10    | 100   | 1000  |                          |             |
| Concentration            | µg/mL          | µg/mL | µg/mL | µg/mL |                          |             |
| Ascorbic acid            | 9.70           | 98.11 | 99.40 | 99.62 | 4.03 ± 0.16              | 1.0000      |
| Rutin                    | 7.53           | 36.51 | 88.23 | 96.72 | 18.93 ± 0.76             | 0.2128      |
| <i>Erythrina falcata</i> | 3.55           | 9.74  | 42.57 | 87.73 | 132.88 ± 9.43            | 0.0303      |

Mean ± standard deviation of three individual determinations. Differences at  $p < 0.05$  were considered to be significant. Results were based on the values measured at 20 min. Ascorbic acid and rutin were used as positive controls. \*DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; \*\*AEAC = Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (A).



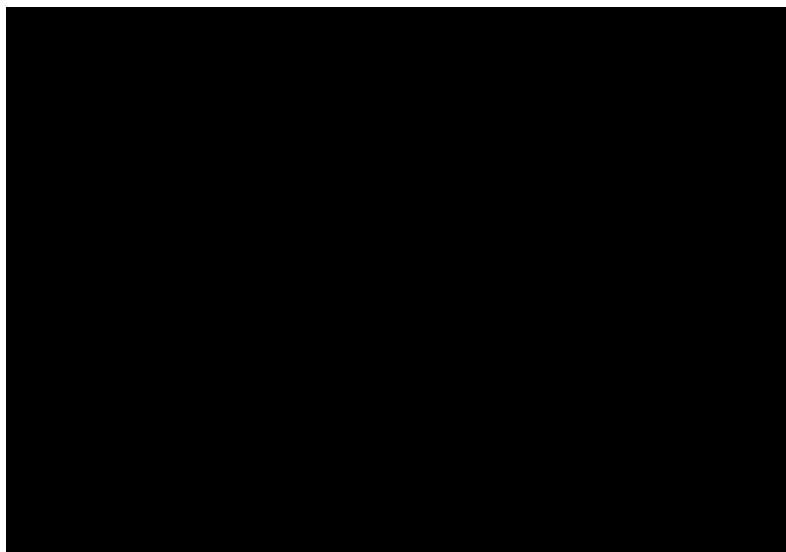


Figure 4. Hypoxanthine/xanthine oxidase *in vitro* assay the *Erythrina falcata* leaves ethanolic extract

#### 4. DISCUSSÃO

Um dos objetivos deste trabalho foi realizar um estudo preliminar dos constituintes fitoquímicos das folhas de *E. falcata* para relacioná-los aos efeitos comportamentais, genotóxicos e antioxidantes do extrato. Dessa maneira, foram realizados testes para detectar a possível presença de alcalóides, antraquinonas, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, flavonóides, saponinas e taninos.

Os resultados positivos indicaram a presença de flavonóides, saponinas e alcalóides. Cabe salientar que esta última classe é caracterizada através de ensaios de precipitação (testes de Bertrand, Bouchardat, Dragendorff e Mayer). Para confirmar a presença de alcalóides, foi realizada a extração por Stas-Otto seguido da realização de cromatografia em camada delgada e revelação com Dragendorff (COSTA, 2001).

As plantas do gênero *Erythrina* são as principais fontes de alcalóides tetracíclicos tipo eritrina que foram originalmente identificados em 1937 por Folkers e Major. Na planta *E. velutina* isolou-se a eritralina e a eritratina (AMER et al., 1991) e o fracionamento químico das cascas de *E. velutina* levou a obtenção dos alcalóides faseolidina e homoesperetina, sendo que a último não havia sido isolado de uma planta da família Fabaceae (RABELO et al., 2001).

Vários alcalóides já foram descritos em estudos realizados com o gênero *Erythrina*, como os três alcalóides dioxoeritratina dioxoepierythratidina e dioxoerythratidinona, isolados da *E. subumbrans* (RUKACHAISIRIKUL et al., 2007). Sarragiotto e colaboradores (1981) relataram a presença dos alcalóides eritratina, N-óxido-eritratina, erisotrina e N-óxido erisotrina no extrato metanólico bruto de *E. mulungu*. A partir das flores desta mesma planta Flausiano Jr. (2006) isolou os alcalóides eritratina, 11-hidróxi-eritratina e eritratina. O isolamento deste último alcalóide já havia sido obtido em estudo com o extrato das sementes de *E. folkersii* (MILLINGTON, STEIMAN e RINEHART, 1974) de *E. cochleata* (CHAWLA, REDHA e JACKSON 1985).

Outra classe detectada na análise fitoquímica foi a dos flavonóides, tal classe é bastante citada nos artigos relacionados as plantas do gênero *Erythrina*, flavonóides como flavanonas e flavanonas preniladas, (NKENGFAK et al.,

1994). No estudo em que *E. falcata* demonstrou atividade contraceptiva em ratos, diminuindo a número de embriões provavelmente pela atividade estrogênica, atribuiu-se esta atividade á presença de isoflavonóides (ORIHUELA e ISHYIAMA, 2005). Ainda, em uma outra investigação mostrou a presença de flavonóides, tais como isoflavonas e flavonas nas espécies *E. mulungu* e *E. velutina*, sendo estes flavonóides também relacionados á atividade antinociceptiva observada em ratos (VASCONCELOS, 2004).

