



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ANGÉLICA PEREIRA RIBEIRO

**OBTENÇÃO DE UM INSUMO FARMACÊUTIVO ATIVO VEGETAL COM
ATIVIDADE ANSIOLÍTICA OBTIDO A PARTIR DE *Erythrina velutina* Willd
(MULUNGU)**

**CAMPINA GRANDE – PB
2023**

ANGÉLICA PEREIRA RIBEIRO

**OBTENÇÃO DE UM INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO VEGETAL COM
ATIVIDADE ANSIOLÍTICA OBTIDO A PARTIR DE *Erythrina velutina* Willd
(MULUNGU)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Dantas de Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes

**CAMPINA GRANDE – PB
2023**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

R484o Ribeiro, Angelica Pereira.

Obtenção de um insumo farmacêutico ativo vegetal com atividade ansiolítica obtido a partir de *Erythrina velutina* Willd (Mulungu) [manuscrito] / Angelica Pereira Ribeiro. - 2023.
95 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.

"Orientação : Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS. "

"Coorientação: Prof. Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes , Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS. "

1. Ansiedade. 2. Erythrina velutina. 3. Potencial ansiolítico.

I. Título

21. ed. CDD 615

ANGÉLICA PEREIRA RIBEIRO

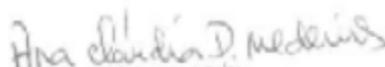
**OBTENÇÃO DE UM INSUMO FARMACÊUTIVO ATIVO VEGETAL COM
ATIVIDADE ANSIOLÍTICA OBTIDO A PARTIR DE Erythrina velutina Willd
(MULUNGU)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovada em: 11/12/2023

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba



Profa. Dra. Deysiane Oliveira Brandão (Examinadora)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte



Prof. Dr. Francisco José Batista de Lima Júnior (Examinador)
Centro Universitário Facisa

AGRADECIMENTOS

Á Deus, ele que é a minha força e inspiração, que me proporcionou saúde e paz para a realização deste trabalho, pelo amparo nos momentos difíceis e por todos os momentos vividos, sou eternamente grata a ele por tudo em minha vida.

Aos meus pais Audenor e Maria do Céu, pelo amor e dedicação. Por estarem comigo em todos os momentos e por me incentivar a continuar em frente pela busca de conhecimentos, aos meus irmãos por todo companheirismo e apoio. Muito obrigada!

Aos meus queridos avós (*in memoriam*) também dedico este momento.

Ao meu marido Elder pela compreensão, amor e companheirismo, amizade, paciência, apoio e alegria. A minha filha Natalie, cada conquista minha está refletido o amor que sinto por ela.

À minha orientadora, Prof. Dr. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, agradeço por todo ensinamento e conhecimento transmitido, uma excelente profissional que contribuiu para a minha formação acadêmica.

À banca examinadora, pelo tempo dedicado à avaliação do trabalho e pelas contribuições.

Aos meus amigos de caminhada, em especial, Natália Lira, Karolayne Barbosa, Fernanda, Lucas, Luana, Giovanna e Pablo, por todos os momentos compartilhados e inesquecíveis.

A instituição UEPB pela oportunidade e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Á todos que diretamente e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A ansiedade apresenta-se como um dos principais transtornos mentais da atualidade, configurando-se, portanto, como um instrumento de pesquisa de grande interesse, principalmente no que se diz respeito a alternativas terapêuticas eficazes e com menos efeitos adversos. Na medicina popular brasileira, a *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae) popularmente conhecida como bico-de-papagaio ou mulungu, consiste em uma planta encontrada em regiões tropicais e subtropicais do país, pelo qual o decocto da casca é utilizado contra algumas verminoses e principalmente como sedativo e calmante. Desta forma, este trabalho tem por objetivo produzir e padronizar um insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) de uma planta medicinal oriunda do semiárido brasileiro, com potencial ansiolítico. Inicialmente, foi obtido o extrato hidroalcolólico da casca de *E. velutina*, por diferentes métodos extrativos (ultrassom e turbólise) e por diferentes concentrações de solvente, obtendo-se assim os IFAV. Em seguida, foi realizada a prospecção fitoquímica buscando quantificar os principais metabólitos presentes. A partir dessa investigação, o extrato mais promissor foi submetido a padronização do marcador químico através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a quantificação por meio da espectroscopia na região do UV-visível. Posteriormente, avaliou-se o potencial tóxico in vivo em dose única (2000 mg/kg) utilizando camundongos Swiss. Para a avaliação da atividade ansiolítica do extrato seco de *E. velutina* foi realizado os testes comportamentais, a exemplo, Teste em Labirinto cruz elevada (TLCE), Teste de Movimentação Espontânea (TME) e teste de barra giratória (rota rod). Em seguida, o extrato foi associado a misturas binárias com adjuvantes farmacotécnicos por meio de técnicas como, DTA, TG, FTIR e técnicas quimiométricas (PCA e HCA), no qual avaliou-se a presença ou ausência de incompatibilidades. Como resultado, os estudos revelaram que o método extrativo que apresentou maior quantidade de metabólitos secundários do extrato de *E. velutina* foi o de turbólise, na proporção água:etanol 30/70 v/v. A toxicidade aguda do extrato realizada em camundongos não evidenciou nenhuma toxicidade, classificando-o como atóxico. Os testes farmacológicos in vivo revelaram que, o extrato de *E. velutina* na dose de 250 mg Kg⁻¹ demonstrou maior potencial ansiolítico quando comparado com as outras doses administradas (62,5 e 125 mg Kg⁻¹). Durante a investigação de compatibilidade, foram observadas algumas evidências de interação entre extrato e excipientes por meio das técnicas e DTA, TG, PCA e HCA, porém na técnica de FTIR não foi observado interações químicas entre as misturas binárias. Deste modo, os excipientes que se mostraram promissores para compor uma futura formulação foram a lactose, hidroxipropilmetilcelulose e estearato de magnésio. Portanto, o

estudo permitiu a obtenção de um IFAV de E. velutina com atividade ansiolítica comprovada e promissora no combate a transtornos ansiosos como uma alternativa terapêutica.

Palavras-chave: ansiedade; Erythrina velutina; potencial ansiolítico.

ABSTRACT

Anxiety is one of the main mental disorders of today, thus configuring itself as a research tool of great interest, especially regarding effective therapeutic alternatives with fewer adverse effects. In Brazilian folk medicine, *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae), popularly known as "bico-de-papagaio" or "mulungu," is a plant found in tropical and subtropical regions of the country, for which the decoction of the bark is used against some parasitic infections and mainly as a sedative and calming agent. Therefore, this work aims to produce and standardize a plant-based active pharmaceutical ingredient (API) from a medicinal plant originating from the Brazilian semi-arid region, with potential anxiolytic properties. Initially, the hydroalcoholic extract of *E. velutina* bark was obtained using different extraction methods (ultrasound and turbolysis) and different solvent concentrations, resulting in the APIs. Subsequently, phytochemical screening was carried out to quantify the main metabolites present. Based on this investigation, the most promising extract underwent standardization of the chemical marker using high-performance liquid chromatography (HPLC) and quantification through UV-visible spectroscopy. Subsequently, the *in vivo* toxic potential was evaluated in a single dose (2000 mg/kg) using Swiss mice. To assess the anxiolytic activity of the dried extract of *E. velutina*, behavioral tests were conducted, such as the Elevated Plus Maze Test (EPMT), Spontaneous Locomotor Activity Test (SLAT), and Rotarod Test. Next, the extract was combined with binary mixtures of pharmaceutical excipients using techniques such as Differential Thermal Analysis (DTA), Thermogravimetric Analysis (TG), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), and chemometric techniques (PCA and HCA) to assess the presence or absence of incompatibilities. As a result, the studies revealed that the extraction method that yielded the highest quantity of secondary metabolites from *E. velutina* extract was turbolysis, in the ratio of water: ethanol 30/70 v/v. Acute toxicity of the extract in mice did not show any toxicity, classifying it as non-toxic. *In vivo* pharmacological tests revealed that the *E. velutina* extract at a dose of 250 mg/kg demonstrated greater anxiolytic potential when compared to other administered doses. During the compatibility investigation, some evidence of interaction between the extract and excipients was observed through DTA, TG, PCA, and HCA techniques, but no chemical interactions were observed in the FTIR technique. Thus, excipients that showed promise for composing a future formulation were lactose, hydroxypropylmethylcellulose, and magnesium stearate. Therefore, the study allowed for the production of an API from *E. velutina* with proven anxiolytic activity, promising in the treatment of anxiety disorders as a therapeutic alternative.

Keywords: anxiety; *Erythrina velutina*; anxiolytic potential

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal.....	16
Figura 2 – <i>Erythrina velutina</i> Wild.....	23
Figura 3 – Florescimento (A e B) e senescência foliar (C) de <i>Erythrina velutina</i> Wild e frutos (D).....	25
Figura 4 - Desenho esquemático da avaliação de toxicidade aguda.....	33
Figura 5 – Desenho esquemático do estudo comportamental (Labirinto em Cruz Elevado).....	35
Figura 6 – Desenho esquemático do estudo comportamental (Campo Aberto).....	35
Figura 7 – Desenho esquemático do estudo comportamental (<i>Rota rod</i>)	36
Figura 8 – Cromatograma do extrato rotoevaporado de <i>E. velutina</i> (A) e de quercetina (B) em 415nm.....	44
Figura 9 - Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para quercetina no comprimento de onda de 415 nm.....	46
Figura 10 – Curva de calibração do padrão de quercetina em 415 nm.....	47
Figura 11 – Gráfico de resíduos.....	49
Figura 12 - Efeito da administração oral do <i>EEV</i> em camundongos <i>Swiss</i> na porcentagem do número de entradas nos braços abertos.....	54
Figura 13 - Efeito da administração oral do <i>EEV</i> em camundongos <i>Swiss</i> na porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos.....	55
Figura 14 - Efeito da administração oral do <i>EEV</i> em camundongos <i>Swiss</i> no número de espreitas.....	56
Figura 15 - Efeito da administração oral do <i>EEV</i> em camundongos <i>Swiss</i> no número de mergulhos de cabeça.....	57
Figura 16 - Efeito da administração oral do <i>EEV</i> em camundongos <i>Swiss</i> no número de grooming (autolimpeza).	58
Figura 17 - Efeito da administração oral do <i>EEV</i> em camundongos <i>Swiss</i> no número de quadrados percorridos.	59
Figura 18 - Efeito da administração oral do <i>EEV</i> em camundongos <i>Swiss</i> no número de <i>rearings</i>	59
Figura 19 - Efeito da administração oral do <i>EEV</i> em camundongos <i>Swiss</i> no número de <i>grooming</i>	60
Figura 20 - Efeito da administração oral do <i>EEV</i> em camundongos <i>Swiss</i> no teste de rota rod.....	61
Figura 21 - Perfis de DTA (A) e TG (B) do extrato rotoevaporado de MLG.....	62

Figura 22. Perfis de DTA das misturas binárias do extrato MLG com excipientes farmacêuticos.....	63
Figura 23 - Perfis de DTA das misturas binárias do extrato MLG com excipientes.....	65
Figura 24 – Análise de componentes principais (A) e análise hierárquica (B) dos dados de DTA das misturas binárias do extrato MLG com os excipientes farmacêuticos.....	69
Figura 25 - Perfis de TG das misturas binárias do extrato MLG com excipientes farmacêuticos.....	72
Figura 26 - Curvas de TG das misturas binárias do extrato MLG com excipientes farmacêuticos.....	74
Figura 27 – Análise de componentes principais (A) e análise hierárquica (B) dos dados de TG das misturas binárias do extrato MLG com os excipientes farmacêuticos.....	77
Figura 28 – Espectro FTIR do extrato rotoevaporado de <i>E. velutina</i> (MLG).....	79
Figura 29 – Espectros FTIR referentes às misturas binárias do extrato MLG com excipientes farmacêuticos: amido (A), carboximetilcelulose (B), estearato de magnésio (C) e lactose (D).....	80
Figura 30 – Espectros FTIR referentes às misturas binárias do extrato MLG com excipientes farmacêuticos.....	82
Figura 31 – Análise de componentes principais (A) e análise hierárquica (B) dos dados de FTIR das misturas binárias do extrato MLG com os excipientes farmacêuticos.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados da curva de Ringbom de quercetina por espectrofotometria no UV.....	37
Tabela 2 – Excipientes farmacêuticos utilizados no estudo de compatibilidade.....	40
Tabela 3 – Polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados determinados no extrato hidroalcolólico da casca de <i>Erythina velutina</i>	43
Tabela 4 – Construção da curva de Ringbom por espectrofotometria UV para quercetina em 415 nm.....	45
Tabela 5 – Valores de absorvância determinados para a curva analítica de quercetina pelo espectrofotométrico na região do UV em 415 nm.....	47
Tabela 6 – Parâmetros para validação da linearidade do método cromatográfico.....	48
Tabela 7 – Determinação da precisão intra-dia.....	49
Tabela 8 – Determinação da precisão intermediária.....	50
Tabela 9 – Determinação da exatidão do método analítico em três níveis de concentração.....	50
Tabela 10 – Avaliação da robustez do método analítico por espectrofotometria na região UV.	51
Tabela 11 – Resultados de toxicidade aguda de <i>E. velutina</i>	52
Tabela 12 - Dados DTA do extrato rotaevaporado de <i>E. velutina</i> , excipientes e suas misturas binárias nas proporções 1:1 (IFAV:excipiente)	67
Tabela 13 – Dados de TG referentes às etapas de decomposição do extrato de <i>E. velutina</i> , excipientes e suas misturas binárias nas proporções 1:1 (IFAV:excipiente)	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 Ansiedade	15
3.2 Tratamento convencional	17
3.3 Plantas medicinais com potencial ansiolítico	18
3.4 <i>Erythrina spp</i>	20
3.5 <i>Erythrina velutina</i> WILLD	22
3.6 Estudo de compatibilidade	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Matéria-prima vegetal e obtenção dos extratos	30
4.2 Prospecção fitoquímica	30
4.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais	30
4.2.2 Determinação do teor de flavonoides totais	31
4.2.3 Determinação do teor de taninos totais	31
4.3 Local de pesquisa e procedimentos éticos	31
4.4 Animais e aspectos éticos	32
4.5 Toxicidade aguda oral	32
4.6 Atividade ansiolítica	34
4.6.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)	34
4.6.1 Labirinto do campo aberto	35
4.6.2 Teste do Rota <i>rod</i>	36
4.7 Análise estatística	36
4.8 Padronização do marcador químico	36
4.8.1 Identificação do marcador químico por CLAE	37
4.8.2 Curva de Ringbom	37
4.8.3 Linearidade	38
4.8.4 Repetibilidade e precisão intermediária	39
4.8.5 Exatidão	39
4.8.6 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	39
4.8.7 Robustez	40

4.9 Caracterização do extrato por técnicas analíticas (Estudo de compatibilidade)	40
4.9.1 Análise térmica	40
4.9.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	41
4.10 Análise quimiométrica	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Prospecção fitoquímica	42
5.2 Determinação e quantificação do marcador químico da <i>E. velutina</i>	44
5.3 Prospecção da atividade biológica do extrato <i>E. velutina</i>	51
5.3.1 Toxicidade aguda	51
5.3.2 Atividade ansiolítica	53
5.3.2.1 <i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</i>	53
5.3.2.2 <i>Teste de movimentação espontânea</i>	59
5.3.2.3 <i>Teste de Rota Rod</i>	61
5.4 Estudo de compatibilidade	62
5.4.1 Análise térmica diferencial (DTA)	62
5.4.2 Termogravimetria (TG)	71
5.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	79
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXO A – CERTIFICADO	95

1 INTRODUÇÃO

As plantas são consideradas como uma fonte histórica de compostos com potenciais medicinais, ainda assim sendo considerada um meio primordial no tratamento de saúde para a população mundial (ROMANELLI et al, 2015). Inúmeros compostos farmacológicos com potenciais atividades farmacológicas já foram detectadas nas plantas, os quais são bastante utilizadas no tratamento e cura de patologias distintas além de resultar no desenvolvimento de medicamentos com eficácia significativa (WANGCHUK, 2018).

O uso de plantas como profilaxia, tratamento e cura de doenças, é uma das práticas medicinais mais convencionais da humanidade. Nos países em desenvolvimento, 65-80% da população dependem das plantas medicinais como única maneira de acesso aos cuidados básicos de saúde, promovendo informações válidas com o tempo, sendo acumuladas durante séculos (MOTALEB, et al., 2011; NEWMAN; CRAGG, 2013).

A flora apresenta uma grande biodiversidade e potencial medicinal, bastante empregada pelas populações locais, como no Brasil. Entretanto, o número de fitoterápicos com registro de licença pelos órgãos de saúde, ainda é considerado reduzido quando comparado a outros países, principalmente quando se trata de compostos por plantas nativas (CECÍLIA et al, 2018).

A maioria da população utiliza a fitoterapia, porém a presença de efeitos adversos, custo elevado em medicamentos sintéticos explica o grande aumento no uso dos medicamentos fitoterápicos (NÓBREGA et al., 2017). Em países como os Estados Unidos da América, a implementação da denominada "medicina alternativa" é considerável, embora os registros apresentem diferenças significativas quanto à frequência de uso de plantas medicinais e fitoterápicos pela população (16,5 a 42,0%), sendo que 5,5 a 20,5% o fazem para circunstâncias relacionadas à ansiedade (SAVAGE et al., 2018).

Na área da psicofarmacologia, alguns transtornos humorais como a ansiedade generalizada, a síndrome do pânico, o transtorno obsessivo-compulsivo e fobias, são exemplos mais comuns de doenças mentais no mundo, os quais tornaram-se instrumentos de pesquisa de grande interesse (RABBANI, 2008). Dentre os medicamentos utilizados para tratar transtornos de ansiedade, predominam os estimuladores do ácido γ -aminobutírico (GABA) e principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. Os benzodiazepínicos estão entre as primeiras opções, sendo bastante utilizados nos últimos anos para tratar as diversas formas de ansiedade. Apesar de promoverem benefícios bem descritos e caracterizados, a ocorrência

significativa de efeitos colaterais, como sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e dependência física, torna-se preocupante a relevância de uso (PINHEIRO, 2018).

Os medicamentos psicotrópicos, ou psicofármacos, são modificadores seletivos do sistema nervoso central, sendo a principal classe medicamentosa utilizada para tratamento dos transtornos comportamentais e de humor. São classificados conforme a indicação clínica e o efeito terapêutico em: ansiolíticos, hipnóticos e sedativos, antipsicóticos e antidepressivos, dentre outros (ANDRADE et al., 2017). Entretanto, devido a efeitos adversos resultantes destes, 43% dos pacientes que apresentam transtornos da ansiedade usam, na maioria das vezes, outra forma complementar de terapia. Por isso, indústrias farmacêuticas estão encaminhando estudos para encontrar alternativas medicinais que apresentem efeitos ansiolíticos mais específicos, como por exemplo, o tratamento com plantas medicinais. Essas plantas parecem promover efeito desejado no controle da ansiedade, como, ação sedativa e calmante (SAVAGE et al., 2017).

Erythrina mulungu (Fabaceae) é uma árvore nativa do sul do Brasil, conhecida popularmente como mulungu ou árvore de coral devido às suas flores avermelhadas. Pertencente ao gênero *Erythrina*, no Brasil estão incluídas as espécies *E. velutina* (generalizada nas planícies e margens dos rios das regiões semiáridas de Nordeste do Brasil) e *E. mulungu* (nativo do sul do Brasil) (SILVA, 2008).

Segundo Palumbo et al. (2016), tinturas e decocções produzidas com folhas ou cascas de *E. mulungu* são utilizadas constantemente na medicina tradicional brasileira como sedativos, e para tratar insônia e depressão. Em outros estudos foi observado que as plantas dessa referida espécie apresentaram atividade com efeito reparador de distúrbios do sistema nervoso central (MOTALEB et al., 2011). Também foi demonstrado que os metabólitos alcaloides, presentes na *E. mulungu*, amenizaram o comportamento agressivo de animais de modo semelhante aos efeitos desenvolvidos por compostos benzodiazepínicos como o diazepam (HUSSON; MOLS; POLL-FRANSE, 2011). Além disso, algumas espécies de *Erythrina* foram relatadas por conter uma nova classe de alcaloides fitoestrógenos, denominados alcaloides eritroides (DJIOGUE et al., 2014).

Como alternativa aos efeitos indesejados causados pelos insumos farmacêuticos ativos (IFA) convencionais para o tratamento de depressão e ansiedade, esse estudo objetiva obter um insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) com atividade ansiolítica obtido a partir do extrato da casca de *Erythrina velutina* Willd (Mulungu).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter e padronizar um insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) de uma planta medicinal oriunda do semiárido brasileiro, com potencial ansiolítico.

2.2 Objetivos Específicos

- a) obter os extratos hidroalcoólicos da casca de *Erythrina velutina*, por diferentes métodos extrativos;
- b) obter o IFAV através da secagem por rotoevaporação do extrato hidroalcoólico selecionado;
- c) realizar prospecção fitoquímica para quantificação de metabólitos secundários a partir dos extratos obtidos;
- d) efetuar a identificação, quantificação e validação do marcador químico do IFAV por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- e) investigar o potencial ansiolítico do extrato por meio do modelo de labirinto em cruz elevado;
- f) avaliar o potencial sedativo e miorelaxante do extrato de *Erythrina velutina* empregando os ensaios de campo aberto e rota rod.
- g) caracterizar IFAV por diferentes técnicas analíticas;
- h) realizar um estudo de compatibilidade entre o IFAV e as misturas binárias através de técnicas analíticas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Ansiedade

Os transtornos de ansiedade são os distúrbios psiquiátricos mais frequentes, que chega a provocar enorme sofrimento e até comprometimento funcional de gravidade considerável. A ansiedade é um estado psíquico adaptativo do ser humano, entretanto, quando se manifesta de maneira excessiva e prevalente pode alcançar níveis patológicos, causando prejuízo ao bem estar e qualidade de vida do ser humano, se caracteriza como doença (OLIVEIRA; MARQUES; SILVA, 2020).

A ansiedade, é uma palavra derivada do grego *agkho* que tem significado de estrangular, oprimir e sufocar, é definida como uma condição amedrontadora ou apreensiva, de natureza subjetiva, seguido por variações fisiológicas, cognitivas e emocionais, a exemplo: elevação da pressão arterial, bem como da frequência respiratória, pensamentos negativos e aumento do estado de vigília e inquietação (PRATT, 1992; BRANDÃO, 2001; VIANA, 2010; GRAEFF, GUIMARÃES, 2012).

Campos (2017), caracterizou a ansiedade como um estado emocional desagradável no qual existem sentimentos de perigo constante, caracterizado por inquietação, tensão ou apreensão. É um aviso a uma ameaça desconhecida, que promove uma preparação ao organismo para decidir quais maneiras necessárias a fim de impedir a ocorrência desses possíveis prejuízos, ou, pelo menos, diminuir suas consequências.

De acordo com estudos sobre Saúde Mental da OMS (2018), os distúrbios de ansiedade configuram a segunda situação mental a provocar incapacidade na maioria dos países investigados, a depressão se comporta como sendo a primeira desses quadros. No Brasil, a frequência de transtornos de ansiedade configura mais de 9 % da população, somando mais de 18 milhões de brasileiros, caracterizando como o país mais ansioso no mundo. Alguns fatores estão associados a ansiedade, a exemplo, os fatores sócios demográficos, tal transtorno é duas vezes mais prevalente em mulheres, mais corriqueiro em jovens do que em idosos, além disso, mais frequente em indivíduos de menor escolaridade, separados ou viúvos e pessoas expostas a eventos traumáticos, crimes por exemplo. As patologias principais relacionadas a ansiedade são a depressão e doenças físicas crônicas, a exemplo a insuficiência coronariana (MANGOLINI et al., 2019).

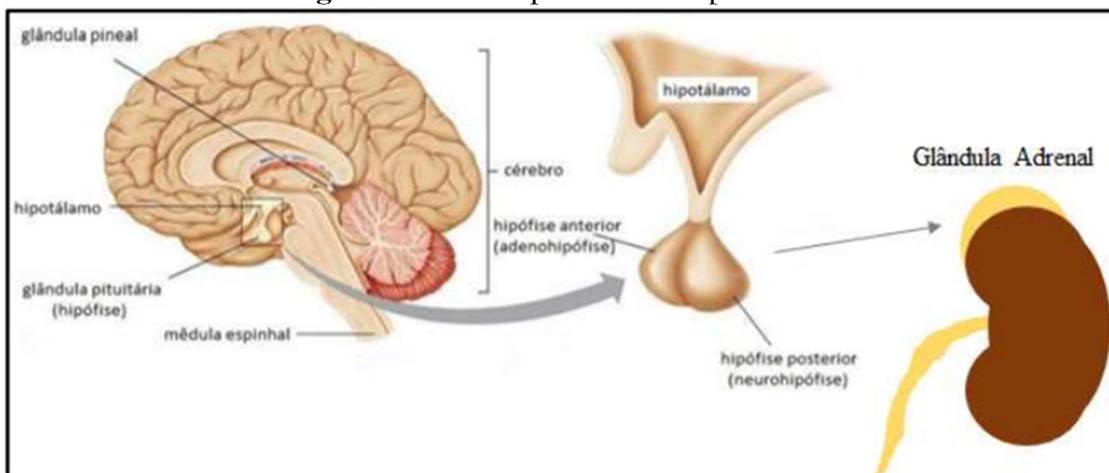
A ansiedade é uma das mais frequentes desordens psiquiátricas, cuja etiologia depende de uma influência mútua entre predisposição individual e fatores ambientais. No Brasil, os transtornos ansiosos encontram-se entre os mais prevalentes diagnósticos psiquiátricos, sendo

as mulheres mais afetadas que os homens, além de ser mais frequente em pacientes mais jovens; como também aponta que a ansiedade varia inversamente com os níveis educacionais e o nível socioeconômico (BRANDÃO, 2015).

A ansiedade é ocasionada por meio do desequilíbrio da regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Figura 1), em conjunto com o sistema simpático adrenomedular, os quais ficam hiperativos, provocando descompensação de atividades do sistema nervoso autônomo, o que justifica os sintomas relatados pelos pacientes durante os eventos de ansiedade. Além disso, ocorre aumento dos níveis de cortisol, ocasionando a ativação das áreas ligadas ao pensamento introspectivo como o córtex cingulado anterior e pré-frontal dorso medial (PAULESU et al., 2009). Em vista disso, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) permanece ativo, causando o sistema de luta/fuga (SANTIAGO et al., 2022).

Configura-se como um quadro de funcionamento cerebral associado a problemas externos, com influência no desempenho de fibras nervosas, as quais regulam o estado excitado do sistema nervoso central e gonadotrófico. Com isso, ocorre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), ocasionando sintomas neurovegetativos, a exemplo, taquicardia, elevação da respiração, tensão muscular e insônia, promovendo a ativação de sistemas cerebrais relacionados ao sistema de fuga ou luta (BRAGA et al., 2010).

Figura 1 – Eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal



Fonte: Adaptado de Braga et al., 2010.

O transtorno de ansiedade é caracterizado como uma situação clínica no qual as respostas emocionais e fisiológicas se comportam de maneira desproporcional a estímulos submetidos ao indivíduo, de modo que o mesmo manifeste uma alteração de comportamento que não esteja associado com outras doenças (Manual diagnóstico e estatístico de transtornos

mentais da Associação Psiquiátrica Americana, quinta edição; DSM-5). O distúrbio de ansiedade mais frequente é o transtorno de ansiedade generalizada bastante conhecido pela sigla (TAG). Segundo a DSM-5, pessoas com TAG manifestam quadros de ansiedade excessiva em eventos do dia-a-dia, sofrimento e dano funcional em consequência do transtorno. Além disso, também podem apresentar sintomas físicos, a exemplo alterações do sono, inquietação, tensão muscular, problemas gastrointestinais, sudorese e dores de cabeça crônicas (CONCEIÇÃO, 2018).

Na área clínica, pode-se dizer que a ansiedade é uma doença associada aos distúrbios psiconeuróticos, a qual está diretamente ligada ao medo apropriado e, com frequência, responde a propósitos psicobiológicos ativos, por isso, ela não é facilmente explicada em termos biológicos ou psicológicos. As hipóteses atuais implicam em hiperatividade dos sistemas adrenérgicos ou alteração dos sistemas serotoninérgicos no sistema nervoso central (NARDI et al., 2012).

3.2 Tratamento convencional

O tratamento dos transtornos de ansiedade engloba uma série de medidas não farmacológicas e farmacológicas. Entre as medidas não farmacológicas, destacam-se a psicoterapia cognitivo comportamental considerada a mais eficaz, apesar de outros tipos de psicoterapia também promover melhoria no quadro clínico do paciente (REYES et al., 2017).

Ademais, estudos demonstram que a inserção da prática de exercícios físicos no cotidiano do paciente, ao menos duas vezes durante a semana, promovem redução dos sintomas de ansiedade. Do mesmo modo que ao melhorar o condicionamento cardiorrespiratório, diminui os sintomas ansiosos, apesar de que, se o paciente dispensar das longas horas de atividades sedentárias, essa condição deixa de ser notada (HALLGREN et al., 2020). Além disso, práticas integrativas também vem sendo analisadas e mostram-se como medida eficaz complementando o tratamento de indivíduos com transtornos de ansiedade, a exemplo, o método de meditação conhecido como *Mindfulness* (MESQUITA et al., 2019) e acupuntura (GOYATÁ et al., 2016).

Com relação ao tratamento farmacológico, os medicamentos alopáticos são considerados as drogas de preferência dos profissionais da saúde mental no combate aos transtornos ansiosos. Embora, os medicamentos sintéticos melhorem os sintomas do paciente, eles são responsáveis também pela presença de efeitos adversos, a exemplo, sono, sedação, letargia e dependência física, entre outros, apresentando também como desvantagem o elevado custo (SILVA; SILVA, 2018).

O tratamento convencional da ansiedade é feito por meio da utilização de antidepressivos e ansiolíticos, medicamentos que exibem eficácia relativa além de problemas com relação ao custo, bem como menor tolerabilidade e baixa adesão pelos pacientes. Também apresentam efeitos colaterais em determinados indivíduos (HOROWITZ, 2021).

Entre os fármacos utilizados no tratamento de distúrbios de ansiedade, destaca-se os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSS), inibidores da recaptação de serotonina-norepinefrina (IRSNS), benzodiazepínicos, a buspirona e antagonistas β -adrenérgicos (BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018).

Os fármacos ansiolíticos são compostos por substâncias que promovem o controle da ansiedade dos indivíduos acometidos por alterações relacionadas ao sistema nervoso central, afetando seu comportamento e suas emoções (FÁVERO; SATO; SANTIAGO, 2017).

Os antidepressivos são a classe de fármacos de primeira escolha, os quais promovem efeitos positivos, entretanto, para amenizar os sintomas dos transtornos ansiosos os mesmos necessitam de um tempo, mas precisamente em torno de quatro semanas. Devido a isso, metade dos pacientes acometidos por esses distúrbios, não aderem ao tratamento completo durante os seis primeiros meses o que explica o motivo do abandono da farmacoterapia no começo do tratamento farmacológico (KOEN; STEIN, 2011; COMBS, MARKMAN, 2014).

Os benzodiazepínicos atuam reduzindo os sintomas ansiosos de forma rápida, são usualmente utilizados no tratamento de distúrbios ansiosos de curta duração, porém, é contraindicado em casos de tratamento a longo período, devido ao risco de tolerância e dependência (NIELSEN; HALSEN; GOTZSCHE, 2012; VINKERS; OLIVIER, 2012).

Diante disso, embora os benzodiazepínicos sejam responsáveis por promover efeitos benéficos bem relatados e descritos, os seus efeitos adversos são bastante prevalentes, abrangendo desde sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada até dependência física (SADOCK, 2007). Por essa razão, quase metade (43%) dos pacientes que fazem uso dos benzodiazepínicos para tratar os transtornos ansiosos incluem outra alternativa complementar de terapia (ERNST, 2006), sendo assim, várias indústrias farmacêuticas estão dirigindo estudos com o objetivo de descobrir novas alternativas terapêuticas que possuam potencial ansiolítico mais específico, a exemplo, o tratamento com plantas medicinais (SOUZA, 2008).

3.3 Plantas medicinais com potencial ansiolítico

Compostos naturais tem sido considerado como uma fonte provável de agentes terapêuticos. O grande arsenal de plantas medicinais utilizadas em países em desenvolvimento para tratamento e manutenção da saúde tem sido bastante documentada (ARBAIN et al., 2021).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial necessita de medicamentos à base de plantas medicinais com o intuito de promover o cuidado a saúde (OMS, 2000).

Os medicamentos que são disponíveis hoje no mercado farmacêutico, sua grande maioria são de origem vegetal ou foram sintetizadas a partir de substâncias naturais bioativas, por isso extratos vegetais vêm sendo considerado um importante alvo de estudo de muitos pesquisadores das diversas áreas biológicas (ROCHA E LOPES et al., 2011).

As plantas medicinais apresentam uma gama de metabólitos secundários, dentre eles os polifenóis, que podem se concentrar em grupos específicos de órgãos vegetais, como folhas, frutos, raízes e caules. Tais substâncias bioativas são responsáveis por diversas funções biológicas. Os flavonoides são compostos polifenólicos largamente encontrados em plantas vasculares. Eles são classificados como um grupo de fitonutrientes, muito comum em vegetais, frutas e plantas medicinais, ocorrem nas formas livres, glicosídeos e derivados de metilados (KARAK, 2019).

Tratamentos que tem como base o uso de plantas medicinais, são característicos da fitoterapia, as quais são utilizadas de diferentes formas, como: a planta in natura, chá, extrato, entre outros. O Brasil é o país com maior diversidade vegetal já documentada do mundo, o mesmo apresenta um grande potencial para o tratamento da ansiedade, utilizando a fitoterapia. Devido ao interesse popular sobre esse tipo de terapia ter crescido nos últimos anos, o Ministério da Saúde tende a fortalecer o uso da prática no SUS (PIMENTA, 2014).

Segundo a legislação sanitária brasileira, o medicamento fitoterápico é obtido utilizando-se somente matérias-primas ativas vegetais, as quais são validadas através da eficácia e segurança através de pesquisas etnofarmacológicas, baseadas em utilização, documentações tecnocientíficas ou indicações clínicas (SILVA; SILVA, 2018).

Os transtornos de ansiedade são condições predominantes e incapacitantes, várias vezes crônicas e excessivamente co-mórbidas. Ainda que os tratamentos convencionais e as intervenções psicológicas, sejam tratamentos de primeira linha, os fitoterápicos propõem uma alternativa complementar com segurança e eficácia (SARRIS; MCLNTYRE; CAMFIELD, 2013).

Como forma de tratamento para ansiedade, o mais convencional são as psicoterapias e as modalidades farmacológicas. Dentre estas, os benzodiazepínicos estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo e são utilizados principalmente como ansiolíticos e hipnóticos, além de promover ação miorelaxante e anticonvulsivante. Um dos receios quanto ao uso dos benzodiazepínicos é seu potencial para o abuso, dependência, abstinência, tolerância,

sedação, prejuízos psicomotores e sua interação com o álcool ou outras drogas hipnóticas. Vale salientar que o álcool é um contribuinte comum para as mortes envolvendo o uso de benzodiazepínicos (CAMPOS, 2017). Ademais, os benzodiazepínicos além de serem utilizados no tratamento da ansiedade, eles apresentam uma extensa lista de efeitos adversos, englobando sonolência, relaxamento muscular, esquecimento e possível dependência psíquica (EDINOFF et al., 2021).

As opções fitoterápicas que auxiliam no beneficiamento dos transtornos de ansiedade são denominados de ansiolíticas e normalmente esses medicamentos tem ação no sistema GABA (SARRIS, 2007), seja através de canais iônicos indutores de transmissão por bloqueio dependente de voltagem ou através de alteração de estruturas de membrana (SARRIS et al., 2009), ou via ligação em locais de receptores de benzodiazepínicos do tipo GABAA (SPINELLA, 2001), GABA transaminase ou ainda inibição da descarboxilase do ácido glutâmico (AWAD et al., 2007) ou ainda interações com uma variedade de monoaminas (SARRIS et al., 2013).

Além do tratamento convencional, estudos mostram que a utilização de determinadas plantas medicinais pode agir de maneira eficiente e segura como ansiolíticos naturais (SARRIS, 2017), tendo em vista que se pode encontrar na composição das plantas vários elementos que agem de diferentes formas nas zonas do sistema nervoso (ZERAİK et al., 2010). Os alcalóides eritrínicos são os marcadores químicos do gênero *Erythrina*, estes ocorrem amplamente nas espécies do gênero. A investigação para o uso medicinal de espécies do gênero *Erythrina* sobre os efeitos dos alcalóides eritrínicos envolvendo o sistema nervoso central tem sido amplamente estudado (ROSA et al., 2012).

3.4 *Erythrina* spp

As plantas da família Fabaceae são consideradas uma das plantas mais importantes, em virtude das propriedades farmacológicas que as mesmas apresentam, cerca de 11,2 % das espécies dessa família, ou seja, 2.000 espécies, inclui-se na medicina tradicional. Os alcalóides são os fitocomplexos mais prevalentes nessas famílias (WILLIS, 2017).

O gênero *Erythrina* compreende mais de 120 espécies, são encontradas em áreas tropicais e subtropicais do mundo. O nome do gênero advém da palavra grega “erythros”, que significa vermelho, faz referência ao pigmento presente nas flores e sementes. Dentre as inúmeras espécies pertencentes a esse gênero, no Brasil, oito delas estão incluídas nesse gênero: *Erythrina crista-galli*, *E. falcata*, *E. fusca*, *E. mulungu*, *E. speciosa*, *E. poeppigiana*, *E. verna* e *E. velutina* Willd. tem sido bastante investigadas devido as suas propriedades farmacológicas

conferida à grande bioprodução de compostos fenólicos, como flavonoides, flavonas, isoflavonoides e pterocarpanos bem como de alcaloides, todos esses compostos se fazem presente em sementes, folhas, cascas e flores dos vegetais (SOTO-HEM ANDEZ et al., 1996; HUSSAIN et al., 2016; SOUZA et al., 2022).

Erythrina spp. é um gênero botânico da família (Fabaceae), são árvores de porte médio, com madeira mole, flores grandes, vistosas, vermelhas ou alaranjadas. São conhecidas popularmente pelos nomes de suinã, suiná, sapatinho-de-judeu, canivete, amansa senhor, bico-de-papagaio, comedoi, molongo, mulungu, corticeira, sananduva, pau-imortal; coral tree, coral bean tree (MARTINS, 2015).

As espécies do gênero *Erythrina* apresenta inúmeras funcionalidades e produtos. Na área alimentar, as flores dessa espécie são comestíveis, cruas ou cozidas. Quando utilizadas na forma de maceração, são empregadas com funcionalidade de corante, apresentando coloração vermelho-amarelada, utilizadas no tingimento de panos. Além disso, graças as cores exuberantes, as sementes são utilizadas de forma ornamental, a partir delas são fabricadas as pulseiras, colares e brincos, mesmo que as sementes sejam tóxicas. A madeira é empregada com o auxílio dos sertanejos com a finalidade de produzir cavaletes, os quais utilizam na travessia de rios em cheias. Ademais, também é utilizada como boia, pau-de-jangada, cocho para acomodar alimento para animais, além de molduras, caixotaria, brinquedo e tamancos. A árvore da espécie, também é empregada na arborização de ruas, cercas-vivas e sebes. As plantas são utilizadas para plantio misto com o objetivo de restabelecer os territórios de conservação permanente. As cascas, geram uma tinta de cor amarela referente a propriedade taninia (CARVALHO et al., 2008).

Em meados do ano 1987, o gênero *Erythrina* teve inícios aos seus primeiros estudos, em virtude da descoberta da ação farmacológica presente nos extratos das sementes de *E. americana*, responsável por apresentar efeitos pelos pesquisadores, Dominguez e Altamirano, Espécies de *Erythrina* são utilizadas na medicina popular para acalmar a agitação e no tratamento de doenças do sistema nervoso central, como insônia e depressão (JIRI; SZIRMAI, 2011). Além dessa atividade, também são relatadas uso como medicamento tradicional no tratamento de tosse, como febrífugos, antiasmáticos, antiepiléticos, convulsões, febre, inflamação, infecção bacteriana, insônia, helmintíase e feridas (KUMAR et al., 2010; HUSSAIN, 2020).

O infuso da casca é utilizado como sedativo e calmante de tosses e bronquites, bem como para o tratamento de verminoses e hemorroidas. Estudos farmacológicos de *E. velutina* constataram significativa atividade espasmolítica do extrato e atividades curarizante,

antimuscarínica e depressora do SNC (Sistema Nervoso Central), compatíveis com as propriedades preconizadas pela medicina popular para esta planta. Sua análise fitoquímica mostrou também a presença de diversos alcalóides do tipo comumente encontrado nas espécies de *Erythrina* (LORENZI, 2008).

Erythrina spp. é um gênero considerado como uma rica fonte de metabólitos secundários, sendo os alcaloides e os flavonoides os compostos bioativos mais prevalentes (FAHMY et al., 2018). Estudos mostraram que os alcaloides (+)-eritravinae (+)-11- α -hidroxieritravina isolados nas flores de *E. verna* apresentaram efeito anticonvulsivante, da mesma forma que o extrato hidroalcoólico das cascas de *Erythrina verna*. Estudos confirmaram a eficácia farmacológica de alcaloides isolados de espécies de *Erythrina*. Rosa et al. (2012) isolaram o erisotrina derivadas das flores de *E. mulungu* e mostraram que o mesmo possui um grande potencial ansiolítico e anticonvulsivante.

Silva et al. (2008) analisaram o efeito do extrato alcoólico das folhas da *E. velutina* em modelos animais de ansiedade, memória e epilepsia. Neste estudo foram observados os efeitos que o extrato apresentou no sistema nervoso dos roedores, os quais assemelharam-se ao perfil dos efeitos dos benzodiazepínicos e podem ser interpretados pela interação do extrato com os sistemas gabaérgicos. Carvalho et al. (2009) avaliaram o mecanismo de ação do extrato aquoso das folhas da espécie *E. velutina* em íleo isolado de cobaia e demonstraram que o extrato aquoso produziu uma resposta contrátil de maneira dose dependente. Estes resultados experimentais estão de acordo com a indicação popular atribuída a planta, considerando que a mesma é utilizada na forma de chás no combate a insônia e como calmante.

3.5 *Erythrina velutina* WILLD

Erythrina velutina Willd. ocorre nas Antilhas, Brasil, Colômbia, Equador, Galápagos e Venezuela. No Brasil, é bastante prevalente nos biomas Caatinga e Mata Atlântica. Na medicina tradicional apresenta várias propriedades farmacológicas, dentre elas, destacam-se: propriedades calmantes, sedativas, anestésicas e analgésicas referentes as cascas e sementes de *E. velutina*, tais potenciais estão associados a ação do alcaloide eritrinano (PALUMBO et., 2016). Na literatura, vários estudos relatam a ocorrência de compostos como auronas, chalconas, catequinas, esteróides, flavonóis, flavonas, flavononas, flavonoides, fenóis, triterpenoides e xantonas presentes no extrato aquoso de folhas e inflorescências nessa mesma planta (CARVALHO et al., 2009; PALUMBO et al., 2016) compostos esses que são responsáveis por potenciais propriedades farmacológicas.