Apesar de menos freqüente a presença de saponinas também encontra apoio nos relatos da literatura através do isolamento de saponinas triterpenóides, tais como, 16-O- $\beta$ -D- galactopiranosil maniladiol (1) da folhas planta *E. sigmoidea* foi relatada no estudo de Koum e colaboradores (2007). Koum e Nkengfack (1991) já haviam relatado presença de saponinas nas folhas da mesma planta do gênero *Erythrina*, tais quais foram designados 3-O- $[\beta$ -D-galactopiranosil]maniladiol e 3-O- $[\beta$ -D-glucopiranosil]maniladiol , assim como Mbafor e colaboradores (1997) isolaram as seguintes saponinas : - D- $\beta$ -glicopiranosil – soyasapogenol- B e  $\alpha$ - L – glicopiranosil – soyasapogenol – B da *E. sigmoidea*.

As doses de 500, 1000, 1500 e 2000 mg/kg do extrato etanólico das folhas de *E. falcata* foram administrados aos ratos com a finalidade de obtenção da DL<sub>50</sub>. O valor encontrado para a DL<sub>50</sub> foi de 3309,0 mg/kg, calculado a partir do programa Probit. A partir deste valor foram estabelecidas doses entre 10 e 20% para utilização nos experimentos comportamentais. Verificou-se um aumento regular dose-dependente na mortalidade dos ratos. O primeiro animal morreu sete dias após administração do extrato de *E. falcata* 1800 mg/kg completar 24 horas. De acordo com Veerappan et al. (2007), considera-se que uma DL<sub>50</sub> de 1000 mg/kg, calculada a partir de administração intraperitoneal, possa indicar uma relativa segurança para o composto ou extrato em estudo. Sendo assim, com base no valor de DL<sub>50</sub> encontrado neste estudo, pode-se dizer que o extrato bruto obtido das folhas de *E. falcata* não apresenta toxicidade elevada. Cerutti et al. (2000) estudaram a toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico bruto de *E. falcata* e encontraram o valor entre 3750mg/kg e 5000 mg/kg. Apesar dos valores encontrados no estudo de Cerutti terem sido aproximados e não equivalentes ao

valores encontrados neste estudo, estes continuam indicando uma relativa segurança para os dois tipos de extratos estudados, tanto etanólico como hidroalcoólico.

Durante este trabalho, o extrato etanólico de *E. falcata* foi submetido a modelos animais que permitiram avaliar seus efeitos sobre o sistema nervoso central, fornecendo informações sobre a atividade locomotora (teste do campo aberto) e ansiedade (tarefa do labirinto em cruz elevado). Os resultados mostraram que o extrato etanólico de *E. falcata* nas doses testadas foi capaz de diminuir o número de respostas de orientação no teste de campo aberto, diminuindo a atividade exploratória dos animais. Verificou-se uma redução no número de cruzamentos na dose de 100 mg/kg embora, pela análise estatística, este grupo não tenha sido diferente do grupo controle, e nos grupos que receberam doses de 300 e 500 mg/kg a redução da atividade locomotora, representada por uma redução no número de cruzamentos, foi estatisticamente significativa. Após a administração intraperitoneal de 300 e 500 mg/kg do extrato de *E. falcata* houve um aumento na latência para início da locomoção dos animais no aparato de campo aberto, indicando uma redução na motivação destes grupos quando comparados ao grupo controle.

Acredita-se que, uma possibilidade para justificar estes efeitos, possa estar relacionada à presença de alcalóides no extrato, uma vez que estudos prévios mostraram que alcalóides extraídos de espécies de *Erythrina* são capazes de produzir um bloqueio neuromuscular (LEHMAN 1937; MEGIRIAN, LEARY e SLATER, 1995). Os resultados obtidos com as doses elevadas do extrato podem ser interpretados por uma diminuição na atividade locomotora, devido à interação de alguns dos alcalóides eritrínicos do extrato com receptores nicotínicos periféricos conforme já havia relatado Vianna et al., (2001). Pois o alcalóide como dihidro- $\beta$ -erithroidina, isolado da *E. mulungu*, mostrou ser um potente antagonista dos receptores neuronais nicotínicos-acetilcolínicos (WILIAMS e ROBSON,2006). Ainda neste sentido, Decker et al. (1995) isolou a erisodina, outro alcalóide eritrínico, e constatou que este alcalóide é mais potente na sua ação como antagonista dos receptores nicotínicos-acetilcolínicos e mais seletivo do que o dihidro- $\beta$ -eritroidina. O alcalóide eritrínico dihidro- $\beta$ -eritroidina antagoniza efeitos

excitatórios da serotonina (5-HT) no receptor 5HT<sub>3</sub>, agindo como ansiolítico (ELSELÉ et al., 1993).

Neste estudo a administração do extrato etanólico de *E. falcata* sobre a habituação dos animais ao campo aberto foi verificada, ou seja, os animais foram expostos novamente ao aparato vinte e quatro horas após o primeiro teste. Os grupos que receberam salina ou tween mostraram uma redução significativa no número de rearings em relação ao primeiro dia de exposição, enquanto que os grupos que receberam o extrato de *E. falcata* tiveram um aumento neste parâmetro, embora não significativo. Estes resultados sugerem que o extrato de *E. falcata* possa levar a um prejuízo na habituação em roedores, o que indicaria um déficit de aprendizagem. Porém, pelo fato da análise estatística não ter mostrado significância outras doses devem ser investigadas para melhor esclarecer este efeito.