E. velutina é classificada como uma árvore decídua, heliófita, nativa da Caatinga da região semiárida do nordeste brasileiro bem como no Vale do São Francisco, encontrada nas proximidades das subáreas úmidas das margens de rios, mesmo sendo de pequeno porte, ou também áreas rebaixadas, menos alagáveis ao longo do período chuvoso. Essa espécie é conhecida na medicina popular por vários nomes, incluindo mulungu, suinã, canivete, corticeira, pau-de-coral, sanadui, sanaduva, saranduba, maçaranduba, bico-de-pássaro dentre outros (SANTOS et al., 2013).

Esse grupo é composto por árvores de porte médio que medem entre 15 a 20 metros de altura, com madeira mole e espinhos triangulares ao longo do tronco, possui flores grandes de cor vermelha ou alaranjada, as folham podem chegar a medir até 12 cm de comprimento. A árvore é responsável dispõe de frutos do tipo vagem, deiscentes, de 6 a 12 cm de comprimento e com coloração marrom (SCHLEIER; QUIRINO; RAHMEL, 2016). O tronco da árvore é em torno de 40 a 70 cm de diâmetro e as cascas do caule varia de lisas a levemente áspera (SILVA et al., 2013). As flores da espécie surgem entre outubro e dezembro nas copas despidas de folhas (CARVALHO, 2008).

A árvore apresenta inflorescência por meio do mês de agosto com ausência de folhas até dezembro. Os frutos apresentam o processo de maturação entre os meses de janeiro a fevereiro (LORENZI, 2002). Os pássaros são os responsáveis pela polinização das flores da espécie (GRATIERI-SOSSELLA, 2005; SAZIMA et al., 2009).

Figura 2 – *Erythrina velutina* Wild



Fonte: Martins, 2015.

As raízes e cascas das inúmeras espécies de *Erythrina*, a exemplo, as espécies *E. velutina* e *E. mulungu*, são utilizadas como sedativo nas culturas sul-americanas (SARRIS, MCLNTYRE; CAMFIELD, 2013). Suas cascas são utilizadas na medicina tradicional no tratamento de diversas enfermidades do sistema nervoso central, como, insônia, convulsão, tosse nervosa e reumatismo (OZAWA et al., 2011).

Investigações fitoquímicas da *E. velutina* apontam a presença de diversas classes químicas em suas partes vegetais (cascas, sementes e folhas) incluindo alcaloides, catequinas, esteroides, flavonóis, flavonas, flavonoides, fenóis, saponinas, taninos, triterenoides e xantonas. É importante ressaltar que os compostos alcaloides, apesar de serem utilizadas quanto a sua propriedade medicamentosa, também apresentam potencial venenoso, não sendo detectado na Eritravina e na Hidroeritravina. Por meio do extrato metanólico das folhas da espécie em questão, pode-se extrair o ácido nicotínico. (SANTOS, 2013).

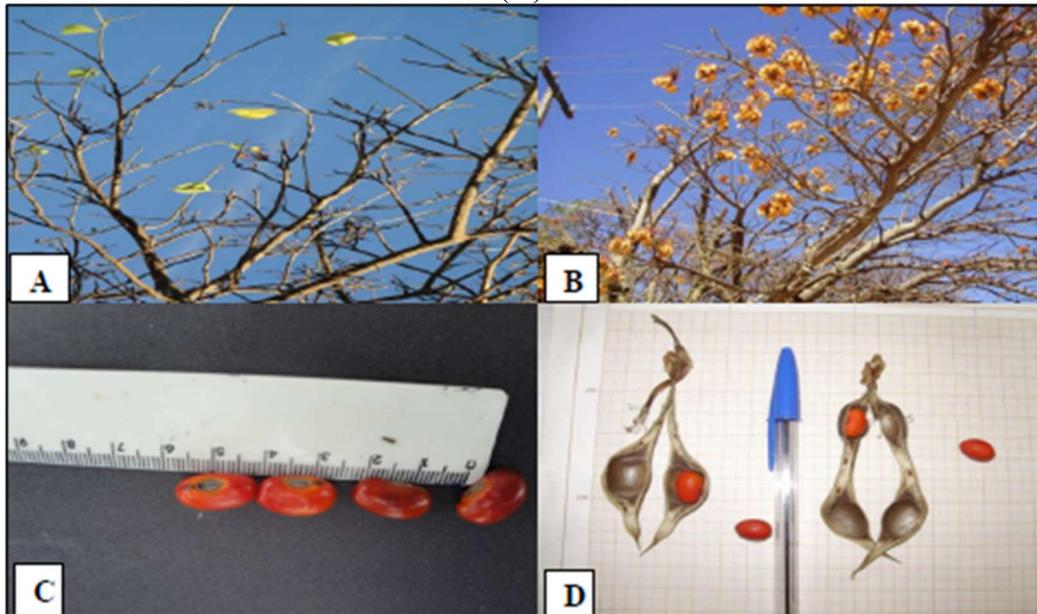
A partir dos constituintes presentes na planta, originam-se as propriedades medicinais e tóxicas, a exemplo, sua capacidade paralisante equivalente aos compostos antimuscarínicos, sua capacidade sudorífica, sedativa, hidratante, antitussígena e calmante por meio dos processos extrativos da casca, além de propriedade anestésica local apresentando ação odontálgica, através de preparações referentes ao fruto seco. De forma complementar, por meio do infuso da casca da *E. velutina*, além de ser utilizada no tratamento de verminoses e hemorroidas, também são utilizadas com propriedades antibióticas (SANTOS, 2013).

Silva e colaboradores (2016) realizaram o estudo fitoquímico da casca de *E. velutina*, no qual identificaram a presença de alguns compostos bioativos como alcaloides, terpenos, polifenóis e flavonoides. Esses constituintes, englobando os flavonoides e ácidos fenólicos, se mostram promissores devido as suas propriedades terapêuticas, apresentando ação antioxidante e anti-inflamatória, despertando grande interesse da comunidade científica. Nesse mesmo estudo, o ensaio de toxicidade da planta demonstrou ser atóxico em roedores, ao mesmo tempo em que os testes farmacológicos revelaram atividades ansiolíticas, anticonvulsivantes, antinociceptivas e antiedematogênicas referente ao extrato.

Ademais, os extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das folhas e flores de *E. velutina*, foram motivo de investigação quanto a triagem fitoquímica por Palumbo e colaboradores (2016), no qual demonstraram a presença de substâncias como açúcares redutores, fenóis, taninos, proteínas e aminoácidos, depsídeos e depsídonas, derivados de cumarina, esteroides e triterpenoides. A saponina espumídica, é bastante prevalente nas folhas, assim como os esteroides e os triterpenoides. Com relação aos alcalóides são compostos prevalente nas folhas

e inflorescências, já os glicosídeos cardiotônicos e antraquinônicos são localizados somente nas inflorescências.

Figura 3 – Florescimento (A e B) e senescência foliar (C) de *Erythrina velutina* Wild e frutos (D).



Fonte: Coelho, 2013.

Estudos sobre farmácia e farmacologia, bioquímica e química medicinal, ressaltam constituintes bioativos com potenciais terapêuticos nesta espécie, os quais estão no presente momento em estudo quanto a segurança e eficácia. Dentre esses constituintes, catequinas, esteroides, flavanóis, flavanonóis, fenóis, saponinas, taninos, triterpenóides e xantonas foram identificados em extratos aquosos de *E. velutina*, os quais apresentaram potencial terapêutico (CARVALHO et al., 2009). Em teste realizado com roedores, os extratos hidroalcoólicos de *E. velutina* demonstraram dispor de atividade ansiolítica, antinoceptiva e anticonvulsivante, dando auxílio ao uso popularizado como analgésico, sedativo e anestésico (VASCONCELOS et al., 2003; RAUPP et al., 2008; TEIXEIRA-SILVA et al., 2008). Ademais, os extratos obtidos a partir das sementes de *E. velutina*, isolou inibidores de tripsina, tripsina de Kunitz e quimotripsina os quais foi possível detectar seu potencial antitumoral, anti-inflamatório, anticoagulante, antielastase e gastroprotetor (MACHADO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2017).

Estudo realizado por Raulp e colaboradores (2008), no qual avaliaram o efeito da administração oral aguda e crônica do extrato hidroalcoólico da casca de *E. velutina*, na dose de 100 mg/kg por meio da administração crônica, demonstrou que o extrato promoveu aumento do número de entradas dos animais nos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevada.

Nesse mesmo estudo, também foi possível observar que no teste de natação forçada após administração aguda não houve surgimento de efeito ansiolítico. Tais resultados corroboram com o estudo realizado por Ribeiro e colaboradores (2006).

Rodrigues e colaboradores (2017) relatam o potencial terapêutico da *E. velutina* no sistema nervoso central, enfatizando a sua ação sob o déficit de memória referente à isquemia cerebral. Estudo realizado por Santos e colaboradores (2012) observaram que o extrato das folhas de *E. velutina* o qual é abundante em alcaloides apresentam eficácia na inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em cérebros de camundongos, de extrema importância para o tratamento da doença de Alzheimer.

Estudos atuais têm relatado novos indicadores com relação ao emprego terapêutico da *E. velutina* sob as alterações psiquiátricas e neurodegenerativas a partir dos extratos vegetais, revelando eficácia na redução dos sintomas negativos e positivos correspondente ao antipsicótico, mas especificamente olanzapina em modelos animais equivalente a esquizofrenia (DIAS, 2018), bem como atividade antioxidante e neuroprotetora do extrato padronizado de *E. velutina* relacionado a prevenção de doenças neurodegenerativas (SILVA, 2012).

Investigações pré-clínicas envolvendo modelos animais de ansiedade em roedores avaliou o potencial ansiolítico de extratos da casca de *E. velutina* diante de transtornos de ansiedade e depressão, demonstrando eficiência na diminuição da ansiedade em quadros de ansiedade generalizada do tipo leve a moderada. Nesse mesmo estudo, também foi analisado o mecanismo de ação do extrato aquoso de folhas de *E. velutina* em cobaias, revelando que tal mecanismo se dá por meio da ativação de receptores do tipo GABAA, liberação de acetilcolina, ativação de receptores muscarínicos e aumento do influxo de Ca^{2+} por meio de L-canais e liberação do cálcio através dos estoques intracelulares (PALUMBO et al., 2016).

Estudo realizado por Souza e colaboradores (2018), avaliando o efeito do uso crônico do extrato hidroalcolico de *E. velutina* em camundongos no teste de labirinto de cruz elevado, observaram que o extrato promoveu potencial ansiolítico nos camundongos. Tais efeitos gerados pelo extrato no sistema nervoso dos animais, podem ser justificados por meio da semelhança com os efeitos causados pelos benzodiazepínicos sendo compreendidos por meio da interação do extrato juntamente com os sistemas gabaérgicos (SANTOS et al., 2013).

3.6 Estudo de compatibilidade

A fase de pré-formulação é de suma importância no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, tem como objetivo simular os processos empregados durante a produção do medicamento a fim de identificar prováveis interações entre os componentes da formulação

(SILVA et al., 2021). Na etapa de desenvolvimento farmacotécnico, é importante analisar a compatibilidade entre o ingrediente ativo e o excipiente farmacêutico, devido ao fato de que as interações entre ambos são capazes de afetar a natureza da composição química e, conseqüentemente, a sua segurança e eficácia (SANTANA et al., 2018).

Na etapa de pré-formulação, o estudo de compatibilidade entre fármaco e excipiente é uma das fases mais importante durante o desenvolvimento da forma farmacêutica, pois permite verificar as possíveis interações entre IFA-excipiente, isso proporciona um maior entendimento quanto as interações físicas e químicas originadas entre ambos. Além disso, esses estudos predizem informações sobre estabilidade, propriedades químicas, eficácia e segurança de formulações farmacêuticas, além de proporcionar o desenvolvimento racional destas. A proporção mais utilizada na avaliação da compatibilidade é a de 1:1 fármaco-excipiente (MATOS et al., 2016).

Os excipientes farmacêuticos são farmacologicamente inertes, entretanto, são capazes de interagir com os ingredientes ativos presentes na forma farmacêutica e influenciar de maneira negativa a estabilidade da formulação em propriedades físicas como características organolépticas, retardo de dissolução ou em aspectos químicos, a exemplo a degradação do IFA. A utilização inapropriada de adjuvantes farmacotécnicos em formas farmacêuticas sólidas orais pode ocasionar graves conseqüências biofarmaceuticas, alterando o perfil de liberação e as características de absorção e biodisponibilidade (VEIGA et al., 2017). Assim, o estudo de compatibilidade implica na análise de misturas do medicamento com um ou mais excipientes (MELCHIADES et al., 2019).

Assim, os estudos de compatibilidade permitem a interação do IFA ou IFAV com os excipientes da formulação candidata, através de misturas físicas em determinada proporção ou por meio de uma forma de dosagem preliminar e coloca-los em situações de estresse. As propriedades físico-químicas e de comportamento dos IFAS e dos excipientes farmacotécnicos são estudadas empregando uma ou várias técnicas analíticas. Dentre as mais utilizadas, incluem-se as técnicas termoanalíticas, as espectroscópicas, cromatográficas e a difratometria de raios X, esses métodos variam em relação aos princípios de operação, duração da análise, tamanho da amostra, tipo de estresse (térmico ou mecânico), aumentando o espectro de abordagens (DAVE et al., 2015; PIRES; MUSSEL; YOSHIDA, 2017; TAMBE et al., 2022).

No âmbito farmacêutico, a análise térmica é uma das técnicas empregadas para caracterizar os IFAS no estudo de pré-formulação com o objetivo de alcançar formas farmacêuticas estáveis e adequadas para uso (BERTOL et al., 2017). Ao longo dessa etapa de desenvolvimento de medicamentos é recomendável utilizar uma série de tecnologias de

caracterização a fim de elaborar um perfil físico-químico do composto em investigação (GABBOTT, 2008) sendo que a análise térmica promove conhecimentos a respeito das propriedades físicas, análise cinética, formas polimórficas, estabilidade dos materiais e compatibilidades com excipientes farmacêuticos (BERTOL et al., 2017).

As técnicas convencionais de estudo de compatibilidade necessitam de preparação de inúmeras amostras e longo períodos de armazenamento com o intuito de alcançar resultados satisfatórios. Entretanto, as técnicas termoanalíticas dispõem de vantagens relevantes quando comparada com os métodos convencionais de teste de estresse isotérmico. A análise térmica é uma técnica que exclui a possibilidade de armazenamento de longos períodos de tempo além de desenvolvimento de métodos analíticos para todos os IFAs no decorrer dos testes de estresse isotérmico (ROJEK; WESOLOWSKI, 2019).

As técnicas termoanalíticas designam-se como métodos considerados rápidos e reprodutíveis, podendo ser utilizados sozinhos ou associados com outras técnicas com propósitos diferentes na área farmacêutica, como por exemplo: estudo de decomposição térmica, além de caracterização de fármacos e em estudos de pré-formulação de formas farmacêuticas sólidas (PROCÓPIO et al., 2011).

Em relação as técnicas de análise térmica, a DTA é uma das técnicas bastante empregada para identificar incompatibilidades em uma curta duração de tempo, na qual a curva da mistura é resultante da soma das curvas específicas de cada amostra analisada. Alguns fatores, a exemplo de supressão, surgimento ou deslocamento de processos térmicos, além de alterações na entalpia, são apontados como prováveis incompatibilidades (ALMEIDA et al., 2019).

A análise termogravimétrica (TG) é uma técnica utilizada para identificar reações térmicas de uma variedade de substancias solidas ou liquidas, em condições controladas de temperatura e atmosfera (ROJEK; WESOLOWSKY, 2019). Essa técnica também é aplicada para determinar a perda de massa da amostra em função de um aquecimento programado, sob atmosfera de gás pré-selecionado. Além de ser utilizada em estudos de pré-formulação, ela empregada para outras finalidades farmacêuticas, a exemplo, estudos de estabilidade de fármacos e medicamentos (cinética de degradação), determinação de pureza e umidade, dentre outros exemplos (DIAS et al., 2015).

No tocante a espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é considerada uma das técnicas de espectroscopias vibracionais fundamentada nas interações entre os componentes moleculares encontrados nas amostras avaliadas com radiações eletromagnéticas originando-se nos níveis de energia vibracional (RODRIGUEZ-SAONA et

al., 2011; ROHMAN et al., 2020). É um método bastante interessante no que diz respeito a identificação de interações sólido-sólido (VEIGA et al., 2017).

A técnica FTIR apresenta inúmeras vantagens, dentre essas as principais são: técnicas sensíveis e não destrutivas; necessitam de quantidades pequenas de amostra e demanda de preparação mínima do material (BUNACIU; ABOUL-ENEIN; HUANG, 2020). O método FTIR apresenta como característica principal a capacidade de determinar vários componentes em uma mesma amostra a partir de uma única corrida instrumental (BUNACIU; ABOUL-ENEIN, 2020).

De acordo com Santana et al. (2018) a associação dos IFAVS com os excipientes farmacotécnicos é melhor analisada por meio da aplicação de técnicas de reconhecimento de padrões, no qual são originados resultados nas formas de gráficos. A Análise Hierárquica de agrupamentos (HCA) e a Análise dos Componentes Principais (PCA) são técnicas quimiométricas que são capazes de serem utilizadas em estudos de compatibilidade. HCA é uma ferramenta fundamentada na semelhança das amostras através da distância entre elas originando dendogramas. A PCA é uma técnica baseada na utilização de dados matemáticos, na qual o objetivo é minimizar a matriz de dados no momento em que surgem algumas correlações entre as variáveis analisadas, dessa forma, variáveis atuais são chamadas de componentes principais (PCS) são originadas, sendo estas, combinações lineares das variáveis originais. Tais ferramentas quimiométricas de reconhecimento de padrão, permitem entender as relações presentes entre variáveis e proporcionam diferenciar ou especificar cada amostra. Assim, a compatibilidade e incompatibilidade entre os insumos é identificada (FERNANDES et al., 2016; WESOLOWSKI, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima vegetal e obtenção dos extratos

As cascas de *Erythrina velutina* foram coletadas em um sítio particular no município de Puxinanã, localizado na região semiárida do estado da Paraíba (7°10'11.1136.2''S – 35°58'53.6157.5''W). O material foi identificado no herbário Professor Jayme Coelho de Moraes localizado na Universidade Federal de Campina Grande – PB, sob o número de registro HACAM 3216.

As partes coletadas das plantas foram individualmente secas em estufa de circulação de ar a 40°C, até estabilização. Após a secagem, a droga vegetal foi submetida a pulverização em moinho de facas com malha de 10 *mesh*. Os extratos hidroalcoólicos foram produzidos por dois métodos extrativos (turbólise e ultrassom) utilizando como solvente água:etanol (EtOH) nas proporções (50:50 e 30:70, v/v). As soluções extrativas foram realizadas para alcançar uma concentração final de 20% (p/v) de matéria vegetal e obtendo os extratos de *E. velutina* (EEV).

A extração por ondas ultrassônicas foi realizada submetendo as soluções obtidas à aparelhagem específica (Lavadora ultrassônica – UNIQUE modelo Ultrasonic Cleaner), em banho-maria a 40°C, por 60 minutos. Com relação a extração por turbólise, foi realizada utilizando a aparelhagem adequada Ultra-turrax® com taxa de rotação de 6.000 rpm por 15 minutos, submetendo a solução extrativa em banho gelado para manutenção da temperatura.

Posteriormente, após a finalização dos processos extrativos, os EEV foram filtrados e em seguida concentrados em evaporador rotativo para retirada do solvente, obtendo assim os extratos secos.

4.2 Prospecção fitoquímica

Um estudo fitoquímico quantitativo foi executado com o intuito de identificar os principais metabolitos secundários presentes nos extratos das cascas de *E. velutina*, utilizando espectrofotometria na região do ultra-violeta visível, espectrofotmetro modelo Uvmini-1240 Shimadzu. Para esse propósito, foi construída a curva de calibração, através das soluções obtidas com os padrões de referência utilizados na identificação de cada fitocomplexo.

4.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais

O teor de polifenóis totais foi obtido utilizando a metodologia empregada por Chanda e Mejía (2004). Em seguida, a curva padrão foi construída utilizando-se as concentrações entre 3

e $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido gálico, analisadas em espectrofotômetro, para a leitura da absorbância em 757 nm.

Seguindo a técnica citada anteriormente, distribuiu-se em tubos de ensaio 0,5 mL da solução do reagente de Folin-Ciocalteau 1N e posteriormente 0,5 mL de solução do extrato. Os tubos ficaram em repouso por 2 minutos, á temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, adicionou-se 1 mL de uma solução de Na_2CO_3 a 20% (m/v). Após esse procedimento, os tubos ficaram em repouso por de 10 minutos até a reação colorimétrica ser finalizada. A análise foi realizada em triplicata para cada concentração, e o comprimento de onda ajustado para 757 nm.

4.2.2 Determinação do teor de flavonoides totais

Para a determinação do teor flavonoides, utilizou-se o método de Meda et al. (2005) construída a curva padrão utilizando as concentrações entre 2 e $28 \mu\text{g mL}^{-1}$, de quercetina, em aparelho citado anteriormente, utilizando um comprimento de onda de 415 nm.

Em seguida, adicionou-se em tubos de ensaio 1,5 mL de solução metanólica de AlCl_3 2% (p/v) e 1,5 mL de solução do extrato. Os tubos foram submetidos a 10 minutos de repouso, a temperatura ambiente (25 °C). As medidas foram obtidas em triplicata, utilizando um comprimento de onda de 415 nm.

4.2.3 Determinação do teor de taninos totais

A determinação do teor de taninos foi realizada empregando o método de Makkar e Becker (1993). A curva padrão foi construída utilizando-se concentrações entre 10 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de catequina em espectrofotômetro num comprimento de onda de 500 nm.

Posteriormente, nos tubos foi realizada a distribuição de 1,5 mL de solução metanolica de vanilina 4% (pv), 0,25 mL de solução metanólica de extrato e 0,75 mL de HCL P.A. Os tubos permaneceram em repouso por 20 minutos e imersos em água a cerca de 22 °C, as leituras das medidas foram realizadas num comprimento de onda de 500 nm.

4.3 Local de pesquisa e procedimentos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA- UEPB), sob licença nº 024/2021, com período de vigência de 03/2022 a 09/2022 (Anexo A). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos e no biotério da Universidade Estadual da Paraíba, e supervisionado pela professora Ana Cláudia Dantas de Medeiros.

4.4 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) adultos, machos para avaliação farmacológica e, pesando entre 25 e 35g, com idade entre 6 a 8 semanas, obtidos do Biotério da Universidade Estadual da Paraíba. No biotério, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, sob temperatura e umidade ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), respeitando-se o ciclo claro e escuro de 12h, alimentando-se com ração e água ad libitum. Um número de 7 animais foi utilizado em cada grupo experimental. Levando em conta problemas de procedimento, foi acrescentado mais 1 animal por grupo, totalizando 8 animais. O estudo foi constituído por três grupos experimentais e dois grupos controle para cada teste, e que em dois testes foram utilizados os mesmos animais, fez-se necessário uma amostra total de 40 animais. Os procedimentos de cuidados e manuseio de animais foram executados em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Após o período experimental, os camundongos foram eutanasiados com uma injeção de anestésicos, contendo uma associação de ketamina 10% e xilazina 2% por via intraperitoneal, como recomendado nas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA de 2018, referente a roedores e pequenos mamíferos. Todos os procedimentos desde o início do estudo até o momento de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais.

Após a finalização da eutanásia os animais foram acondicionados em sacos plásticos sob refrigeração à -20°C . O recolhimento foi realizado por empresa especializada no descarte de material biológico.

4.5 Toxicidade aguda oral

Entre as várias técnicas ou métodos aplicados para analisar os efeitos toxicológicos in vivo, o teste de toxicidade aguda possibilita determinar o nível de toxicidade intrínseca de uma substância, detectar órgãos que podem ser alvos de reações indesejadas e estabelecer doses para estudos de longa duração (ALMEIDA et al., 2011). O método inicia após a administração dos compostos na dose de 2000 mg/kg, e determina classificações do grau de toxicidade levando em consideração a mortalidade em diferentes doses.

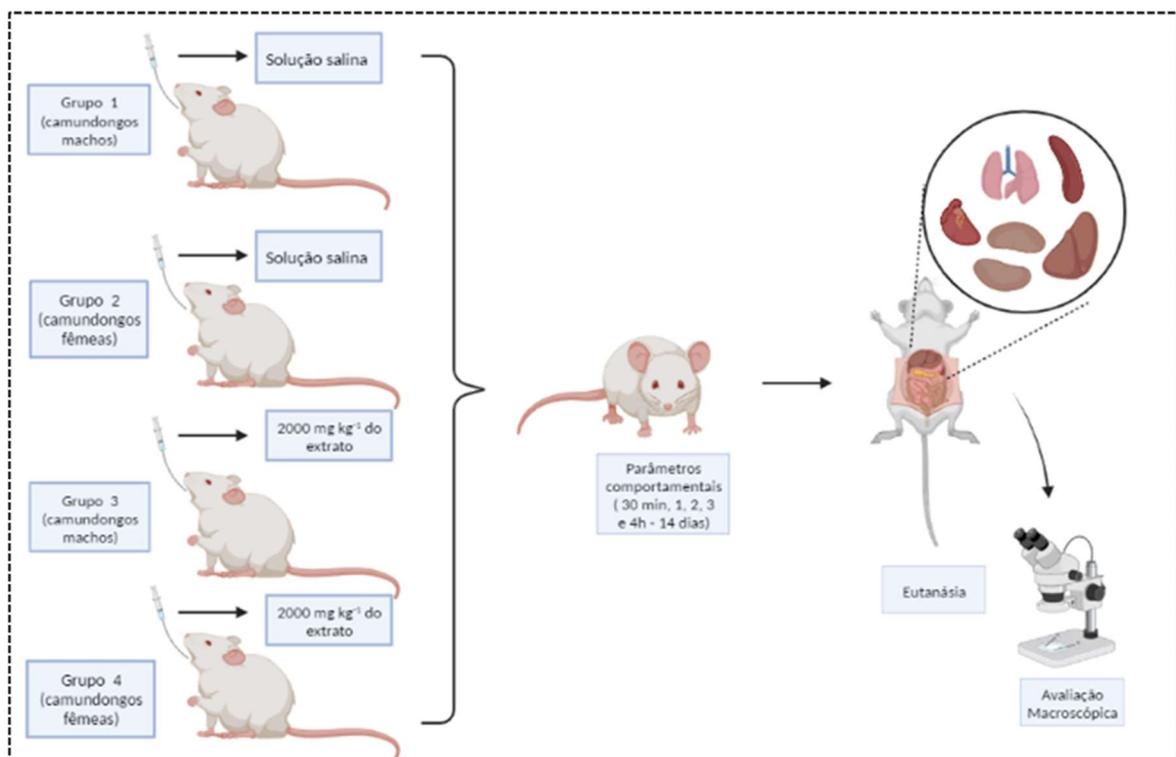
Ademais, a análise toxicológica também pode ser complementada por outros quesitos, por exemplo, as modificações ocasionadas em órgãos e em parâmetros bioquímicos e fisiológicos. Além disso, o monitoramento comportamental possibilita analisar se um

determinado composto altera a atividade cerebral, por meio da presença de alguns sinais ou alterações de condutas expressados pelos animais (ALMEIDA et al., 2011).

A toxicidade aguda foi realizada empregando a metodologia descrita no Guia nº 22 de 17/06/2019 (Estudos não clínicos necessários ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos) pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 de 13/05/2014. Segundo o Guia citado anteriormente, os camundongos fêmeas e machos foram distribuídos em quatro grupos de 5 animais. O grupo controle foi tratado com com veículo (solução salina 0,9%) (10 mL kg^{-1}) através de sonda intragástrica, e os animais do grupo experimental foram tratados com a dose de 2000 mg kg^{-1} do extrato, v.o. Após os tratamentos, os camundongos foram observados durante 30 min, 1, 2, 4 horas a fim de identificar comportamentos ou mesmo alterações que sugerem a atividade farmacológica no SNC, tal registro foi realizado utilizando como parâmetro de triagem farmacológica comportamental o protocolo de Almeida et al. (1999). Posteriormente, a avaliação foi realizada a cada 24 horas diariamente, durante 14 dias.

Ao final do experimento (décimo quarto dia), os camundongos de ambos os grupos foram pesados e em seguida eutanasiados com uma injeção de anestésicos, como recomendado pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA de 2018, tendo os órgãos (fígado, baço, coração, rins e pulmão) retirados, pesados e avaliados por análise macroscópica.

Figura 4 - Desenho esquemático da avaliação de toxicidade aguda.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

4.6 Atividade ansiolítica

Foi sugerido um protocolo com o intuito de avaliar os efeitos comportamentais e ansiolíticos da administração do extrato seco das cascas de *E. velutina*. Em seguida, foi realizada a triagem farmacológica através dos testes de labirinto em cruz elevado, teste de movimentação espontânea e *rota rod*, todos de forma aguda. Os camundongos usados no estudo foram da linhagem *Mus musculus* – Swiss. Inicialmente, para cada teste, foram distribuídos um quantitativo de 8 animais e dispostos em 5 grupos (RAUPP et al., 2008).

A droga padrão (diazepam) foi utilizado para efeito ansiolítico, sedativo e miorelaxante na dose de 1 mg kg⁻¹ intraperitoneal. Os grupos experimentais foram testados através da administração dos tratamentos por meio da gavagem (sonda intragástrica).

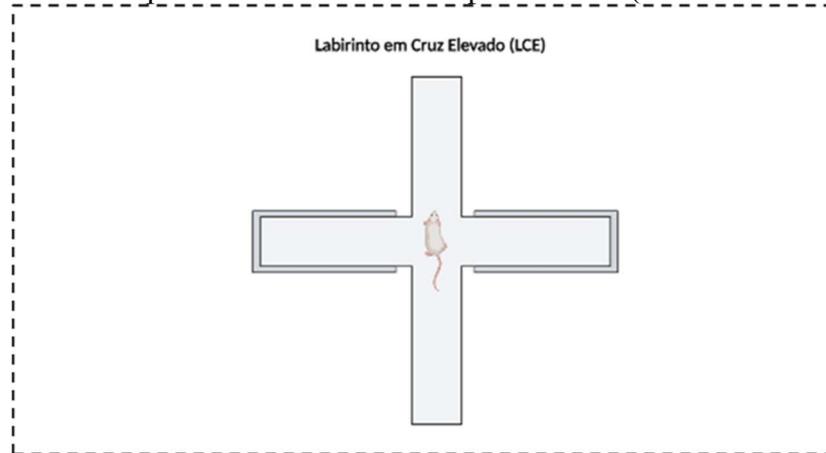
Os animais do grupo controle foram pré-tratados com o veículo (Salina); o extrato vegetal foi administrado, via oral, em três doses diferentes (62,5, 125 e 250 mg kg⁻¹), cada uma em um grupo específico de animais. Decorridos 30-60 minutos do tratamento os animais foram submetidos aos testes de labirinto em cruz elevada, campo aberto e *rota rod* para avaliação do efeito ansiolítico do composto.

4.6.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

No teste do labirinto em cruz elevado foi colocado o animal em um labirinto elevado do solo, 45 cm do chão aproximadamente, formado de dois braços abertos opostos e dois braços fechados, também opostos, em forma de cruz grega. Os braços abertos e fechados são conectados por meio de uma plataforma central (PINHEIRO et al., 2018). Neste teste é analisado o comportamento animal pela periodicidade de entradas e o tempo gasto em cada tipo de braço, e outros comportamentos como deslocamento, levantar-se, esticar-se, etc. Considera-se a porcentagem da preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos e pelos fechados um índice confiável de ansiedade: quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos (MARTINEZ, 2005).

Trinta minutos após a administração dos tratamentos, cada animal deverá ser colocado individualmente é posicionado no centro do aparelho. O tempo de permanência de cada animal foi de cinco minutos onde foi avaliado nesse período as entradas e tempo de permanência no braço aberto e fechado (PINHEIRO et al., 2018). Ao final de cada experimento, o aparelho foi higienizado com uma solução de álcool a 10 %, antes do animal seguinte, retirando os odores que possivelmente poderia interferir no seu comportamento.

Figura 5 – Desenho esquemático do estudo comportamental (Labirinto em Cruz Elevado).

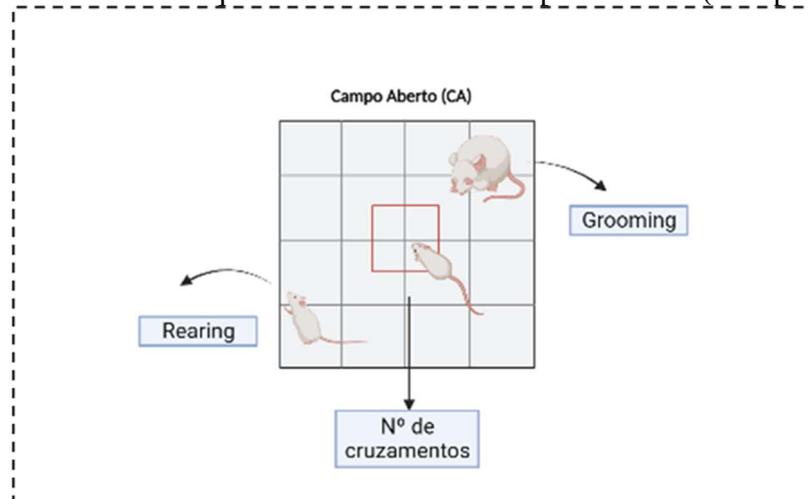


Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

4.6.1 Labirinto do campo aberto

Após a exposição ao labirinto de cruz elevada, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, onde foram avaliados a exploração individual espontânea e a sua atividade motora (ARCHER, 1973). O campo aberto constitui uma base circular de 30 cm de diâmetro, marcado em uma circunferência interna e externa e uma redoma de acrílico medindo 30 cm de altura x 30 cm de diâmetro. Durante 5 minutos serão registrados os seguintes parâmetros: frequência de locomoção ou número de cruzamentos nos quadrantes, número de levantamentos ou *rearing* (levantamento do animal sobre as patas traseiras), número de autolimpeza (PRUT; BELZUNG, 2003; RIOS et al., 2020). Assim como no LCE, o aparelho também foi limpo periodicamente com uma solução de etanol a 10% após cada animal testado.

Figura 6 – Desenho esquemático do estudo comportamental (Campo Aberto).

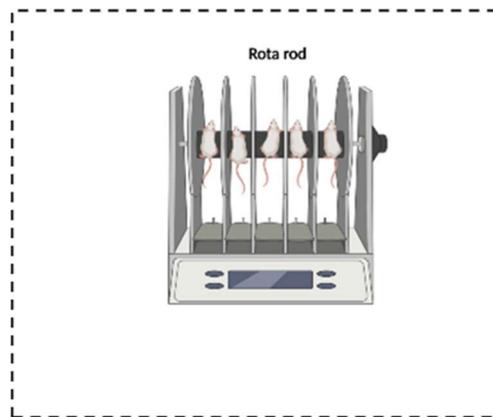


Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

4.6.2 Teste do Rota rod

Para avaliar os possíveis efeitos não específicos de relaxamento muscular dos compostos, os animais foram submetidos ao teste da *rota rod*. O aparelho (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) consiste em uma barra giratória com diâmetro de 3 cm. Os animais foram colocados na haste rotativa, com velocidade de 12 rpm. O tempo de permanência na barra giratória, em segundos, e o número de quedas foram os parâmetros avaliados.

Figura 7 – Desenho esquemático do estudo comportamental (*Rota rod*).



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

4.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (D.P.M) e os grupos experimentais foram comparados aos seus respectivos controles. Para comparação de médias entre os grupos foi utilizado o teste “t” de *Student* e para comparação múltipla dos parâmetros foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de *Tukey*. Em todas as análises foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

4.8 Padronização do marcador químico

A determinação do marcador químico do extrato de *E. velutina* foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em um cromatógrafo marca Shimadzu acoplado a um detector UV-Visível simples ajustado para 366 nm de comprimento de onda. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Gemini NX C18 (Phenomenex) (150mm x 4,6 mm x 5 μ m).

A fase móvel foi composta por uma mistura de metanol:água acidificada com ácido fórmico a 0,1% (v/v) (Fase A) e metanol (Fase B) em sistema de gradiente, com fluxo de 1 mL

min⁻¹, em temperatura de forno a 30°C constantes. As amostras foram previamente dissolvidas em solução de metanol para análise.

A validação do método foi realizada pela avaliação das figuras de mérito, como os parâmetros de precisão, exatidão, repetibilidade, reprodutibilidade e robustez do método, conforme preconizado na Resolução ANVISA n° 889, de 29 de maio de 2003 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

4.8.1 Identificação do marcador químico por CLAE

A identificação do marcador químico da *E. velutina* foi avaliado através do método cromatográfico, no qual foi avaliado a possibilidade de separação dos compostos majoritários presentes na planta. Nesse estudo foi comparado o tempo de retenção com os dos seguintes padrões cromatográficos rotina e quercetina.

4.8.2 Curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi construída com a finalidade de definir o intervalo de concentração no qual o método espectrofotométrico na região UV-vísivel mostrava linearidade. Após a obtenção da solução mãe, foram retiradas alíquotas e transferidas para balões volumétricos de 10 mL e completados com metanol, obtendo as concentrações de 2 a 176 µg/mL de quercetina, os dados estão descritos na tabela 1. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 415 nm.

Tabela 1 - Dados da curva de Ringbom de quercetina por espectrofotometria no UV.

(continua)

Pontos	Vol. da solução de quercetina (200 µg/mL)	Concentração teórica (µg/mL)
1	0,1	2,0
2	0,2	4,0
3	0,3	6,0
4	0,4	8,0
5	0,5	10,0
6	0,6	12,0
7	0,7	14,0
8	0,8	18,0

Tabela 1 - Dados da curva de Ringbom de quercetina por espectrofotometria no UV.
(conclusão)

Pontos	Vol. da solução de quercetina (200 µg/mL)	Concentração teórica (µg/mL)
9	0,9	20,0
10	1,0	24,0
11	1,2	28,0
12	1,4	32,0
13	1,6	38,0
14	1,9	44,0
15	2,2	50,0
16	2,5	58,0
17	2,9	66,0
18	3,3	76,0
19	3,8	86,0
20	4,3	96,0
21	4,8	106,0
22	5,3	126,0
23	6,3	146,0
24	7,3	176,0
25	8,8	

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

4.8.3 Linearidade

A linearidade do método foi analisada por meio da construção de três curvas de calibração em três dias diferentes, foram utilizados dez pontos de concentrações do padrão cromatográfico (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 µg/mL). Nesse experimento foi analisado os seguintes parâmetros: coeficiente de determinação (R^2), análise de resíduos, teste de falta de ajuste e teste de significância de regressão, usando valores de F para 5% de significância.

4.8.4 Repetibilidade e precisão intermediária

A repetibilidade foi determinada avaliando a proximidade entre os resultados gerados das amostras, utilizando as mesmas condições experimentais, analista e instrumentação, apenas em uma única corrida analítica. Utilizou-se seis soluções na concentração 10 µg/mL individualmente preparadas.

Determinou-se a precisão intermediária através de análises de soluções na concentração 10 µg/mL, realizadas por diferentes analistas em diferentes dias. As análises foram realizadas em seis replicatas. Deste modo, os resultados foram avaliados pelo desvio padrão relativo (DPR%).

4.8.5 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de adição de padrão a amostra. Quantidades conhecida de padrão (2, 10 e 20 µg/mL) foram adicionados ao extrato (5 mg mL⁻¹) levando em consideração a faixa linear do método. Em seguida, os valores obtidos foram calculados matematicamente por recuperação. Cada concentração foi obtida por três réplicas. A exatidão foi expressa pela equação descrita em seguida:

$$E(\%) = \frac{CME}{CMT} \times 100 \quad (1)$$

CME = concentração média experimental

CMT = concentração média teórica

4.8.6 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram determinados a partir dos parâmetros da curva analítica, como descrito na equação abaixo:

$$LD = \frac{(3,3 \times \sigma)}{IC} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{(10 \times \sigma)}{IC} \quad (3)$$

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva de calibração

4.8.7 Robustez

Avaliou-se a robustez do método através da resistência a pequenas variações na execução do experimento. As análises foram realizadas em triplicatas de uma solução de concentração 10 µg/mL, do padrão, variando-se o solvente, comprimento de onda e o tempo de leitura da amostra, avaliado pela dispersão dos resultados.

4.9 Caracterização do extrato por técnicas analíticas (Estudo de compatibilidade)

O estudo de compatibilidade é o primeiro passo no desenvolvimento de uma forma farmacêutica. Mas, antes de transformar um IFAV em forma farmacêutica é necessário que ele seja química e fisicamente caracterizado. Assim, para realização do estudo de compatibilidade foram empregadas a Análise Térmica Diferencial (DTA), Termogravimetria (TG), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os indícios de incompatibilidade obtidos por DTA e TG foram confirmados por FTIR. Nesse estudo foi utilizado um sistema de misturas binárias entre o IFAV e excipientes farmacêuticos utilizados em formulações sólidas. As misturas foram preparadas nas proporções 1:1, utilizando três tipos dos seguintes excipientes: polímeros, diluentes, aglutinantes e lubrificantes.

Tabela 2 – Excipientes farmacêuticos utilizados no estudo de compatibilidade.

Excipiente	Abreviação	Classificação
Celulose microcristalina	CM	Diluyente
Amido	AMD	Desintegrante
Carboximetilcelulose sódica	CMC	Desintegrante/Estabilizador
Hidroxipropilmetilcelulose	HPMC	Diluyente/Desintegrante
Dióxido de silício coloidal	DC	Desintegrante
Estearato de magnésio	EST	Lubrificante
Talco	TAL	Lubrificante
Manitol	MAN	Diluyente/Edulcorante
Lactose monoidratada	LAC	Diluyente

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

4.9.1 Análise térmica

As curvas de análise térmica diferencial (DTA) foram obtidas em um analisador térmico simultâneo DTA/TG (DTG-60, Shimadzu), utilizando porta-amostra de alumínio, sob uma atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50 mL min⁻¹. A programação utilizada foi de 25 até 450

°C, com razão de aquecimento de 10 °Cmin⁻¹. O Índio (ponto de fusão 156,6 °C) foi utilizado como padrão de calibração do equipamento.

As curvas termogravimétricas não isotermas foram obtidas em uma termobalança simultânea TG/DTA, DTG-60, Shimadzu, utilizando cadinhos de alumina, com cerca de 8 ± 0,1 mg de amostra, em atmosfera de nitrogênio (50 mL min⁻¹). Os experimentos foram realizados entre as temperaturas de 25 e 900 °C, com razão de aquecimento de 10 min⁻¹. Os dados serão analisados utilizando o software TA60-WS.

4.9.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo IRPrestige, utilizando pastilhas de KBr, no intervalo de 4000 -600 cm⁻¹. Os dados foram analisados utilizando o *software* Origin® (versão 8.0).

4.10 Análise quimiométrica

Os dados obtidos de DTA, TG e FTIR referentes ao extrato e aos excipientes foram submetidos a duas técnicas quimiométricas de reconhecimento de padrão: análise hierárquica de agrupamentos (HCA), utilizando o *software* The Unscrambler 9.8 e análise por componentes principais (PCA), utilizando o *software* Statistica 8.0.