No estudo realizado com a administração aguda do extrato hidroalcoólico evaporado de *E. falcata* verificou-se efeito sedativo na dose de 500mg/kg durante oito e vinte e um dias, também observado com o grupo que recebeu diazepam, utilizado como grupo controle positivo (OLIVEIRA et al., 2005); tais resultados corroboram com o presente estudo, porém este realizou suas pesquisas com base na administração crônica.

No estudo de Dantas, Oliveira e Bandeira (2004) a re-exposição dos animais que receberam o extrato aquoso das folhas *E. velutina* (10mg/kg), ao campo aberto não apresentaram uma redução no número de cruzamentos, indicando que não houve habituação e, portanto, sugerindo um prejuízo na memória. Os resultados levaram os autores a testarem os extratos em um outro modelo comportamental. O modelo escolhido foi o da esQUIVA inibitória para que pudesse confirmar os resultados obtidos anteriormente com o teste do campo aberto. Neste segundo modelo também não foi observado efeito significativo nos grupos tratados, e, portanto apesar de terem sido realizados dois testes comportamentais, o extrato de *E. velutina* indicou possuir efeito prejudicial na memória em ambos os testes.

O possível efeito ansiolítico das espécies da *Erythrina* está relacionado à presença de alcalóides erítrnicos como 11- $\alpha$ -hidroxieritravina, eritravina e  $\alpha$ -

hidroexieritrosina estudados no teste do labirinto em cruz elevado e modelo de transição claro-escuro, tais alcalóides foram os responsáveis pelo efeito ansiolítico observado com o extrato bruto no tratamento agudo, o que implica a ampla utilização popular do gênero *Erythrina* como calmante (FLAUSIANO, 2006).

Neste trabalho, também foi investigado o efeito do extrato etanólico de *E. falcata* no modelo do labirinto em cruz elevado, método amplamente utilizado para detectar efeito ansiolítico ou ansiogênico. Os grupos que receberam extrato bruto de *E. falcata* não mostraram diferença significativa do grupo controle, caracterizando ausência do efeito ansiolítico ou ansiogênico nesta tarefa comportamental. Em um estudo anterior, o extrato de *E. mulungu* foi investigado e concluiu-se que no tratamento agudo com doses de 200-800 mg/kg não houve alteração das medidas de ansiedade quando comparado com o grupo controle no modelo do labirinto em cruz elevado (VASCONCELOS et al. 2004). Da mesma forma, Raupp (2006) concluiu que *E. velutina* em tratamento agudo não desencadeou efeito ansiolítico nos animais utilizando-se o mesmo modelo. Outro estudo foi desenvolvido com o extrato hidroalcoólico das cascas e do caule de *E. velutina* e *E. mulungu* no labirinto em cruz elevado, nas doses de 200 e 400 mg/kg, que administrado em tratamento agudo não interferiu na atividade ansiolítica (VASCONCELOS et al. 2004). Porém no tratamento crônico observou-se um efeito ansiolítico, através do aumento do número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, sem alteração da atividade motora similar a outras espécies de *Erythrina* (VASCONCELOS et al. 2004).

Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que 70 a 80% da população mundial utilizam algum tipo de medicina não convencional, como plantas. Algumas plantas medicinais produzem várias atividades biológicas e geralmente muito pouco de sua toxicidade é conhecida. Portanto, é de máxima importância avaliar os efeitos tóxicos de espécies vegetais para sustentar seu uso seguro (MUKINDA e SYCE, 2007).

O ensaio cometa é um método versátil e sensível para mensurar quebras nas fitas simples e duplas do DNA (COLLINS et al, 2008). Porém, essa técnica não prevê o potencial mutagênico das substâncias testadas, uma vez que

alterações no DNA podem ser ou não reparadas com eficiência (GUECHEVA et al, 2006).

Na literatura são encontrados efeitos dos flavonóides sobre o sistema nervoso central (FERNÁNDES et al, 2006; PAULKE et al, 2006), confirmando a capacidade de alguns desses compostos atravessarem a barreira hemato-encefálica. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que os flavonóides não possuem sobre efeito genotóxico no cérebro e que tais substâncias podem proteger o cérebro devido sua capacidade de modular sinais intracelulares promovendo a sobrevivência das células (YUTING et al. 1990).

Através da análise fitoquímica de *E. falcata* foi encontrada a presença de alcalóide, constituintes químicos que em estudos vêm apresentando atividade neurotóxica, hemolítica e citotóxica (STANKEVINCS et al., 2008), potencial mutagênico e carcinogênico (YAMANKA et al. 1979 e KUHARA, et al. 1980) e apoptose celular (COULOMBE e RIEBEN, 2003).

ELDEEN e STADEN (2007) realizaram estudo sobre algumas plantas utilizadas popularmente por sudaneses, entre as plantas estudadas a *E. latíssima* foi uma delas, não sendo constatada nenhuma atividade genotóxica com a utilização do teste Ames. Fennell e colaboradores (2004) testaram algumas plantas utilizadas na África, sendo uma das plantas a *E. caffra* que foi testada em relação a danos no material genético com o teste de micronúcleo, e tais testes mostraram mutagenicidade, porém ELGORASHI, TAYLOR e MAES (2003) estudaram a mesma planta porém com os testes TA100 e VITOTOX e não resultou atividade genotóxica na mesma, ambos os testes foram realizados in vitro, em cepas de *Salmonella*, com extratos crus e nas concentrações entre 0 a 2 mg/mL.