Com relação a construção dos dendrogramas de HCA foi utilizado distâncias euclidianas e ligação completa (complete linkage) formando os agrupamentos. Ao mesmo tempo que para PCA, os dados foram obtidos através da correção de dispersão multiplicativa (MSC), usado para retificar sinais de ruído.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Prospecção fitoquímica

Os resultados referentes aos polifenóis através da equação da curva de calibração de ácido gálico $y = 0,0655x + 0,0844$ ($R^2 = 0,9933$), de flavonoides a partir da equação $y = 0,0795x - 0,0713$ ($R^2 = 0,9972$) e taninos a partir da equação da curva de calibração realizada com catequina $0,0034x + 0,0003$ ($R^2 = 0,9909$), estão expostos na tabela 3.

Estudos recentes demonstraram que a espécie em estudo apresenta uma variedade de compostos fenólicos. Corroborando com a pesquisa em questão, foi possível observar que o extrato hidroetanólico (EtOH 70%) das cascas do caule de *E. velutina*, obtido por turboélice apresentou alta concentração de polifenóis totais (792,31 mg de equivalentes de ácido gálico) em comparação com os outros métodos analisados demonstrando alto teor de polifenóis.

Ademais, os resultados revelaram que a espécie vegetal apresentou alta concentração de equivalentes de quercetina, a cada 100 g de extrato foi possível obter 212,15 mg demonstrando a predominância de flavonoides, bem como uma alta concentração de taninos (648,03 mg de equivalentes de catequina).

Nos últimos anos, os metabolitos secundários tem merecido destaque sobretudo no âmbito farmacêutico devido aos efeitos terapêuticos que esses compostos apresentam, efeitos esses que vão desde a proteção da planta contra agentes e estímulos do meio como sendo considerados grandes moléculas promissoras a síntese de novos fármacos (PEREIRA; CARDOSO, 2012; ANDRADE, 2019).

Existe alguns fatores que podem estar relacionados com a variação de metabolitos secundários presentes numa mesma espécie vegetal, como por exemplo: partes diferentes da planta utilizadas no estudo, horário de coleta, época do ano (sazonalidade), composição do solo, disponibilidade hídrica, altitude além de outros fatores capazes de modificar o metabolismo secundário vegetal (AYOUNI et al., 2016; HOYOS et al., 2015; RIBEIRO; BONILLA; LUCENA, 2018; UGUR et al., 2018; ALMEIDA, 2019).

Tabela 3 – Polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados determinados no extrato hidroalcolóico da casca de *Erythrina velutina*.

Método	Etanol (%)	Polifenóis totais (mgEAG 100 g ⁻¹)	Flavonoides totais (mg EQ 100 g ⁻¹)	Taninos condensados (mg EC 100 g ⁻¹)
Ultrassom	50	643,56 ± 2,16	181,50 ± 0,89	590,20 ± 1,22
	70	696,39 ± 1,94	192,5 ± 0,80	701,47 ± 1,53
Turbólise	50	364,63 ± 2,10	124,00 ± 0,87	660,78 ± 1,76
	70	792,31 ± 1,05	212,15 ± 0,43	648,03 ± 3,74

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Legenda: EAG – equivalentes de ácido gálico; EQ – equivalentes de quercetina; EC equivalentes de catequina.

Em estudos semelhantes realizado por Dantas (2022) utilizando a droga vegetal (casca) de *Erythrina velutina*, detectou-se a presença de polifenóis totais ($12,42 \times 10^{-6}$ mg/g), flavonoides totais ($8,86 \times 10^{-6}$ mg/g) e taninos ($5,12 \times 10^{-6}$ mg/g), seguido da mesma ordem de concentração análoga encontrados em nosso estudo. Dentre os compostos fitoquímicos presentes no gênero *Erythrina*, os metabólitos secundários mais prevalentes são, os alcaloides, flavonoides e terpenos (TODOROKI et al., 2021).

Avaliando o extrato bruto da casca de *E. velutina*, Ramos et al. ((2020) determinou em extrato hidroalcolóico a presença de alguns metabólitos secundários, os quais foram; taninos condensados, flavonoides, derivados cinâmicos, açúcares redutores e alcaloides. Nesse mesmo estudo, também foi avaliada a prospecção fitoquímica do extrato da folha de *E. velutina*, demonstrando também a presença de alguns fitocomplexos, dentre eles, taninos condensados, flavonoides, derivados cinâmicos, açúcares redutores, cumarinas, saponinas, terpenos esteroides e alcaloides.

De modo semelhante, Melo et al. (2011) relataram através da triagem fitoquímica a presença de alcaloides, taninos, flavonoides, esteroides e terpenoides no extrato alcoólico das folhas de *E. velutina*, entretanto no extrato aquoso observou-se a ausência dos alcaloides. Os alcaloides são metabólitos secundários que detêm de uma função primordial, a de proteção para o vegetal contra a ação de fitopatógenos e herbívoros, um dos exemplos é a cafeína, produzida pela planta para impedir os animais que se alimentam de determinadas espécies (VIZZOTO et al., 2010).

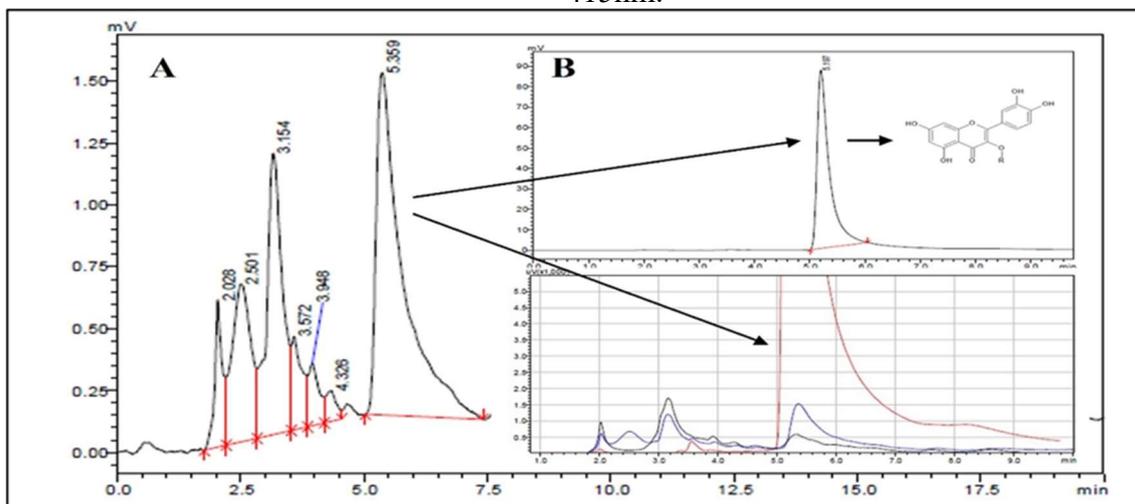
Estudos relatam que a presença de alcaloides em inúmeras espécies de *Erythrina* são responsáveis pela ação ansiolítica e sedativa registrado em roedores em modelos experimentais

(OZAWA et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; RAMOS et al., 2020). Os flavonoides são responsáveis pela atividade antimicrobiana, e bastante empregados no tratamento de doenças do sistema circulatório, hipertensão e também desempenha função de cofator do ácido ascórbico (OLIVEIRA; LIMA, 2017).

5.2 Determinação e quantificação do marcador químico da *E. velutina*

O extrato de *E. velutina* apresentou separação de várias substâncias, como podemos visualizar a presença de vários picos no cromatograma (Figura 8) do extrato. Dentre esses compostos que foram eluídos destaca-se o pico com tempo de retenção em 5.35 min. referente ao padrão da quercetina e a quercetina (B) no extrato, com tempo de retenção em torno de 5,17 min. Além disso, os outros compostos que também foram eluídos provavelmente estão relacionados com a presença de substâncias hidrófilas, como polifenóis, flavonoides e taninos, presentes no IFAV confirmado pelo *Screening fitoquímico* (Tabela 3). Os cromatogramas referentes ao extrato e ao padrão de quercetina são confrontados na figura 8.

Figura 8 – Cromatograma do extrato rotoevaporado de *E. velutina* (A) e de quercetina (B) em 415nm.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

As condições de trabalho foram então definidas, partindo para a validação do método, no qual foi determinada a curva de calibração a partir das soluções do padrão de quercetina.

Estudo realizado por Hossain e colaboradores (2022) mostraram que a quercetina apresenta potencial ansiolítico em camundongos, por meio da regulação dos receptores GABA, pois aumentou a os efeitos calmantes do Diazepam e reduziu os efeitos flumazenil,

evidenciando que tal efeito ansiolítico mencionado pode estar relacionado com a atividade depressora central e não por meio do bloqueio neuromuscular.

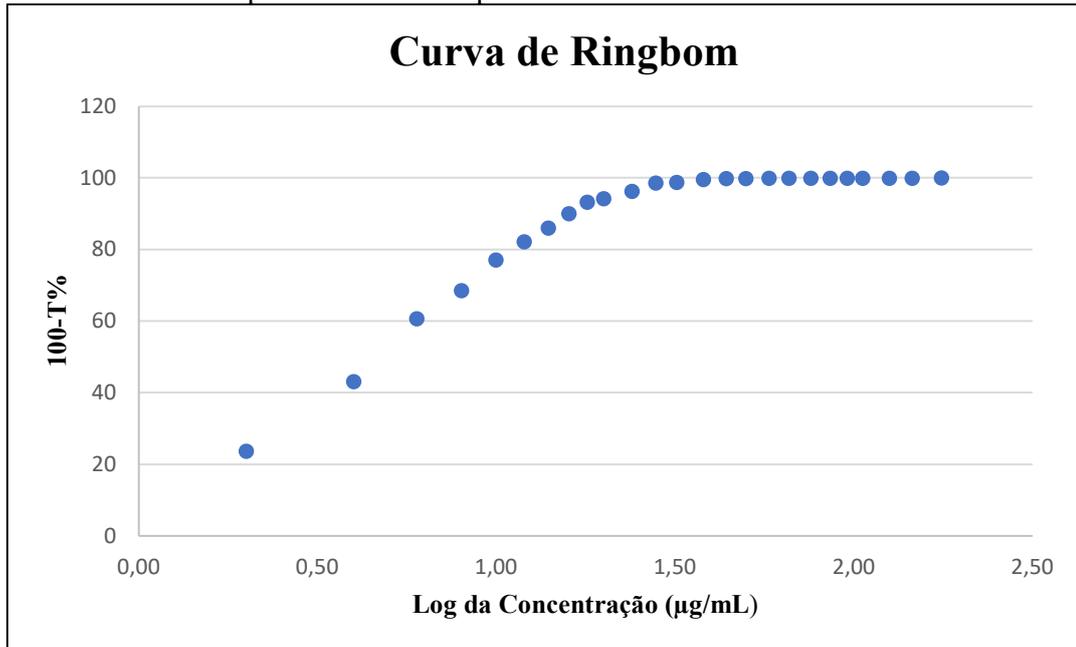
Tabela 4 – Construção da curva de Ringbom por espectrofotometria UV para quercetina em 415 nm.

Concentração µg/mL	Média absorbancias	10 abs	%T (100/10 abs)	100 - % T
2	0,1293	1,3467	74.2555	25,7445
4	0,2365	1,7238	58.0113	41,9887
6	0,3597	2,2892	43.6833	56,3137
8	0,4928	3,1102	32.1522	67,8478
10	0,6265	4,2315	23.6322	76,3678
12	0,6959	4,9647	20.1422	79,8578
14	0,845	6,9984	14.2889	85,7111
16	0,9903	9,7791	10.2258	89,7742
18	1,1176	12,9897	7.6984	92,3016
20	1,2461	17,6238	5.6744	94,3256
24	1,259	18,1551	5,5080	94,4920
28	1,572	37,325	2,6791	97,3209
32	1,8021	63,4015	1,5772	98,4228
38	2,0829	121,03	0,8262	99,1738
44	2,4253	266,2563	0,3755	99,6245
50	2,6984	499,3441	0,2002	99,7998
58	2,9025	798,9139	0,1251	99,8749
66	3,1243	1331,3737	0,0751	99,9249
76	3,3004	1997,1008	0,0500	99,9500
86	3,6014	3993,9258	0,0250	99,9750
96	3,6014	3993,9258	0,0250	99,9750
106	3,6014	3993,9258	0,0250	99,9750
126	3,6014	3993,9258	0,0250	99,9750
146	3,6014	3993,9258	0,0250	99,9750
176	3,6014	3993,9258	0,0250	99,9750

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A faixa linear do método espectrofotômetro foi determinada através da curva de Ringbom. Em razão disso, as medições das soluções em absorbâncias foram transformadas em transmitância. Na tabela 4 se encontra os dados referente a transmitância versus o log da concentração da quercetina em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

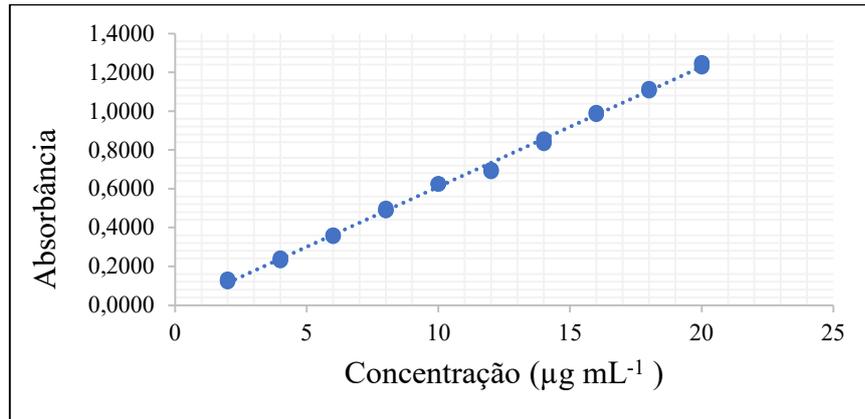
Figura 9 - Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para quercetina no comprimento de onda de 415 nm.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Como apresentado na figura 9, a curva de calibração foi linear entre 2 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo obtido um R^2 igual a 0,9940. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza um R^2 maior que 0,99, em nosso estudo o valor encontrado ficou dentro do recomendado, indicando dessa forma que a curva apresenta uma regressão linear.

A curva analítica de quercetina foi construída com as médias dos valores de absorbâncias de três curvas analíticas obtidas em dias diferentes durante os ensaios de linearidade, ilustrada na figura 10.

Figura 10 – Curva de calibração do padrão de quercetina em 415 nm.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A tabela 5 mostra as medidas das absorbâncias das amostras testadas nas diferentes concentrações que foram utilizadas para a construção da curva de calibração.

Tabela 5 – Valores de absorbância determinados para a curva analítica de quercetina pelo espectrofotométrico na região do UV em 415 nm.

(continua)

Concentração (µg/mL)	Absorbância	Absorbância média ± DP	DPR (%)
2	0,1293	0,1275 ± 0,0030	2,42
	0,1239		
	0,1292		
4	0,2365	0,2329 ± 0,0157	6,78
	0,2157		
	0,2467		
6	0,3597	0,3708 ± 0,0144	3,89
	0,3872		
	0,3657		
8	0,4886	0,4828 ± 0,0093	1,93
	0,4721		
	0,4879		
10	0,6267	0,6141 ± 0,0167	2,72
	0,5951		
	0,6205		
12	0,6959	0,7228 ± 0,0263	3,64
	0,7239		
	0,7486		
14	0,8383	0,8616 ± 0,0223	2,59
	0,8636		
	0,8829		

Tabela 5 – Valores de absorvância determinados para a curva analítica de quercetina pelo espectrofotométrico na região do UV em 415 nm.

(conclusão)			
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância	Absorbância média \pm DP	DPR (%)
16	0,9903	0,9962 \pm 0,0054	0,54
	1,0010		
	0,9974		
18	1,1113	1,1075 \pm 0,0237	2,14
	1,0821		
	1,1292		
20	1,2428	1,1981 \pm 0,0795	6,64
	1,2454		
	1,1063		

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A partir dos dados obtidos da curva de calibração foi possível determinar os limites de detecção (LD= 0,40) e quantificação (LQ= 1,23) com base no teste F com 95 % de confiança, conforme descrito na tabela 4.

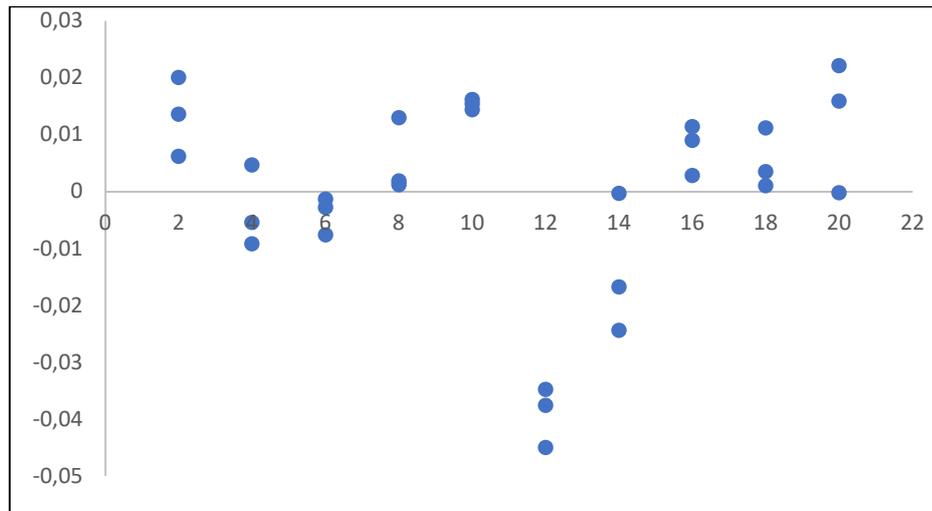
Tabela 6 – Parâmetros para validação da linearidade do método cromatográfico.

LINEARIDADE	
Coefficiente R^2	0,9940
Equação da reta	$y = 0,0607x + 0,0066$
(MQfaj/MQep)/F	2,055/2,057
(MQreg/MQr)/F	13802,3/3,94
(Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$))	0,40
(Limite de quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$))	1,23

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Legenda: MQfaj = média quadrática da falta de ajuste; MQep = média quadrática do erro puro; MQreg = média quadrática do modelo; MQr = média quadrática residual.

A curva apresentou uma distribuição homocedastica dos resíduos, como pode ser observado na figura 11, sugerindo uma distribuição normal dos dados e uma concordância com o modelo.

Figura 11– Gráfico de resíduos.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade ou precisão intra-dia (Tabela 7) e precisão entre-analistas (Tabela 8) expressando o resultado em desvio padrão relativo. Os dados obtidos, não mostraram dispersão significativa, estando dentro do recomendado, que é menor que 5% (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Tabela 7 – Determinação da precisão intra-dia.

CONCENTRAÇÕES ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		DPR (%)
Manhã	Tarde	
10,36	10,00	1,25
10,26	10,23	
10,34	10,16	
10,31	10,20	
10,10	10,10	
9,96	10,14	

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Para a precisão intermediária ou inter-dia (Tabela 8) foi observado que os valores se mostraram concordantes, sugerindo que entre dias e analistas diferentes não houve diferença significativa entre os valores obtidos, apresentando um DPR de 1,03%.

Tabela 8 – Determinação da precisão intermediária.

CONCENTRAÇÕES ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		DPR (%)
Analista A (dia 1)	Analista B (dia 2)	
10,21	10,26	1,03
10,22	9,95	
10,26	10,17	
10,19	10,20	
10,25	10,10	
9,97	10,19	

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A determinação da exatidão foi realizada pela análise de adição do padrão de quercetina utilizando três concentrações (2,0, 10,0 e 20 $\mu\text{g/mL}$) através do método espectrofotométrico (Tabela 9). Os valores obtidos de recuperação encontram-se dentro dos limites aceitáveis pela RDC 166/2017 na faixa de 85 a 115 % para matrizes complexas.

Tabela 9 – Determinação da exatidão do método analítico em três níveis de concentração.

Nível	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Teórica	Experimental	Recuperação média (%)
Baixo	2,0	2,10	93,33
	2,0	1,80	
	2,0	1,91	
Médio	10,0	11,38	112,26
	10,0	11,28	
	10,0	11,02	
Alto	20,0	20,28	102,81
	20,0	21,33	
	20,0	20,08	

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Alterações no comprimento de onda de absorção, no tempo de leitura e no solvente utilizado foram realizadas para determinação da robustez do método. Os resultados obtidos não mostraram diferença significativa, como descrito na tabela 10. Os valores apresentaram DPR abaixo de 5%, estando dentro do limite recomendado pela ANVISA.

Tabela 10 – Avaliação da robustez do método analítico por espectrofotometria na região UV.

Parâmetros	Níveis	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)
Solvente	Marca 1	9,93	1,72
	Marca 2	10,09	
Comprimento de onda (nm)	413	10,31	4,95
	415	10,29	
	417	11,21	
Tempo de leitura	8 min	10,18	0,59
	10 min	10,26	
	12 min	10,30	

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

5.3 Prospecção da atividade biológica do extrato *E. velutina*

5.3.1 Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda é amplamente empregada para averiguar a segurança de um composto de dose preestabelecida bem como obter informações preexistentes sobre os mecanismos de toxicidade (OLIVEIRA et al., 2018). Através do ensaio de toxicidade é possível identificar se após o tratamento com extrato foi observada alguma mudança, como por exemplo, alguma alteração macroscópica nos órgãos dos animais eutanasiados, coloração entre outros.

Sendo assim, após o tratamento com o extrato de *E. velutina*, os órgãos avaliados após a eutanásia dos animais, não evidenciaram nenhuma alteração macroscópica morfológicas ou de coloração quando comparados ao grupo controle. A dose de 2.000 mg/kg não ocasionou nenhum óbito e a triagem farmacológica nas primeiras horas revelou uma diminuição responsiva ao estímulo doloroso na cauda do animal. Após as 24 horas não foi visualizado nenhuma alteração comportamental sendo semelhante durante os 14 dias analisados. Através do teste de toxicidade também foi possível observar que na análise do peso relativo dos órgãos os dados evidenciaram que não houve nenhuma modificação significativa entre os grupos testados (Tabela 11) ou seja, a administração do extrato manteve a integridade morfológica dos órgãos.

O acompanhamento de ganho de peso e ingestão de água e alimentos em estudos que envolvem animais é imprescindível, uma vez que variações nesses fatores são capazes de predizer o estado de saúde geral do animal. Assim, a presença de alterações nos valores desses parâmetros sugere que o produto em estudo apresenta efeitos adversos (RAZA et al., 2002).

Tabela 11 – Resultados de toxicidade aguda de *E. velutina*.

	FÊMEAS		MACHOS	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Coração (g)	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Fígado (g)	2,46 ± 0,18	1,85 ± 0,1	2,81 ± 0,35	2,71 ± 0,21
Rins (g)	0,68 ± 0,03	0,59 ± 0,06	0,86 ± 0,09	0,88 ± 0,09
Baço (g)	0,18 ± 0,05	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,09	0,15 ± 0,02
Pulmões (g)	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,05	0,25 ± 0,04	0,25 ± 0,04
Consumo de água (mL)	26,07 ± 4,80	22,96 ± 6,45	22,54 ± 3,43	22,21 ± 4,67
Consumo de ração (g)	17,43 ± 1,65	13,04 ± 1,72	14,61 ± 1,71	15,29 ± 1,38
Ganho de peso (g)	2,80 ± 1,48	0,60 ± 1,14	3,40 ± 0,89	3,20 ± 0,45

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Com relação ao consumo de ração dos camundongos tratados com o extrato na dose testada, nossos achados demonstraram que os extratos não apresentaram variações significativas quando comparado ao grupo controle sugerindo uma dose letal (DL₅₀) superior a 2.000 mg/kg. Ademais, na análise de consumo de água e avaliação ponderal não foi observado nenhuma alteração ao termino do ensaio agudo, corroborando com os achados apresentados anteriormente. Esses resultados indicam que o extrato de *E. velutina* apresenta toxicidade aguda muito baixa ou não tóxico sendo enquadrada na Classe 5 de toxicidade de acordo com a GHS (*Globally Harmonized Classification System*). Estes achados contribuem para determinar doses em estudos *in vivo*.

Estudo realizado por Dantas (2022) no qual analisaram a toxicidade aguda do chá de cascas de *E. velutina*, mostrou resultados semelhantes, indicando atoxicidade promovida pelo infuso, tal pesquisa corrobora com os achados encontrados nesse estudo. Na literatura, alguns estudos de toxicidade incluindo *E. velutina*, evidenciaram não promover efeitos hemolíticos nem tóxicos nas populações de células sanguíneas, mesmo em situações que ocorram o aumento da dose (MACHADO et al., 2013; LIMA et al., 2007). Um estudo utilizando extrato aquoso de folhas de *E. velutina*, sugere que, uma vez administrado agudamente, é classificado como atóxico por via oral em ratos (CRAVEIRO et al., 2008). Essas descobertas corroboram com os resultados dispostos no ensaio de toxicidade aguda.

Dessa forma, pode-se constatar que o tratamento oral com extrato de *E. velutina* em dose aguda de 2.000 mg/kg, não apresentou nenhum efeito tóxico no comportamento dos camundongos, bem como não houve óbito de animais e nem variações entre os parâmetros analisados (órgãos coletados, consumo de água, ração e ganho de peso).

5.3.2 Atividade ansiolítica

5.3.2.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Para investigação do potencial ansiolítico do extrato rotoevaporado das cascas de *E. velutina* (62,5, 125 e 250 mg Kg⁻¹) ambos administrados via oral, foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado (LCE), que tem como objetivo causar situações de conflitos a um determinado ambiente desconhecido, resultando em estados inibitórios, reduzindo a capacidade exploratória do camundongo, sendo caracterizado pela diminuição da visitação e/ou tempo de permanência nos braços abertos do equipamento (CAMPOS et al., 2013).

A eficácia de um fármaco ansiolítico pode ser mostrada através do aumento na atividade de camundongos nos braços abertos. No teste de labirinto de cruz elevada, a ansiedade convencional aumenta o número de entradas nos braços abertos bem como o tempo de permanência nas áreas do labirinto (HAN et al., 2009).

O medicamento ansiolítico padrão empregado é o diazepam que tem sido bastante utilizado na farmacologia comportamental como um composto referência para substâncias com ação ansiolítica (SODERPHALAM; HJORTH; ENGEL, 2009). Tal medicamento assim como outras drogas com potencial ansiolítico promovem aumento no tempo de permanência dos roedores nos braços abertos (RANG et al., 2003).

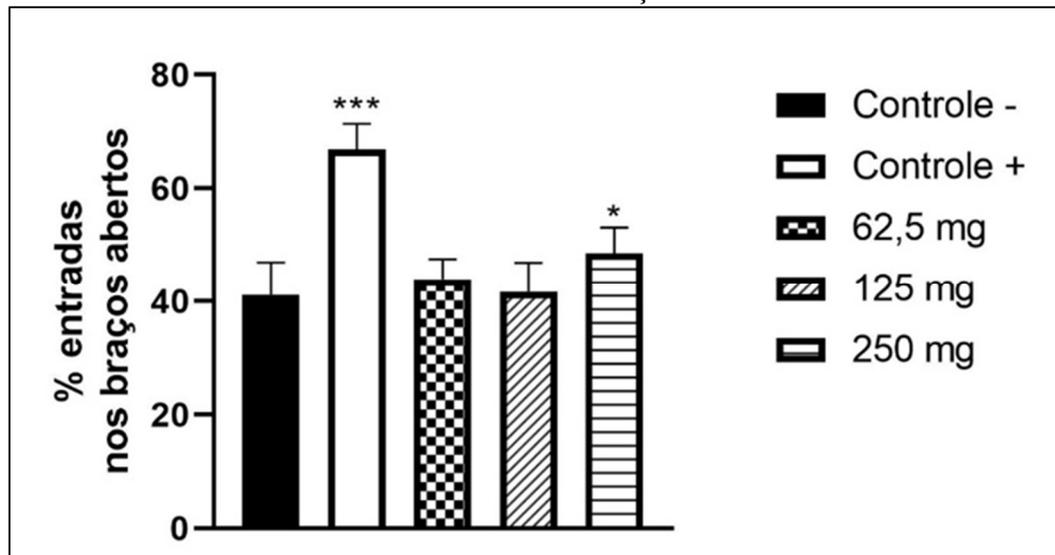
Neste estudo, o comportamento dos animais pré tratados com DZP (1 mg Kg⁻¹) apresentou resultados significativos, aumentando o número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos. Vale ressaltar que todos os grupos foram correlacionados com o controle, no qual foram administrados o veículo.

Com relação, ao estudo de LCE de *EEV* é possível observar que a administração do extrato nas concentrações de 62,5 e 125 mg Kg⁻¹ (Figura 12) não evidenciaram aumento significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos. A melhor resposta observada foi na dose de 250 mg Kg⁻¹ demonstrando um aumento de 8% na porcentagem de entrada nos braços abertos, conforme ilustrado na Figuras 5. Na literatura, uma pesquisa realizada por Lollato e colaboradores também não demonstrou diferença na porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto após a administração oral do extrato hidroalcoólico de *E. velutina* na concentração de 200 mg Kg⁻¹ quando confrontado com o grupo controle negativo (LOLLATO et al., 2010).

Entretanto, observou-se que os animais tratados com *EEV* nas doses 62,5 e 250 mg Kg⁻¹ (Figura 13) demonstrou aumento significativo na porcentagem do tempo gasto nos braços

abertos, quando comparado ao grupo controle (veículo). Assim, no teste LCE o aumento do número de entradas de braços abertos e o tempo de permanência nesses braços, são indicativos de medicamentos ansiolíticos, levando em consideração que esses animais acham seguros aos explora-los.

Figura 12 - Efeito da administração oral do *EEV* em camundongos *Swiss* na porcentagem do número de entradas nos braços abertos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

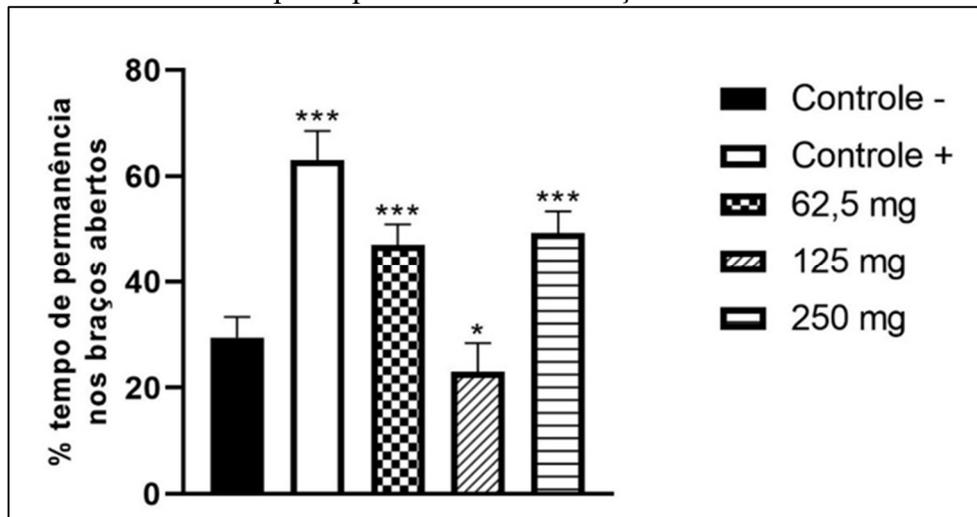
Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós teste de *Tukey* comparado ao controle negativo (solução salina 0,9%), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Um estudo realizado por Vasconcelos e colaboradores (2004) analisaram os efeitos comportamentais centrais dos extratos hidroalcoólicos da casca do caule de *Erythrina velutina* e *Erythrina mulungu* no teste de campo aberto em roedores. Os extratos foram administrados em doses únicas por via oral (200, 400 e 800 mg Kg⁻¹) em camundongos fêmeas. De acordo com os resultados, foi possível observar que ocorreram diminuições no número de entradas tanto nos braços abertos quanto nos fechados, logo após a administração da maior concentração (800 mg Kg⁻¹) de ambos os extratos analisados. Tal efeito pode estar relacionado a diminuição da atividade locomotora causada pelos extratos hidroalcoólicos testados.

Raupp e colaboradores (2008) avaliaram o efeito ansiolítico na administração oral aguda e crônica do extrato hidroalcoólico de *E. velutina* em camundongos, como resultados, eles observaram que na administração aguda não houve efeito ansiolítico, entretanto, um melhor

resultados foi visto na administração crônica na concentração de 100 mg Kg⁻¹ entre os dias 23º e 26º.

Figura 13 - Efeito da administração oral do *EEV* em camundongos *Swiss* na porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós teste de Tukey comparado ao controle negativo (solução salina 0,9 %), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

O emprego do modelo TLCE nesse estudo permitiu apontar uma possível ação ansiolítica aguda frente ao extrato das cascas de *E. velutina* sendo mais pronunciada na concentração de 250 mg Kg⁻¹ devido ao aumento considerável na porcentagem de entrada dos camundongos nos braços aberto do labirinto. Estes achados corroboram com o potencial tranquilizante relatado na literatura para a espécie *E. velutina* justificando seu uso pela medicina popular (RABELO et al., 2001; MACHIORO et al., 2005).

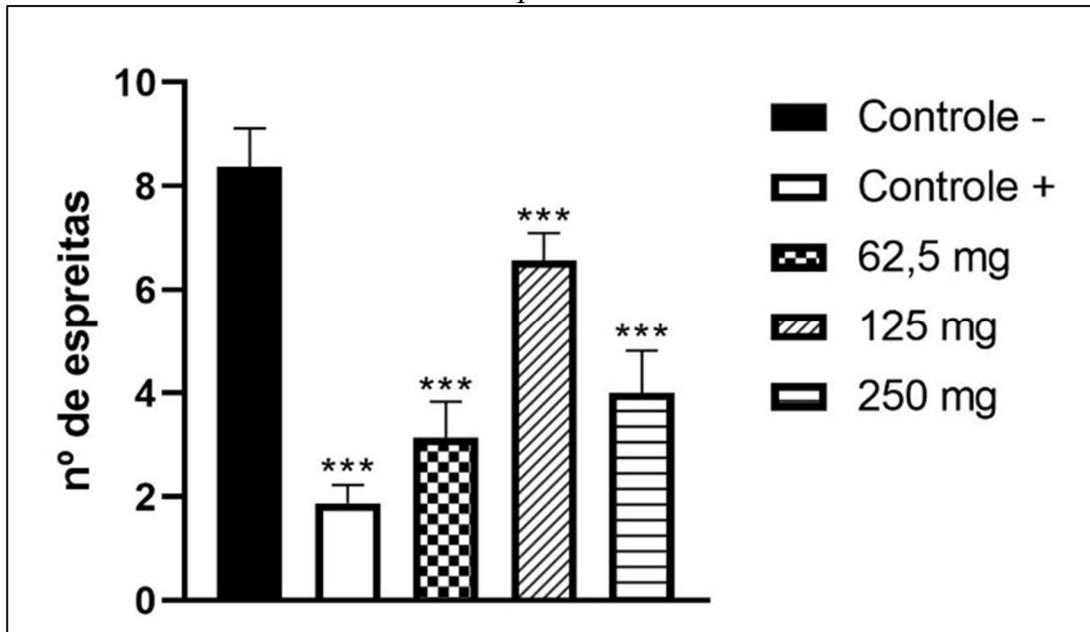
Estudo realizado por Chu e colaboradores (2019) analisaram o potencial ansiolítico e antidepressivo do extrato de *Erythrina*, utilizando testes de labirinto de cruz elevado, caixa claro/escuro, campo aberto, natação forçada e suspensão de caudas em camundongos, no qual o mecanismo de ação foi esclarecido por cromatografia líquida de alta performance, identificando através da fluorescência a presença de níveis de cinco neurotransmissores no cérebro (dopamina, noradrenalina, serotonina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA). No TLCE o extrato demonstrou aumento significativo na porcentagem de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos, mostrando uma ação ansiolítica considerável. Os resultados

referentes ao teste de caixa claro/escuro evidenciou também um aumento significativo na quantidade de tempo gasto na câmara de luz, os roedores tratados com o extrato igualmente promoveu aumento considerável no número de cruzamentos, e nos outros testes (natação forçada, suspensão de cauda) o extrato promoveu diminuição significativa no tempo de mobilidade, no qual, através do teste de fluorescência, a amostra testada demonstrou eficácia devido a variação dos níveis dos cinco neurotransmissores cerebrais.

Segundo Blanchard e colaboradores (2001) no teste de labirinto em cruz elevado em camundongos, o número de mergulhos de cabeça e espreitas são quesitos que integram uma avaliação de risco (*risk assessment*), uma conduta que pode estar correlacionado à hipervigilância, característico de indivíduos ansiosos. A análise ou avaliação de risco caracteriza uma antecipação de um perigo potencial, dispendo de um comportamento defensivo considerável de valor adaptativo. Aqueles indivíduos ansiosos tendem constantemente adiantar tal ameaça com o objetivo de conviver de melhor forma com isto, levando ao surgimento de prejuízos em ambos. Assim, os camundongos mais ansiosos aproximarão lentamente da saída da plataforma central, exibindo alta frequência de espreitas e de mergulho de cabeça (RODGERS, 1992).

As figuras 14, 15 e 16 serão avaliados os fatores etológicos, são eles: *stretched attend postures* (espreitas), *grooming* (autolimpeza), *head dippings* (mergulhos de cabeça) e *rearing* (levantar), todos esses comportamentos caracterizam a avaliação de risco no qual o animal antecipa um perigo potencial.

Figura 14 - Efeito da administração oral do EEV em camundongos Swiss no número de espreitas.



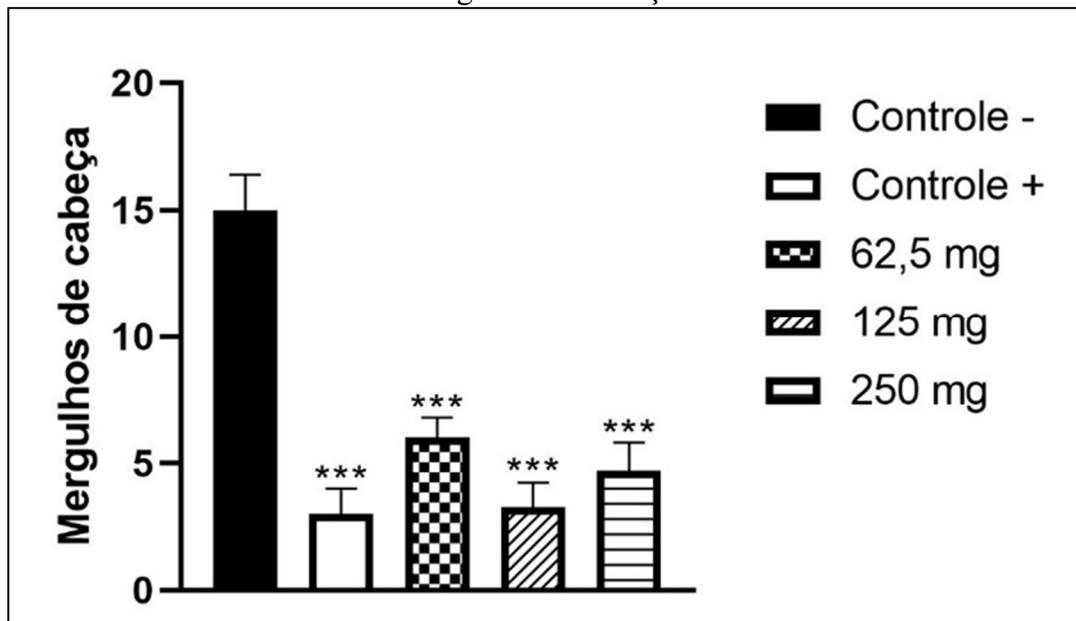
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós teste de Tukey comparado ao controle negativo (solução salina 0,9 %), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

A figura 14 apresenta os resultados obtidos em relação ao número de *stretched attend postures* (espreitas), onde foi possível observar que os números de espreitas foram mais pronunciados no controle negativo, no qual não há a presença de qualquer tratamento, tal comportamento diz respeito à hipervigilância presentes em indivíduos ansiosos. Ademais, o grupo tratado com DZP demonstrou diminuição significativa deste comportamento, isso se deu, possivelmente em razão da ação ansiolítica provocada pelo diazepam.

Com relação ao mergulho de *head dippings* (mergulhos de cabeça) ilustrado na figura 15, é possível observar que tal comportamento foi realizado com maior frequência pelo grupo do controle negativo, em controvérsia, os grupos tratados com o DZP e as doses de extrato apresentaram uma redução significativa.

Figura 15 - Efeito da administração oral do *EEV* em camundongos *Swiss* no número de mergulhos de cabeça.

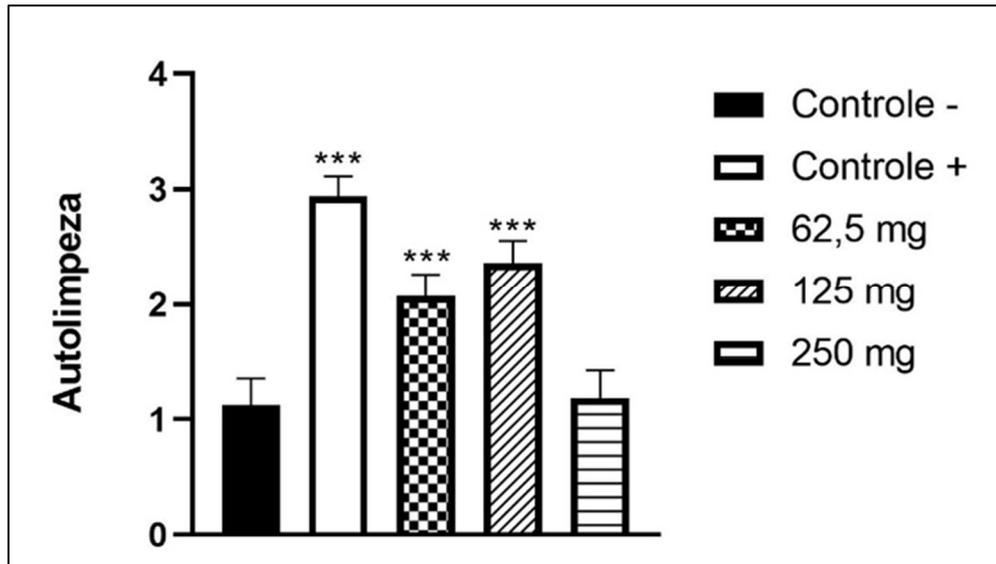


Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós teste de Tukey comparado ao controle negativo (solução salina 0,9 %), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Os outros fatores avaliados pela análise etológica, *grooming* (número de autolimpeza) e *rearing* (levantar) são apresentados nas figuras 16 e 18, respectivamente. Com relação ao *grooming* (Figura 18) os camundongos foram avaliados pela frequência em que eles apresentavam esse comportamento. Há evidências de que os benzodiazepínicos incluindo o diazepam, promovam uma diminuição de tais modos comportamentais, devido ao fato de que eles são capazes de reduzirem os estímulos ansiogênicos (SPRUIJT et al., 1992).

Figura 16 - Efeito da administração oral do *EEV* em camundongos *Swiss* no número de *grooming* (autolimpeza).