WATJEN et al.,(2007) isolaram da *E. addisoniae* seis pterocarpanos e realizaram o teste cometa para avaliar a genotoxicidade destes componentes químicos e dentre eles, somente o pterocarpano neurautenol induziu danos no material genético.

Neste estudo, não foi observada indução de dano ao DNA após a administração intraperitoneal do extrato etanólico *E. falcata* sobre o sangue periférico e cérebro, 24 horas após a administração dos extratos, em nenhuma

das doses obteve-se resultados significativos assim como na maioria dos poucos estudos encontrados a respeito da genotoxicidade dos extratos do gênero *Erythrina*, porém no mesmo estudo da *E. falcata* que comprovou a atividade contraceptiva da planta também realizou teste relacionados a mutagenicidade com a dose de 2g/20 mL e extratos do caule da planta. O extrato apresentou atividade mutagênica e danos ao DNA com o teste de micronúcleo (ORIHUELA e ISHIYAMA,2006) Sendo estes resultados diferentes ao deste estudo, por isso se faz necessário outros testes que irão testar o extrato de *E. falcata*, em diferentes concentrações e diferentes tipos de partes da planta.

Com freqüência a literatura relaciona a presença de alcalóides com danos ao DNA, como relata Idowu, et al., 2003, Fasola e Egunyomi, 2005, Funayama, et.al., 1996, Nakayasu et al., 1983, Boeira et al., 2002 e Meester,1995. O extrato de *E. falcata* possui constituintes que comprovadamente possuem ação genotóxica, como os alcalóides e o gênero de *Erythrina* possui muitos alcalóides comprovadamente existentes, conforme citado na introdução deste mesmo trabalho, porém também possui componentes fitoquímicos que são considerados anti-genotóxicos, como os flavonóides (MELIDOU, RIGANAKOS e GALARIS, 2005; BARBOUTI, et al., 2001; TENOPOULOU,et al., 2005; DOULIAS et al. 2005; PERSSON, et al., 2003).

Para a análise de atividade antioxidante por DPPH utilizaram-se quatro diferentes concentrações (1, 10,100 e 1000 µg/mL). Estudou-se também os valores de IC<sub>50</sub> (Inhibitory Concentration), que é a concentração necessária de uma substância para que haja a inibição de 50% de um determinado composto, neste caso, o radical DPPH. Comparou-se os valores do extrato etanólico de *E. falcata* com o flavonóide rutina e o ácido ascórbico, que são controles positivos para atividades antioxidantes, tendo como resultado que o extrato etanólico de *E. falcata* possui atividade antioxidante.

A atividade antioxidante detectada, parece estar relacionada a presença de flavonóides nos extratos, pois consultando a literatura encontramos frequentemente relatos de atividade antioxidante associada a esta classe o que não ocorre com a mesma intensidade para alcalóides e saponinas. No extrato das vagens e das flores da *E. lysistemon* foram isolados os seguintes alcalóides: 11-



$\beta$ - hidroxierisotramidina, 11- beta – methoxierisotramidina e 11- beta – hidroxierisotrina e não foi comprovado uma significativa inibição da atividade do radical DPPH (JUMA e MAJINDA,2004). Por outro lado no estudo realizado com o extrato de *E. latissima* onde foram isolados e caracterizados os seguintes flavonóides: erilatissim A, erilatissim B e erilatissim C e comprovou-se uma fraca inibição na atividade do radical DPPH destes flavonóides isolados (CHACHA,BOJASE-MOLETA e RUNNER, 2005). Investigações com o extrato de *E. mildbraedii* onde isolou-se o pterocarpano denominado erycristagallin e o constituinte químico mencionado obteve uma significativa inibição do radical DPPH ( NJAMEN, et al. 2003).

Com base nos resultados foi constatada uma significativa atividade antioxidante para o extrato de *E. falcata* testados de forma dose-dependente . Com uma IC<sub>50</sub> de 132,88  $\mu$ g/mL e concentração de 1000  $\mu$ g/ml de extrato etanólico de *E. falcata* inibiu em 87,73 % a presença de radicais DPPH, conforme mostra a tabela 3 no artigo em inglês.

A atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico de *E. falcata* foi determinado pelo monitoramento da produção de ácido benzóico hidroxilado (DHBA) pela produção do radical hidroxila atacando o ácido salicílico na xantina-hipoxantina oxidase (Owen et al., 1996). O extrato exibiu uma pronunciada atividade antioxidante *in vitro* de uma maneira dose-dependente. O extrato deferido (IC<sub>50</sub> = 0,425 mg/ml) teve uma atividade significativa, reduzindo a formação de ambos DHBA para 43,9% na concentração de 0,5mg/mL e para 15,3% na maior concentração utilizada (2mg/MI),conforme mostra figura 4 no artigo em inglês.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pôde-se verificar que o extrato das folhas de *E. falcata* nas doses estudadas é responsável por uma redução significativa da atividade exploratória e locomotora dos animais, levando a acreditar que estes efeitos possam estar relacionados à presença de alcalóides na espécie investigada. Não foi verificado efeito ansiolítico ou ansiogênico em ratos através do teste do labirinto em cruz elevado, nas doses testadas. Não foi observada indução de dano ao DNA, enquanto que, o extrato mostrou significativa atividade antioxidante. Pelo fato 1) do gênero *Erythrina* ter um amplo uso popular, 2) através de estudos mostrar diversas atividades biológicas e 3) nesta investigação *E. falcata* ter revelado uma alteração na atividade exploratória e locomotora dos animais, bem como atividade antioxidante, consideramos que outros estudos farmacológicos envolvendo diferentes modelos comportamentais e testes toxicidade são interessantes. Além disto, uma investigação mais precisa dos seus constituintes químicos se faz necessária.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMER, M. A. et al. **Three novel glycodienoid alkaloids from *Erythrina lysistemon***. Journal of Natural Products; v. 54, p. 161- 166, 1991.

ANTHONY, M. S.; CLARKSON, T. B.; WILLIAMS, J. K. **Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms**. Am. J. Clin. Nutr. v.68, p.1390-1393, 2000.

BARBOUTI, A. et al. **Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage**. Free Radic. Biol. Med., v.31, p. 490-498, 2001.

BARNES, S. et al. **Soy isoflavonoids and cancer prevention**. Underlying biochemical and pharmacological issues. Adv. Exp. Med. Biol., p. 87-100.

BOEIRA, J. M. et al. **Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by Comet Assay and Chromosome Aberration Test in Mammalian Cells in vitro**. Pharmacology and Toxicology, v.89, p. 287-294, 2001.

BOEKLHEIDE, V. et al. **The structure of beta- erythroidine and its derivatives**. J. Am. Chem. Soc., v.75, p. 2550-2558, 1953.

BOEKLHEIDE, V.; GRUNDON, M. F. **A characterization of  $\alpha$ -erythroidine**. J. Am. Chem. Soc., v.75, p. 2563-2566, 1953.

BORS, W. et al. **Flavonoids as: antioxidants determination of radical-scavenging efficiencies**. Journal Ethnopharmacology, p. 343-355, 1990.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E.; BERSET, C . **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. Lebensm. Wiss. U. Technol., v.28, p. 25-30, 1995.

CARLINI, E. A. ***Plants and the central nervous system.*** Pharmacology Biochemistry and Behaviour, v.75, p 501-512, 2003.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. ***Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on.*** Neuroscience and Biohehavioral Reviews., v.29, p.1193-1205, 2005.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. ***Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais.*** Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade Quím. Nova, v.21, n.1, p. 98-102, 1998.

CERUTTI, S. M. ***Análise da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico bruto de Erythrina falcata em camundongos (Mus musculus).*** Lecta-USF., v.18, n.2, p.75-83, 2000.

CHACHA, M; BOJASE- MOLETA, J.; RUNNER, R. T. ***Majinda, Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem Wood of Erythrina latissima.*** Phytochemistry., v.66, p. 99-104, 2005.

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

COLLINS, A. R. et al. ***The comet assay: topical issues.*** Mutagenesis., v.23, p. 143-151, 2008.

COSTA, A. F. ***Farmacognosia experimental.*** 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, p. 90-96, 2001.

COULOMBE, R. A.; RIEBEN, W. K. ***Lack of Apparent Base Sequence Preference of Activated Pyrrolizidine Alkaloid Cross-Links with DNA, in T. Poisonous Plants and Related Toxins,*** CAB International, London (in press), 2003.

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

DANTAS M. C.; OLIVEIRA, F. S.; BANDEIRA, S. M. ***Central nervous system effects of the crude extract of Erythrina velutina in rodents.*** Journal of Ethnopharmacology., v.94, p. 129-133, 2004.

DECKER, M. W. et al. ***Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors.*** European Journal of Pharmacology., v.280, p.79-89, 1995.

DIAS FILHO. et al. ***Neolignanas e análise do óleo essencial das folhas de Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. pallescens (C. DC.) Yunck.*** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.15, n.3, 2002.

Disponível em: <http://www.arvores.brasil.nom.br/eritrin/efalcata.htm>. Acesso realizado dia 07/10/2008.

DOULIAS, P.T. et al. ***Protection by tropolones against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and apoptosis in cultured Jurkat cells.*** Free Radic., v.39, p. 125–135, 2005.

ELDEEN, I. M. S; STADEN, J. V. ***In vitro pharmacological investigation of extracts some trees used in Sudanese traditional medicine.*** South African: Journal of Botany., v.73, p. 435-440, 2007.

ELGORASHI, E. E.; TAYLOR, J. L. S.; MAES, A. ***Screening of medicinal plants used in South of African traditional medicine for genotoxic effects.*** Toxicology letters., v.143, p. 195-207, 2003.

FARBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. ***The comet assay: a comprehensive review.*** Mutation Research., v.339, p. 37-59, 1995.

FASOLA, T. R.; EGUNYOMI, A. ***Nigerian usage of bark in phytomedicine.*** Journal of Plants People and Applied Research, p. 73-77. 2005.

FENECH, M. ***The in vitro micronucleus technique.*** Mutation Research, v.455, p. 81-95, 2000.