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós teste de *Tukey* comparado ao controle negativo (solução salina 0,9 %), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

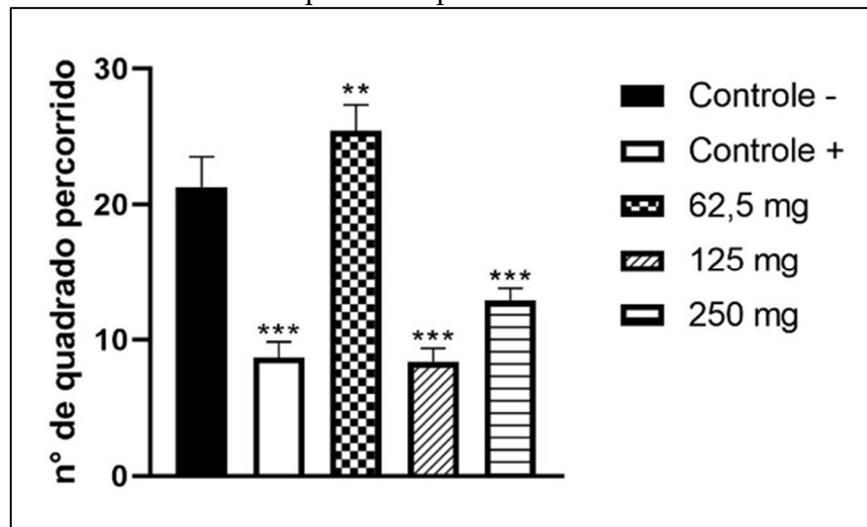
5.3.2.2 Teste de movimentação espontânea

A tendência natural de um animal em um ambiente novo é de explorá-lo, ainda pela presença do estresse e do conflito gerado pela própria exposição ao ambiente. O teste de movimentação espontânea tem como finalidade avaliar a capacidade de locomoção espontânea, além de analisar os comportamentos de *grooming*, *rearing* e quadrado percorrido dos animais tratados com o extrato nas doses de 62,5, 125 e 250 mg Kg^{-1} .

Os resultados apresentados na figura 17, evidenciou que o extrato das cascas de *E. velutina* na concentração de 62,5 mg Kg^{-1} não exibiu ação ansiolítica devido ao fato de que foi visto um aumento na ambulação dos animais referente a esse grupo. Entretanto, quando analisado o comportamento dos grupos de animais frente as doses 125 e 250 mg Kg^{-1} do extrato é possível observar que apresentou efeito significativo, uma vez que, houve redução do número de cruzamento no campo aberto, comportamento semelhante ao controle positivo, isso evidencia um possível efeito ansiolítico do extrato.

A figura 18 ilustra os resultados referentes ao número de *rearings* do *EVV*, no qual foi possível observar que os grupos tratados com as doses do extrato aumentaram quando comparado ao controle positivo, entretanto, se faz necessário, relatar a diminuição dos grupos tratados com o extrato quando comparado com o controle negativo (veículo).

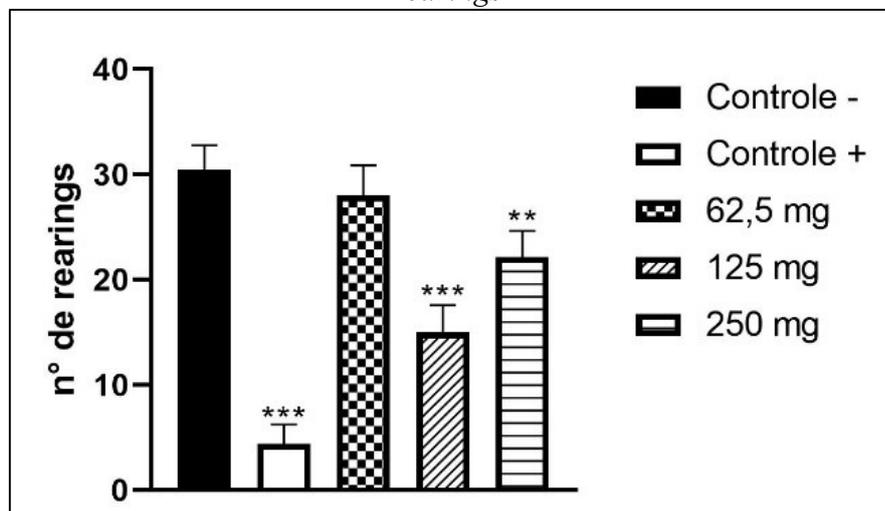
Figura 17 - Efeito da administração oral do EEV em camundongos Swiss no número de quadrados percorridos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós teste de Tukey comparado ao controle negativo (solução salina 0,9 %), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Figura 18 - Efeito da administração oral do EEV em camundongos Swiss no número de rearings.

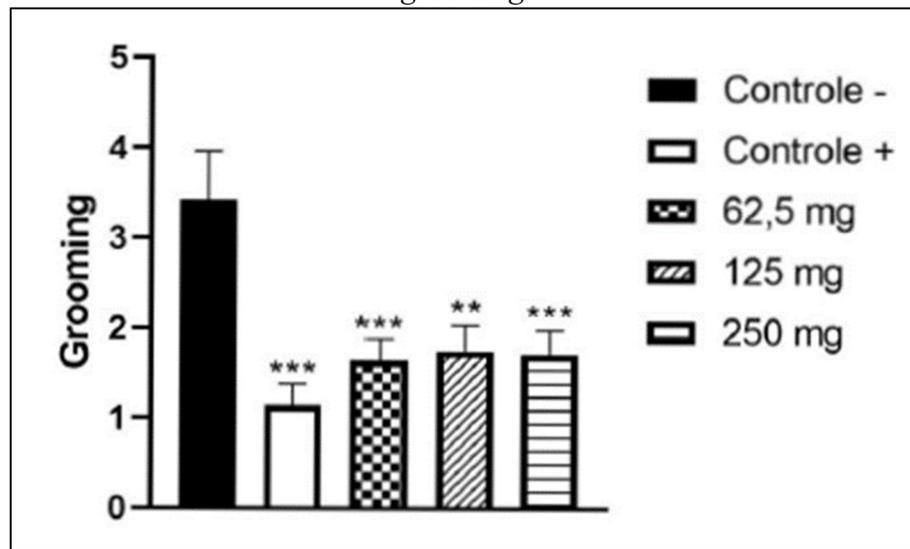


Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós teste de Tukey comparado ao controle negativo (solução salina 0,9 %), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Em relação ao número de *grooming* (Figura 19), os dados mostraram que houve um aumento dos grupos tratados com o extrato em comparação com o grupo tratado com diazepam, e o comportamento do grupo tratado com veículo apresentou maior número de autolimpeza em relação aos demais.

Figura 19 - Efeito da administração oral do *EEV* em camundongos *Swiss* no número de *grooming*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós teste de Tukey comparado ao controle negativo (solução salina 0,9%), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Doses únicas (200, 400 e 800 mg Kg^{-1}) dos extratos hidroalcoólicos de *E. velutina* e *E. mulungu* foram administradas em camundongos fêmeas no estudo realizado por Vasconcelos et al. (2004) utilizando as seguintes vias de administração: oral e intraperitoneal. Como resultados eles observaram que, houve uma redução na atividade locomotora dos roedores devido a diminuição do número de *rearing* e *grooming* no teste de campo aberto, porém somente na maior concentração após a administração oral.

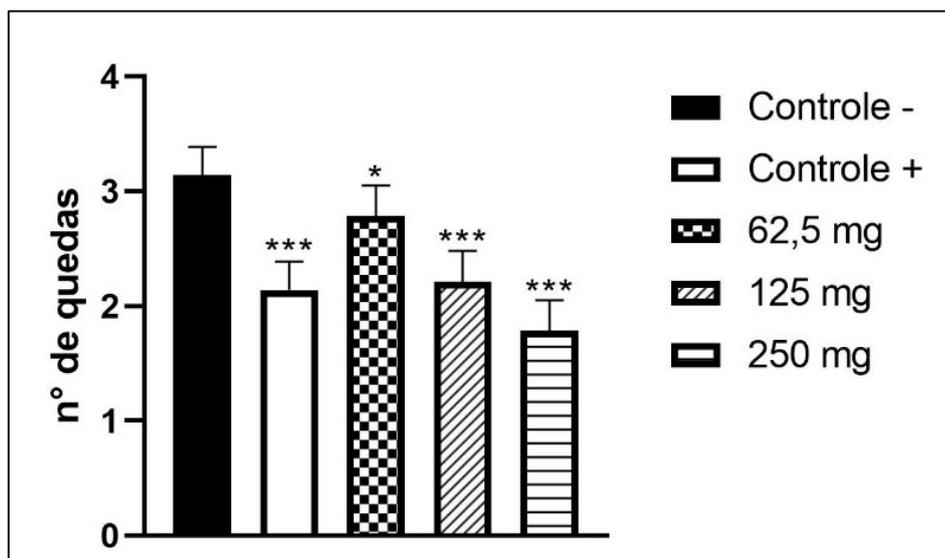
5.3.2.3 Teste de Rota Rod

Posteriormente, para avaliar se os tratamentos com o *EEV* causam prejuízos a função motora dos camundongos, foi realizado o teste de rota rod (TRR). Os resultados obtidos (Figura 20) demonstraram que não houveram alterações na função motora ou sedativas, pois tanto o grupo tratado com DZP como os demais grupos demonstraram redução no número de quedas.

Sendo assim, esses dados experimentais podem inferir que nas doses testadas do extrato das cascas de *E. velutina*, não houveram ação depressora no SNC.

Estudo realizado por Vasconcelos et al., (2004) avaliaram os efeitos comportamentais centrais dos extratos hidroalcoólicos também da casca do caule de *E. velutina* e *E. mulungu* no TRR. Os grupos tratados (Figura 12) com os respectivos extratos nas concentrações (200, 400 ou 800 mg Kg⁻¹) não demonstraram alterações no teste, bem como nas diferentes vias de administração também não houve mudança, sugerindo que os tratamentos não prejudicaram a coordenação motora no TRR, esses achados corroboram com os dados encontrados em nosso estudo.

Figura 20 - Efeito da administração oral do *EEV* em camundongos *Swiss* no teste de rota rod.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

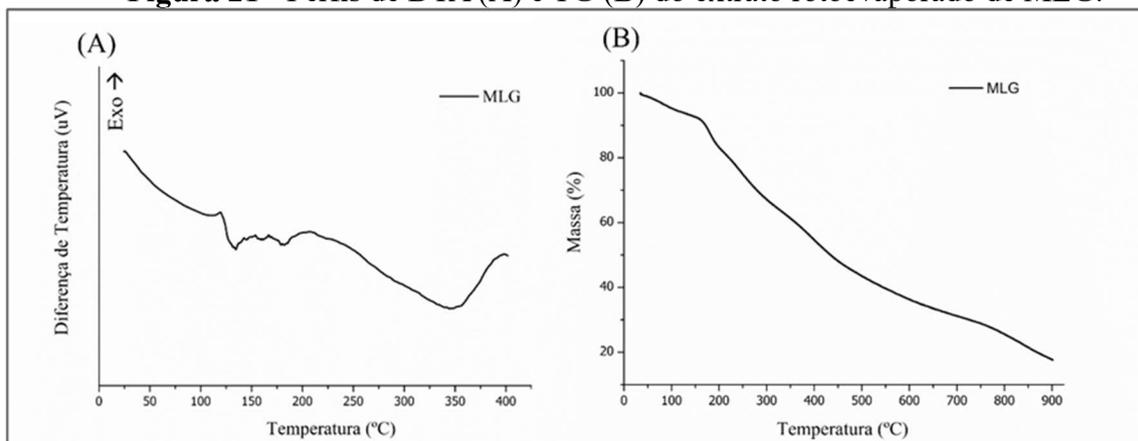
Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós teste de *Tukey* comparado ao controle negativo (solução salina 0,9 %), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

5.4 Estudo de compatibilidade

5.4.1 Análise térmica diferencial (DTA)

O extrato de *Erythrina velutina* foi caracterizado por técnicas termoanalíticas, com o intuito de observar as interações físico-químicas entre os componentes da formulação. As curvas de DTA do extrato e seus sistemas binários estão representados nas figuras 21, 22 e 23 e os dados numéricos estão descritos na tabela 2.

Figura 21 - Perfis de DTA (A) e TG (B) do extrato rotoevaporado de MLG.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os dados térmicos representados na figura 1 mostram a presença de eventos resultantes da mudança de fases em função da temperatura, no qual são revelados comportamentos térmicos relacionados a decomposição do insumo farmacêutico ativo vegetal.

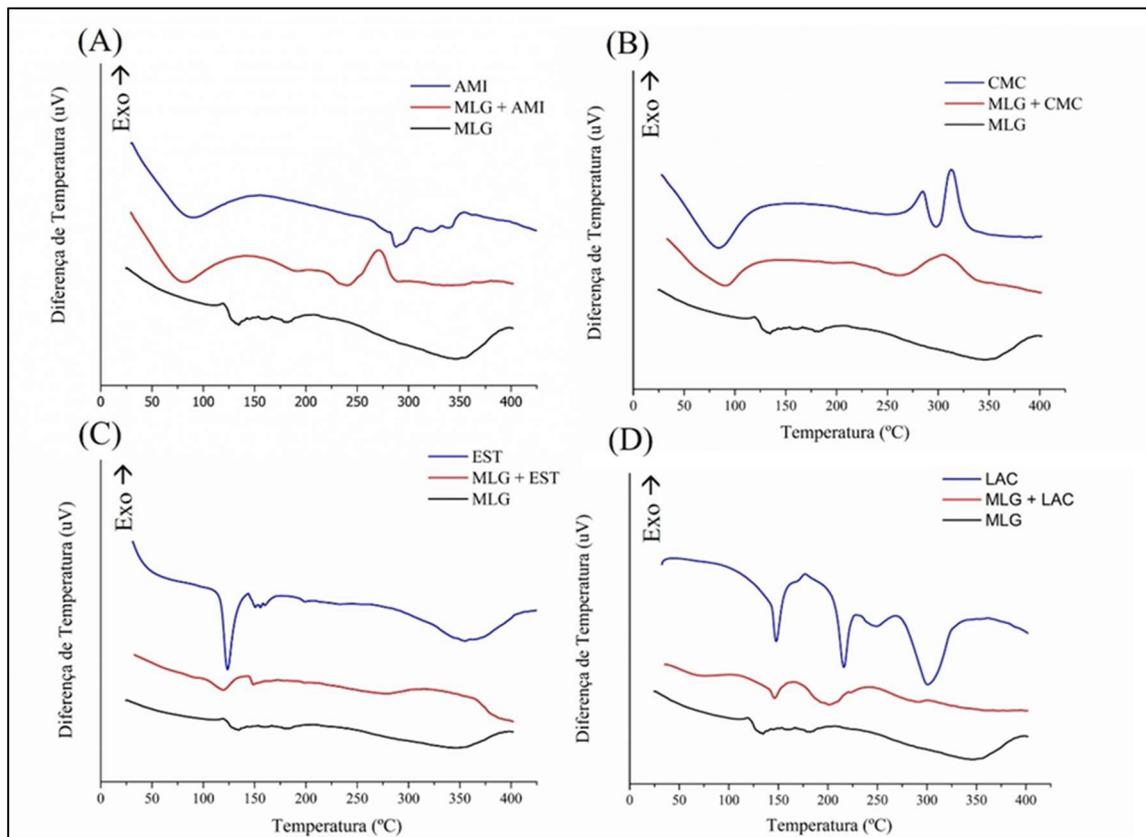
A curva DTA da *E. velutina* mostra a presença de um pico endotérmico por volta de 139,48°C ($\Delta H = - 28,83 \text{ J g}^{-1}$), possivelmente relacionado a perda de constituintes voláteis encontrados na amostra, como etanol e água. Este evento, na curva TG (Figura 21B) refere-se à uma perda de massa de 6,46 % da amostra. A decomposição dos compostos orgânicos presentes na droga vegetal inicia em 170,70°C e permanece até o fim do perfil analisado, correspondendo a uma perda de massa da amostra de 60,85%.

O segundo evento térmico corresponde a um evento endotérmico que ocorreu na faixa de temperatura entre 163,99 a 166,85°C, com temperatura de pico em 159,34°C, como pode ser observado na figura 21A. Em seguida, pode-se visualizar a presença de um terceiro comportamento térmico entre o intervalo de temperatura de 173,32 – 190,07°C correspondendo a um pico de 181,77°C ($\Delta H = - 17,17 \text{ J g}^{-1}$). Ademais, houve o surgimento de um quarto evento térmico entre as temperaturas de 245,94 a 363,79°C, com temperatura de pico em 344,47°C ($\Delta H = - 157,20 \text{ J g}^{-1}$). Tais eventos térmicos mencionados anteriormente, representam o extrato de *E. velutina* e foram empregados como referência no estudo de compatibilidade entre IFAV-excipientes.

A presença de alguns fatores como: imperfeições das formas, perda de produtos gasosos no aquecimento da droga vegetal bem como a presença de impurezas, explica o surgimento da má qualidade dos picos em DTA, devido a amostra se tratar de compostos de matrizes complexas. Tais fatores colaboram para o surgimento de picos endotérmicos com larguras defeituosas (ANDRADE et al, 2019).

As misturas binárias referentes a cada IFAV e excipiente farmacêutico foram avaliadas com o propósito de verificar o comportamento térmico de cada IFAV, isoladamente, como também na presença dos excipientes.

Figura 22. Perfis de DTA das misturas binárias do extrato MLG com excipientes farmacêuticos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Legenda: AMI – amido; CMC – carboximetilcelulose; EST – estearato de magnésio; LAC – lactose.

Para definir se nas curvas térmicas haveria ou não ocorrência de interação entre o IFAV e o excipiente, foram considerado alguns parâmetros. Dentre eles, destacam-se, o surgimento de eventos como inversão ou supressão de picos, deslocamentos e variações de entalpia em etapas principais relacionadas ao extrato e ao excipiente. Assim, a presença desses fatores levou a identificação de possíveis interações entre extrato-excipiente, apontando para uma maior atenção no emprego destes (ALMEIDA et al., 2019).

Algumas curvas apresentaram alterações expressivas de seus comportamentos térmicos em relação ao esperado. A curva de DTA da mistura binária de IFAV + AMI (figura 22A) mostra a presença de três eventos térmicos, o primeiro foi em 81,71°C ($\Delta H = -12,56 \text{ J g}^{-1}$) está

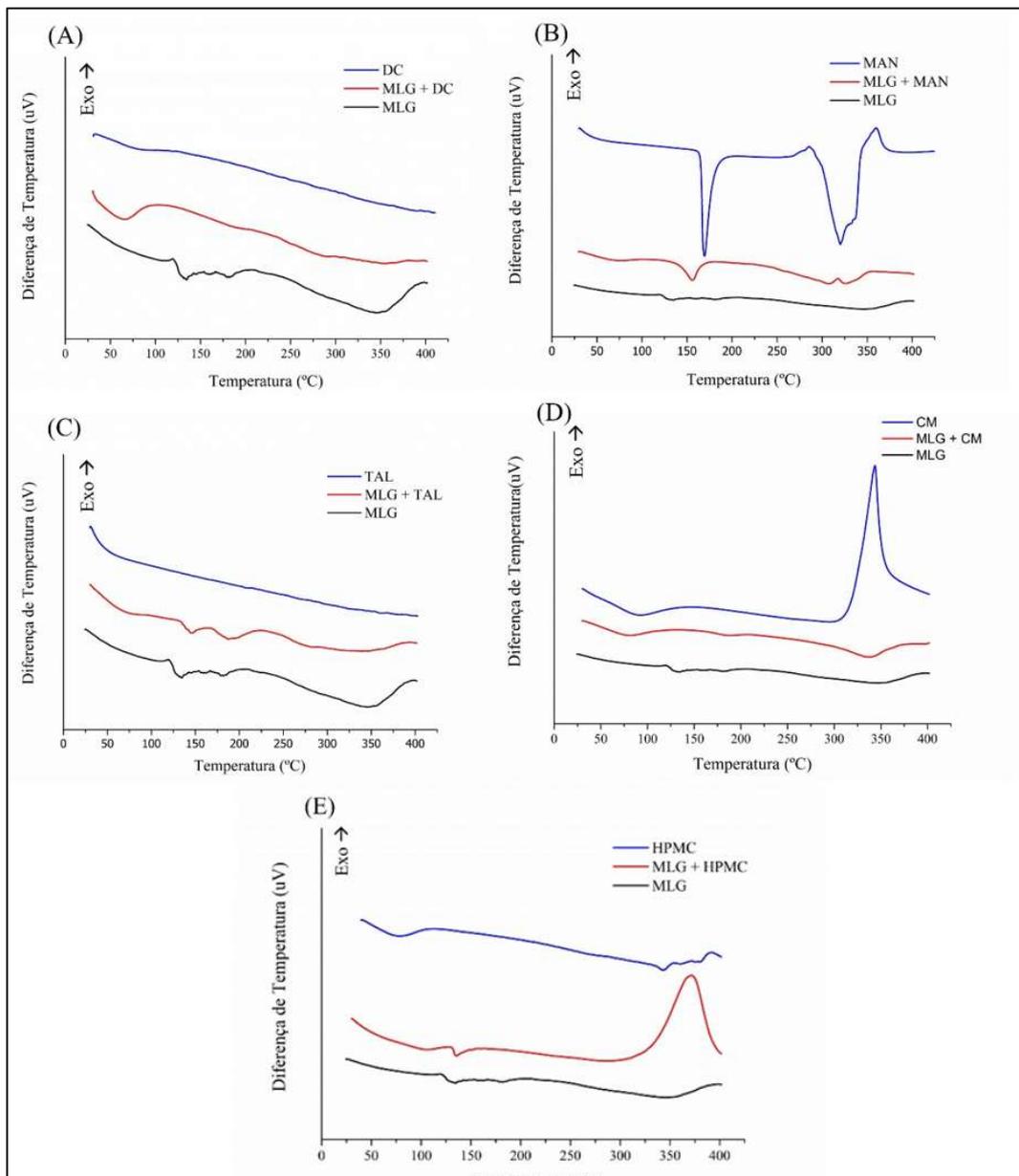
relacionado ao processo de desidratação da substância, o segundo pico ocorreu por volta de 239,26°C ($\Delta H = -169,24 \text{ J g}^{-1}$) e o terceiro evento térmico em temperatura de pico de 271,08°C ($\Delta H = 122,04 \text{ J g}^{-1}$), que caracteriza o aparecimento de um pico exotérmico, não existindo a presença do pico endotérmico do excipiente, esses fatores representa um efeito negativo na interação entre IFAV-AMI.