FENNEL, C. W.; LINDSEY, K. L.; MCGAW, L. J. ***Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology.*** Journal of Ethnopharmacology., v.94, p. 205-217, 2004.

FERNÁNDES, S. P. et al. ***Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides.*** European Journal of Pharmacology., v.539, p. 168-176, 2006.

FLAUSIANO, Jr. ***Análise fitoquímica e estudo biomonitorado da atividade ansiolítica de Erythrina mulungu em camundongos submetidos a diferentes modelos animais de ansiedade.*** São Paulo: USP, 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2006.

FUNAYAMA Y. et al. ***Effects of - and -carboline derivatives on DNA topoisomerase activities.*** Mutat. Res., v.349, p. 183–191, 1996.

GARIN-AGUILAR, M. E. et al. ***Effect of crude extracts of Erythrina Americana on aggressive behavior in rats.*** Journal of Ethnopharmacology, v. 69, p. 189-196, 2000.

GHOSAL, S.; DUTTA, S. K.; BHATTACHARYA, S. K. ***Erythrina - Chemical and pharmacological evaluation II: alkaloids of Erythrina variegata L.*** Journal of Pharmaceutical Sciences, v.61, n.8, p. 1274-7, 1972.

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

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, Jr., H. **Animal models of anxiety disorders**. In: Biological Psychiatry. D'HAENE, H.; DEN BOER, J. A.; WILNER, P.; WILEY & SONS, 2002.

GUECHEVA, D. P. T, et al. **Toxicidade e genotoxicidade do sulfato de cobre em planárias de água doce e camundongos**. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v.1, p. 171-175, 2006.

HALLIWELL, B. **Drug antioxidant effects. A basis for drugselection?** Drugs, v.42, p. 569-605, 1991.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. **Biologically relevant metal iondependent hydroxyl radical generation**. An update. FEBS Lett., v.307, p. 108-112, 1992.

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

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**. Clarendon Press, 1984.

HARGREAVES, R. et al. **Alkaloids of American species of Erythrina**. Lloydia, v.37, n.4, p. 569-580, 1974.

HARTMANN, A. et al. **Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay**. Mutagenesis, v.18, p. 45-51, 2003.

HAYASHI, M. et al. **In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay**. Mutation Research, v.312, p. 293-304, 1994.

HAYASHI, M.; HONMA, M. ***Evaluation of in vivo genotoxicity of chemicals-development and application of rodent micronucleus assay.*** Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyūjo hōkoku. Bulletin of National Institute of Health Sciences, v.125, p.17-34, 2007.

IDOWU, T. O. et al. ***Antimicrobial constituents of Chrysophyllum albidum seed cotyledons.*** Nigerian Journal of Natural Products and Medicine, v.7, p. 33-36, 2003.

IZQUIERDO, I. ***Memória.*** Porto Alegre: Artmed, 2002.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. ***Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures.*** *Neurobiology of Learning and Memory*, v.68, p. 285-316, 1997.

JUMA, B. F.; MAJINDA R. R. T. ***Erythrinaline alkaloids from the flowers and pods of Erythrina lysistemon and their DPPH radical scavenging properties.*** *Phytochemistry*, v.65, p. 1397-1404, 2004.

KOUM, V. A. et al. ***Sigmoiside E: A new antibacterial triterpenoid saponin from Erythrina sigmoidea*** (HUA) *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, v.21, n.3, p. 373-378, 2007.

KOUM, V. A.; NKENFAK, S. M. ***Two new triterpenoid saponins from Erythrina sigmoidea.*** *Journal of Natural Products*, v.54, p. 1288-1292, 1991.

KUHARA, K. et al. ***Carcinogenic activity of clivorine, a pyrrolizidine alkaloids isolated from Ligularia Dentata.*** *Cancer Lett*, v.10, p.117-122, 1980.



LEHMAN, A. J. **Actions of *Erythrina americana*, a possible curare substitute.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, p. 60,69, 1937.

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

LIU, Z.; MARTIN, L. J. **Isolation of mature spinal motor neurons and single-cell analysis using the comet assay of early low-level DNA damage induced in vitro and in vivo.** The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society, v.49, p. 957-972, 2001.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** São Paulo: Editora Plantarum, 1992.

MACGREGOR, J. T. et al. **Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes.** Mutation Research, v.189, p. 103-112, 1987.

MACHADO, M. S. et al. **An organic selenium compound attenuates apomorphine-induced stereotypy in mice.** Neuroscience Letters, v.410, n.3, p.198-202, 2006.

MARCHIORO, M. et al. **Efeitos do extrato bruto das folhas da *Erythrina velutina* sobre o comportamento de kindling: Um modelo experimental de epilepsia.** Universidade Federal de Sergipe, 2005.

MARCUZZO, R. G. **30 Árvores estratégicas da Mata Atlântica – Por um verde mais puro.** Prefeitura Municipal de Osório, 1998.

MEGIRIAN, D.; LEARY, D. E.; SLATER I. H. ***The action of some derivates of beta-eritroidina on peripheral neuro-effector system.*** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, p.113-122, 1995.

MEESTER, C. ***Genotoxic potential of carbolines: a review,*** *Mutat. Res.* 339, p. 139-153, 1995.

MELIDOU, M.; RIGANAKOS, K.; GALARIS, D. ***Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation.*** Free Radical Biology & Medicine, v.39, p. 1591-1600, 2005.

MIDDLETON, Mary. et al. ***PHYLOGENY OF APOCYNODEAE AND THE APSA CLADE (APOCYNACEAE S.L.).*** Annals of the Missouri Botanical Garden Article: p. 324–359, 1994.

MILINGTON, D. F.; STEIMAN, D. H.; RINEHART Jr., K. L. ***Isolation, gass chromatography- mass spectrometry and structures of new alkaloids from Erythrina folkersii krukoff, Moldenke and Erythrina saviiflora krukoff and Barneby.*** J. Am. Chem. Soc., p. 1907-1917, 1974.

MUKINDA, J.T.; SYCE, J. A. ***Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of Artemisia afra in rodents.*** Journal of Ethnopharmacology, v.112, p. 138-144, 2007.

NAKAYAMA, Hitoshi. et al. ***Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence.*** Nature, v.312, p. 121-127, 1983.

NAKAYASU, M. et al. ***Mutagenic activity of norharman and harman in Chinese lung cells in assay with diphtheria toxin resistance as a marker.*** Cancer Lett, v.17, p. 249-255, 1983.

NJAMEN, D. et al. ***Anti-inflammatory activity of erychristagallin, a pterocarpene from Erythrina mildbraedii.*** Eur. J. of Pharmacology, v. 468, p. 67-74, 2003.

NKENGFACK, A. E. et al. ***Cytotoxic isoflavones from Erythrina indica.*** Phytochemistry, v.58, p. 1113-1120, 2001.

NKENGFACK, A.E. et al. ***Indicanine A, a new 3-phenylcoumarin from root bark of Erythrina indica.*** Journal of Natural Products, v.63, p. 855-856, 2000.

NKENGFACK, A.E. et al. ***Prenylated isoflavanone from the roots of Erythrina sigmoidea.*** Phytochemistry, v.36, n.4, p. 1047-1051, 1994.

OLIVEIRA, et al. ***Análise do comportamento motor e exploratório em ratos tratados com Erythrina falcata B.*** FeSBE, 2005.

ONUSIC, G.M. et al. ***Effects of chronic treatment with a water–alcohol extract Erythrina mulungu on anxiety-related responses in rats.*** Biol. Pharm. Bull, v.26, n.11, p. 1538-1542, 2003.

ONUSIC, G.M. et al. ***Effect of acute treatment with a water-alcohol extract of Erythrina mulungu on anxiety-related responses in rats.*** Brazilian Journal of Medical Biological Research, v.35, n.4, p. 473-477, 2002.

ORIHUELA, P. A.; ISHIYAMA, V. ***Postcoital ingestion of the aqueous extract of Erythrina falcata Benth prevents pregnancy in the mouse.*** Journal of Ethnopharmacology, v.73, p. 307-310, 2006.

OWEN, R. W. et al. ***A high performance liquid chromatography method for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids.*** European Journal of Cancer Prevention, v.5, p. 233-240, 1996.

OZAK, A. et al. ***Acute lung injury in a healthy donor during mobilization of peripheral blood stem cells using granulocyte-colony stimulating factor alone.*** Haematologica, v.90, p. 90-96, 2004.

PARIS, F. et al. ***The anticonvulsant compound gabapentin possesses anxiolytic but not amnesic effects in rats.*** Behavioral Pharmacology, v.11, p.169-173, 2000.

PAULKE, A. et al. ***Determination of St. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection.*** Journal of Chromatography, v.832, p. 109-113, 2006.

PELLOW, S. et al. ***Validation of open:*** closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. Journal of Neuroscience Methods, v.14, p.149-167, 1985.

PEREIRA, P. et al. ***Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats.*** Basic and Clinical Pharmacology & Toxicology, v.99, p. 374-378, 2006.

PERSSON, E. F. et al. ***Prevention of oxidant-induced lysosomal cell death by lysomotropic iron-chelators.*** Free Radic. Biol. Med., v.34, p. 1295-1305, 2003.

PICADA, J. N. et al. ***DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine.*** Brain Research. Molecular Brain Research, v.114, p. 80-85, 2003.

QUEVEDO, A. S. et al. ***Brain Mechanisms Supporting Spatial Discrimination of Pain.*** The Journal of Neuroscience, v.27, n.13, p. 3388-3394, 2003.

RABELO, L. A. et al. ***Homohesperetin and phaseollidin from Erythrina velutina***. Biochemical Systematics and Ecology, v.29, n.5, p. 543-544, 2001.

RATNASOORIYA, W.; DHARMASIRI, M. G. ***Aqueous extract of Sri Lankan Erythrina indica leaves has sedative but not analgesic activity***. Fitoterapia, v.70, p. 311-312, 1999.

RAUPP, I. F. M. ***Efeito ansiolítico da administração prolongada do extrato de Erythrina velutina no labirinto em cruz elevado***. Faculdade de Ciência Biológicas, UFPR, TESE DE MESTRADO, 2006.

RIBEIRO, M. D. et al. ***Effect of Erythrina velutina and Erythrina mulungu in rats submitted to animal models of anxiety and depression***. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.39, p. 263-270, 2006.

RICE, E. C. et al. ***Functional food science and defence against reactive oxidative species***. British Journal of Nutrition, v.80, p. 77-112, 1996.

RODGERS, R. J. et al. ***Animal models of anxiety: an ethological perspective***. Braz. Jour. Méd. Biol. Res., v.30, p.289-304, 1997.

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

ROESLER, R. et al. ***Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats***. Neuroreport, v.11, p. 2537-2540, 2000.

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

RUKACHAISIRIKUL, T. et al. ***Antibacterial Pterocarpanes from Erythrina subumbrans***. Journal of Ethnopharmacology, v.5, p. 95-100, 2006.

RUKACHAISIRIKUL, T.; INNOK, P.; SUKSANRARN, A. ***Erythrina alkaloids and a Pterocarpan from the Bark of Erythrina subumbrans***. J. Nat. Prod., v.71, p. 156-158, 2008.

SAIDU, K. et al. ***Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of Erythrina senegalensis***. Journal of Ethnopharmacology, v.71, p. 275-280, 2000.

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

SCHMID, M.; HUTTER, J. K. ***Rapid detection of mutagen induced micronucleated erythrocytes by flow cytometry***. Journal Histochemistry and Cell Biology, v.75, 1976.

SILVA, I. D. et al. ***Involvement of rat cytochrome 1 A 1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol***. Mutagenesis, v.12, p. 383-390, 1997.

SILVA, J. D. A. et al. ***Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (Ctenomys torquatus) evaluated by multiple methods and tissues***. Mutation Research, v.470, p. 39-51, 2000.

SMITH, C. C. et al. ***Recommendations for design of the rat comet assay***. Mutagenesis, v.23, n.3, p. 233-240, 2008.

SPEIT G.; HARTMANN, A. ***The comet assay (single-cell gel test):*** a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. DNA Repair Protocols, v.113, p. 203-212,1999.

STANKEVINCS, L. et al. ***Genotoxic and antigenotoxic evaluation of extracts from Arenosclera brasiliensis, a brasilian marine sponge.*** Toxicology in vitro, v.22, p. 1869-1877, 2008.

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

TALLA, E. et al. ***The Isoflavonoid Anti-Inflammatory Principle Of Erythrina Addisoniae Stem Bark.*** J. Nat. Prod., v.66, p. 891-893, 2003.

TANNE, F. S. F. et al. ***Estrogenic effects of the ethyl-acetate extract of the stem bark of Erythrina lysistemom.*** Phytomedicine, v.17, p. 260-264, 2006.

TELIKEPALLI, H. et al. ***Isoflavonoids and a cinnamyl phenol from root extracts of Erythrina variegata.*** Phytochemistry, v.29, n.6, p. 2005-2007, 1990.

TENOPOULOU, M. et al. ***The role of compartmentalized redox-active iron on hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis.*** Biochem. J., v.387, p. 703-710, 2005.

TICE, R. R. et al. ***Report from working group on the in vivo mammalian bone marrow chorosomal aberration test.*** Mutation Research, v.312, p. 305-312, 1994.

TICE, R. R. et al. ***Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.*** Environmental and Molecular Mutagenesis, v.35, p. 206-221, 2000.

TUROLLA, M. S. R; NASCIMENTO, E. S. **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.42, n.2, p. 103-110, 2006.

VASCONCELOS, J. P. et al. **Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis.** Rev. bras. farmacogn., v.16, n.3, 2006.

VASCONCELOS, S. M. et al. **Central activity oh hidroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice.** Journal of Pharmacy & Pharmacology, v.56, p. 389-393, 2004.

VEERAPAPAN, A. et al. **Acute and subacute toxicity studies of *Aegle marmelos* Corr., an Indian medicinal plant.** Phytomedicine, v.14, p. 209-215, 2007.

VIANNA, M. R. M. et al. **Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.34, p. 233-240, 2001.

VIANNA, M. R. et al. **Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat.** Learning and Memory, v.7, p. 333-340, 2000.

WANJALA, C. C. W. et al. **Erythraline alkaloids and antimicrobial flavonoids of *Erythrina latissima*.** Planta Medica, v.68, p. 640-642, 2002.

WATJEN, W.; KULAWIK, A.; SUCHOW-SCHNITKER, A. K. **Pterocarpan phaseollin and neurautenol isolated from *Erythrina addisoniae* induce apoptotic cell death accompanied by inhibition of ERK phosphorylation.** Toxicology, v.242, n.207, p. 71-79, 2007.



WATJEN, W. et al. **Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and Fox.** O transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans* – Journal Archives of Toxicology, v.81, n.12, 2007.

WILLIAMS, M.; ROBINSON, J. L. **Binding of the nicotinic cholinergic antagonist, dihydro - erythroidine in rat brain tissue.** Journal of Neuroscience, v.4, p. 2906,1984.

XAVIER, C.A. G. **Perfil da população usuária de plantas medicinais e investigação fitoquímica das espécies nativas da mata atlântica na região de Osório.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Luterana do Brasil, 2006.

YAMANKA, H. et al. **Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the Salmonella / mammalian-microsome test.** Mutat. Res., v.68, p. 211-6, 1979.

YUTING, C. et al. **Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants.** Free radical Biology and Medicine, v.9, p. 19-21, 1990.

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

ZHANG, Y. et al. **Anti-osteoporotic effect of Erythrina variegata L. in ovariectomized rats.** Journal of Ethnopharmacology, v.109, p.165-169, 2007.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)