Em relação a curva de DTA de IFAV + CMC (figura 22B) foram observados a preservação das características somente do excipiente e ausência dos eventos térmicos do extrato, indicando assim que há uma possível incompatibilidade entre eles.

A curva de DTA de IFAV + EST está apresentada na figura 22C, apresenta vários indícios de possível compatibilidade entre o extrato e o excipiente. A curva da mistura demonstra similaridade ao segundo evento térmico do estearato de magnésio que está relacionado a seu ponto de fusão no qual ocorreu por volta de 123,68°C. O ponto de fusão referente as amostras comerciais do estearato de magnésio ficam entre uma faixa de temperatura de 117-150°C (ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009). Ademais, o evento de decomposição do estearato foi suprimido quando observado sua associação com o extrato. Sugere-se que as incompatibilidades relacionadas ao estearato de magnésio podem ser explicadas pela propriedade química do excipiente em questão, o qual é constituído por uma mistura de sais orgânicos formado por cátions de magnésio e ânions de diferentes ácidos graxos.

O perfil térmico da mistura de lactose com o IFAV (figura 22D) expressaram características exclusivas do excipiente. Os eventos característicos de desidratação que ocorreu por volta de 147,89 °C, seguido da fusão (216,20 °C) e o processo de decomposição térmica que foi demonstrado por dois picos endotérmicos, em 248,68 °C e 300,47 °C, respectivamente. Tais eventos são evidenciados no perfil térmico da mistura binária de lactose, na mesma faixa de temperatura. Entretanto, também foi possível observar o comportamento térmico do extrato, indicando uma possível compatibilidade entre a mistura MLG-LAC.

Figura 23 - Perfis de DTA das misturas binárias do extrato MLG com excipientes.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Legenda: DC – dióxido sílico coloidal; MAN – manitol; TAL – talco; CM – carboximetilcelulose; HPMC – hidroxipropilmetilcelulose.

O perfil térmico de DTA do MLG + DC (Figura 23A) observou-se características unicamente do excipiente, bem como ausência dos eventos térmicos do IFV na mistura 1:1, havendo somente a presença de um pico endotérmico em 49,65°C ($\Delta H = -3,45 \text{ J g}^{-1}$). Estudo realizado por Nep e Conway, os autores declaram que o ponto de fusão do DC é 1610 °C,

ficando fora da faixa de temperatura empregada para os experimentos. Tais indícios apontam para provável incompatibilidade térmica entre o IFAV e o excipiente.

O perfil de DTA do manitol (figura 23B), exibiu dois eventos térmicos bem característicos. O primeiro evento foi um pico endotérmico que ocorreu em 169,56 °C ($\Delta H = -47,41 \text{ J g}^{-1}$) no qual está relacionado ao seu ponto de fusão, e o segundo evento ocorreu em 320,28 °C ($\Delta H = -158,32 \text{ J g}^{-1}$) tal comportamento corresponde a decomposição do excipiente farmacêutico. O ponto de fusão corrobora com os descritos na literatura, que fica entre 166 e 168 °C (NEILL, 2013). A mistura binária produzida com manitol na proporção de 1:1 apresentou diferença de entalpia e supressão do pico do excipiente quando observado seu comportamento individual constatando uma possível interação entre o IFAV e o excipiente farmacêutico.

Em decorrência de sua natureza inorgânica, proveniente da composição de silicato de magnésio, o talco, promove uma curva de DTA sem eventos térmicos nas temperaturas estudadas (ROWE et al., 2009). O excipiente talco (Figura 23C) mostrou indícios de compatibilidade térmica com o IFAV, visto que não foram visualizadas alterações significativas no perfil térmico da interação entre extrato e o excipiente farmacotécnico.

De acordo com a figura 3, analisando as curvas de IFAV-CM (Figura 23D) foi possível observar alguns indícios de incompatibilidade. A curva da mistura suprimiu o evento endotérmico principal do excipiente.

A curva DTA da mistura MLG-HPMC (Figura 23E) mostrou a presença de dois eventos térmicos, um endotérmico e o outro exotérmico. O primeiro evento ocorreu entre 47 e 112 °C com temperatura de pico de 98,59 °C ($\Delta H = -55,27 \text{ J g}^{-1}$) possivelmente estando relacionado com a perda de umidade de superfície do HPMC, que ocorreu nesse mesmo intervalo de temperatura entre 45 e 98 °C (78,05°C/ $\Delta H = -40,70 \text{ J g}^{-1}$). Observou-se supressão de picos característicos do IFAV e do excipiente, e surgimento de um pico exotérmico, que ocorreu entre as temperaturas de 345 a 390 °C (370,56 °C/ $\Delta H = 270,46 \text{ J g}^{-1}$), este evento não é observado em nenhum dos componentes analisados isoladamente. Tais comportamentos térmicos podem ser um indicativo de incompatibilidade entre o IFAV e o HPMC.

Tabela 12 - Dados DTA do extrato rotaevaporado de E. velutina, excipientes e suas misturas binárias nas proporções 1:1 (IFAV:excipiente).

(continua)

Amostra	Evento	Início – Final (°C)	Pico (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
MLG	Primeiro	121,95 – 134,58	139,48	- 28,83
	Segundo	163,99 – 166,85	159,34	- 2,72
	Terceiro	173,32 – 190,07	181,77	- 17,17
	Quarto	245,94 – 363,79	344,47	- 157,20
AMI	Primeiro	53,37 – 117,70	89,31	- 22,45
	Segundo	283,31 – 302,24	287,66	- 4,05
	Terceiro	345,07 – 347,45	353,27	0,81
MLG + AMD	Primeiro	45,47 – 94,31	81,71	- 281,55
	Segundo	223,20 – 253,92	239,26	- 169,24
	Terceiro	260,54 – 282,41	271,08	122,04
CMC	Primeiro	65,72 – 106,69	84,12	- 692,56
	Segundo	275,01 – 291,68	284,73	150,34
	Terceiro	303,96 – 322,95	312,82	387,94
MLG + CMC	Primeiro	34,69 – 89,40	90,32	- 254,99
	Segundo	276,85 – 326,66	304,75	358,48
EST	Primeiro	35,88 – 71,87	35,87	- 5,11
	Segundo	118,25 – 130,43	123,68	- 17,48
	Terceiro	148,53 – 152,46	150,66	- 0,49
	Quarto	155,91 – 160,59	158,13	0,14
	Quinto	325,82 – 382,98	354,66	- 14,88
MLG + EST	Primeiro	105,40 – 129,90	119,59	- 112,66
	Segundo	145,50 – 145,91	148,89	- 7,12
LAC	Primeiro	144,44 – 155,21	147,89	- 294,24
	Segundo	209,88 – 222,86	216,20	- 226,34
	Terceiro	234,83 – 263,5	248,68	- 3,62
	Quarto	278,59 – 322,96	300,47	- 137,36

Tabela 12 - Dados DTA do extrato rotaevaporado de *E. velutina*, excipientes e suas misturas binárias nas proporções 1:1 (IFAV:excipiente).

(conclusão)

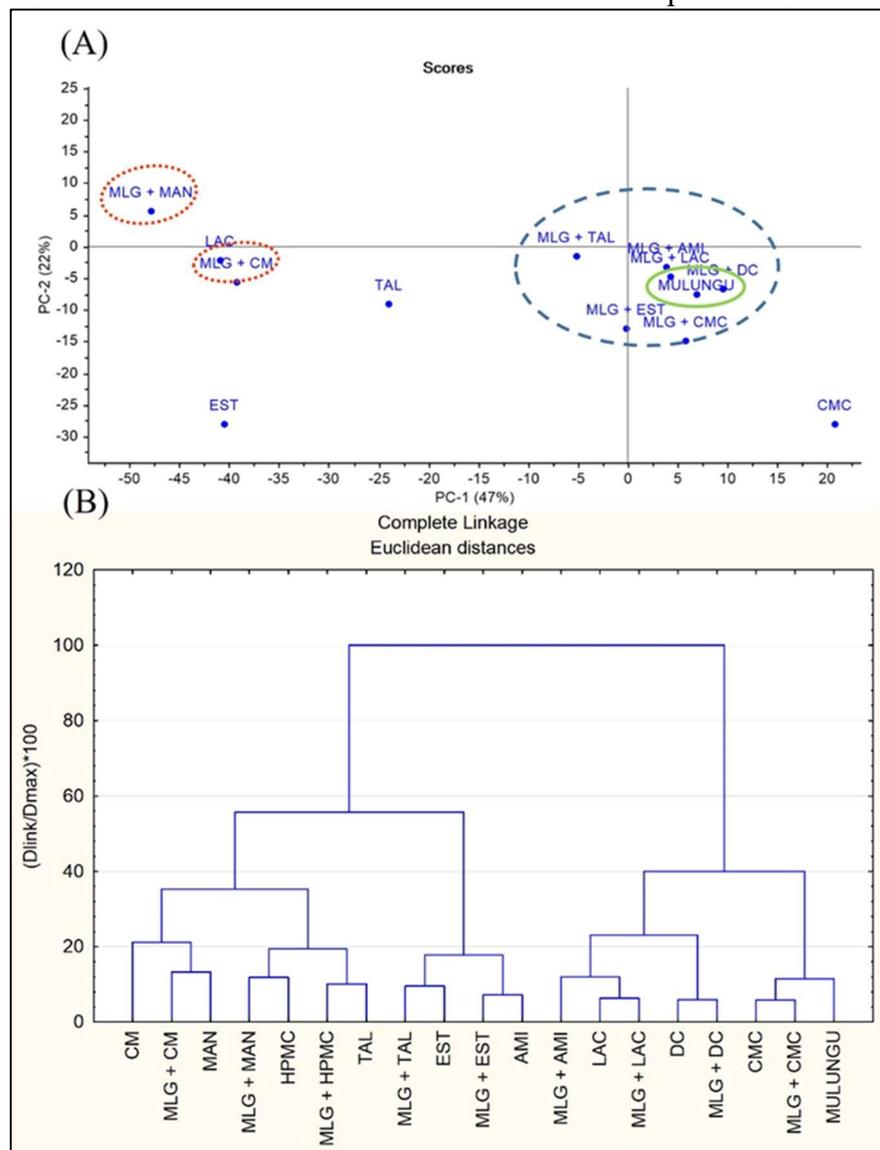
Amostra	Evento	Início – Final (°C)	Pico (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
MLG + LAC	Primeiro	58,43 – 94,49	75,30	- 52,98
	Segundo	139,93 – 151,82	146,22	-53,59
	Terceiro	177,23 – 217,76	201,13	- 227,86
DC	Primeiro	59,53 – 105,25	49,65	-3,45
MLG + DC	Primeiro	40,34 – 81,09	65,69	- 0,19
MAN	Primeiro	165,45 – 177,56	169,56	- 47,41
	Segundo	298,35 – 342,11	320,28	- 158,32
MLG + MAN	Primeiro	35,40 – 75,36	77,42	- 143,68
	Segundo	140,71 – 165,63	155,98	- 517,78
	Terceiro	309,85 – 324,36	317,41	32,68
TAL	Primeiro	38,56 – 61,19	38,76	- 0,74
MLG + TAL	Primeiro	133,83 – 155,55	146,70	- 60,17
	Segundo	174,12 – 212,48	187,36	- 99,91
HPMC	Primeiro	45,19 – 98,90	78,05	- 40,70
	Segundo	336,69 – 350,51	343,05	- 5,06
	Terceiro	356,06 – 368,50	360,54	- 1,04
	Quarto	382,46 – 400,53	391,93	8,37
MLG + HPMC	Primeiro	47,10 – 112,61	98,59	- 55,27
	Segundo	345,79 – 390,50	370,56	270,46
CM	Primeiro	50,73 – 112,03	92,00	- 390,00
	Segundo	320,57 – 351,57	343,71	2,5×105
MLG + CM	Primeiro	36,96 – 96,71	82,30	- 314,45
	Segundo	165,48 – 199,70	187,69	- 73,69
	Terceiro	307,08 – 353,51	338,17	- 842

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Legenda: MLG – *E. velutina*; AMI – amido; DC – dióxido de sílico coloidal; MAN – manitol; – LAC – lactose; EST – estearato de magnésio; CM – celulose microcristalina; TAL – talco; CMC – carboximetilcelulose; HPMC – hidroxipropilmetilcelulose.

Em um estudo térmico de interação fármaco-excipiente, a curva relacionada a mistura será sempre a soma de eventos das curvas dos componentes isolados presentes no sistema. A presença de supressão, deslocamento de eventos térmicos relativo ao fármaco ou excipiente, tais eventos levam a apontar possível interação entre ambos (CHADHA; BHANDARI, 2014). Desse modo, o emprego de técnicas quimiométricas que possibilitam a diminuição de informações em gráficos e tabelas de análise das interações de modo ágil e com facilidade é imprescindível devido ao grande número de dados e a necessidade da confrontação de gráficos das misturas binárias (SANTANA et al., 2017; FERNANDES et al., 2016; VERAS, 2012).

Figura 24 – Análise de componentes principais (A) e análise hierárquica (B) dos dados de DTA das misturas binárias do extrato MLG com os excipientes farmacêuticos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Com os dados resultantes das curvas de DTA das misturas binárias e das substâncias puras, matrizes foram traçadas propondo-se a aplicação de duas técnicas quimiométricas por reconhecimento de padrões, análise hierárquica de dados (HCA) e análise de componentes principais (PCA).

A HCA e PCA para o extrato de MLG, excipientes e misturas estão dispostos nas figuras 24A e 24B. Na análise de HCA (Figura 24B) é possível observar a formação de dois grandes grupos, o primeiro estando relacionado as misturas com maior similaridade ao MLG e o segundo agrupamento está correlacionado com os excipientes e as demais misturas binárias. A mistura do extrato com o manitol e a celulose microcristalina promoveu menor similaridade em relação ao MLG. Isto sugere uma possível interação extrato-excipiente através da disposição em torno do excipiente nos dendrogramas.

Com relação a análise de PCA (Figura 24A) verificou-se a presença de um agrupamento de extrato com as seguintes misturas binárias: MLG-DC, MLG-LAC, MLG-AMI, MLG-TAL, MLG-EST e MLG-CMC tais misturas se agruparam em distancias próximas e com maior proximidade com o IFAV, dados esses que corroboram com a análise de HCA. Outro grupamento formado foi visualizado com as misturas binárias de MLG-MAN e MLG-CM, no qual se distanciaram do extrato mostrando maior proximidade com os excipientes, indicando, dessa forma, conforme apresentado em HCA, uma interação extrato-excipiente entre estes. Assim sendo, como foi visto na análise por DTA, os eventos térmicos do IFAV foram extintos prevalecendo na maioria das misturas apenas os eventos do excipiente farmacêutico ou o surgimento de novos eventos térmicos divergindo com o perfil térmico das substancias analisadas isoladamente.

Por fim, para uma investigação mais aprofundada relacionada os indícios de incompatibilidades, realizou-se também um estudo de perda de massa por termogravimétrica das misturas e dos componentes isolados.

5.4.2 Termogravimetria (TG)

As curvas de TG referentes as misturas binárias do extrato de *Erytrina velutina* e excipientes farmacêuticos: AMI, CMC, EST, LAC, DIOX, MAN, TAL e HPMC estão apresentadas nas figuras 25 e 26. Os dados térmicos são exibidos na tabela 3.

A curva termogravimétrica obtida para a mistura com amido (Figura 25B) evidenciou três etapas de decomposição. A primeira etapa iniciou em 46,85 °C com uma perda de massa de 7,85 %, estando relacionado com a eliminação de água aderido a amostra. O segundo evento térmico da curva TG diz respeito ao início da etapa de decomposição em intervalo de temperatura referente a 302,96 a 330,64 °C ($\Delta_m\% = 69,43$) o que indica a ocorrência da degradação térmica dos polissacarídeos amilose e amilopectina (MARINESCU; PINCU; MELTZER, 2013).

O perfil termogravimétrico de AMI + IFAV (figura 25B) é composto por quatro etapas de decomposição, iniciando em 46,85 a 88,69 °C com perda de massa de 7,85%. Tal evento diz respeito ao processo de desidratação do amido que vai até 100 °C. A segunda etapa ocorreu por volta de 170,50°C e a terceira que foi entre 261,99°C e 339,40°C correspondendo a uma perda de massa de 70,11%. A decomposição permanece até o fim da curva, obtendo uma perda de massa referente a 30,41%. Dessa forma pode-se constatar que a mistura proporcionou uma maior estabilidade térmica ao extrato, tendo em vista que a etapa de decomposição do extrato teve início em 170,40°C.

A carboximetilcelulose é classificada como um excipiente farmacêutico bastante utilizado em formulações de comprimidos, com função desintegrante e aglutinante. A curva TG da CMC (figura 25C) mostrou que a perda de massa ocorreu em três etapas. A primeira etapa ocorreu entre 44,01 a 83,43 °C ($\Delta_m\% = 15,31$), evento relacionado a desidratação da amostra. O segundo evento ocorreu em 277,01 a 306,77° C ocasionando uma perda de massa de 38,93%, o qual está relacionado com uma parte da degradação da matéria prima.

A curva termogravimétrica da mistura de CMC + MLG (figura 25C) apresentou 5 etapas de decomposição. A primeira etapa apresentou um pico característico do processo de desidratação que foi expresso no intervalo de temperatura entre 39,33°C a 58,37°C, seguido da degradação térmica que se inicia em 200,54 °C correspondendo a uma perda de massa de 9,23%. Pode-se constatar que quando comparada com a curva do CMC separadamente, a mistura desses componentes levou a um aumento da estabilidade térmica, indicando uma interação positiva com o extrato de MLG.

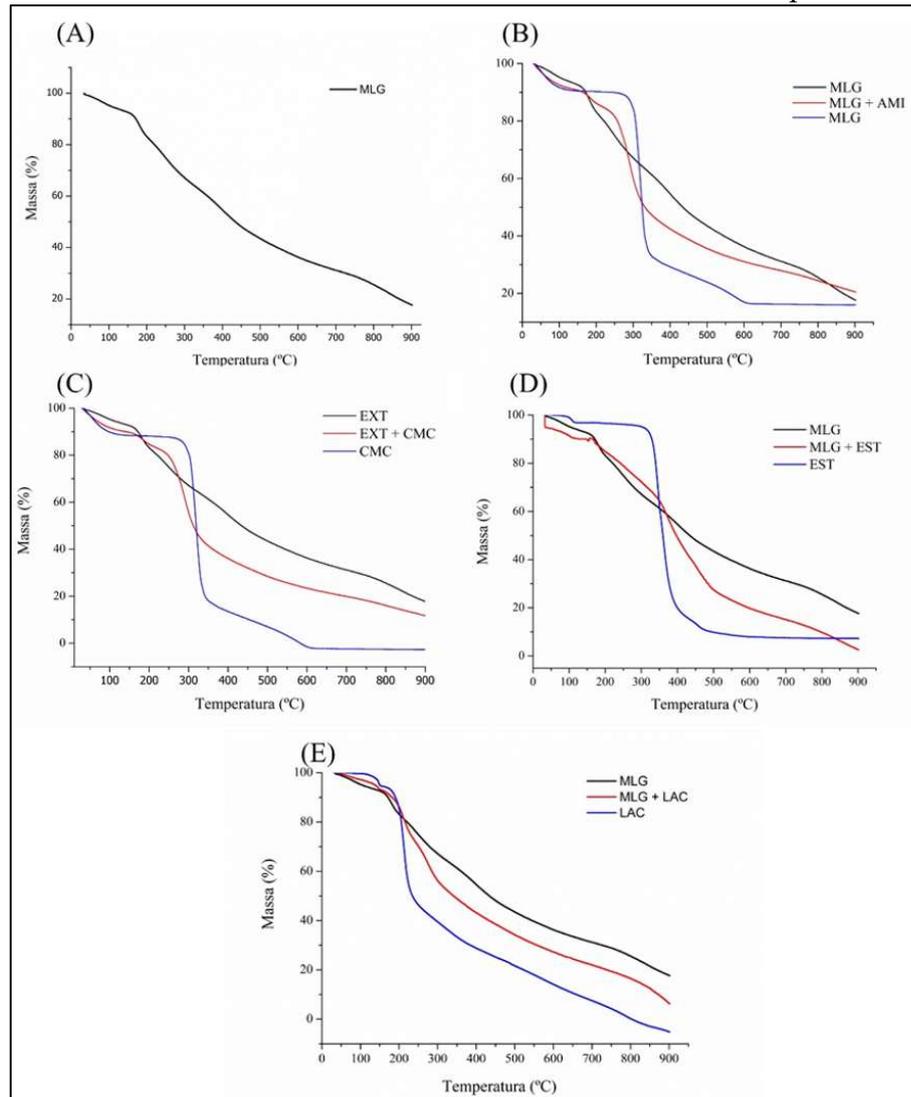
As curvas termogravimétricas obtidas para a mistura com estearato de magnésio (Figura 25D) mostrou características de ambos os componentes. A mistura perdeu massa em três etapas de decomposição. O primeiro evento ocorreu entre 39 e 62°C com perda de massa de 4,65%, possivelmente relacionado ao primeiro evento do excipiente relativo à perda de água por desidratação. Por conseguinte, o segundo evento térmico que ocorreu por volta de 324,22 a 559,06°C estando relacionado com a degradação do estearato de magnésio. A terceira etapa térmica ocorreu no intervalo de temperatura de 809,91 a 817,48°C, com perda de massa de 4,76%, finalizando o processo de decomposição da mistura.

Com relação ao perfil termogravimétrico da lactose, a curva apresentou uma etapa de perda de massa referente a 4,73% tal evento diz respeito a se tratar de lactose monohidratada que apresenta cerca de 5% em massa de água (Rowe, Sheskey e Quinn, 2009).

Vale ressaltar que, a curva TG de lactose (figura 25E), é termicamente estável até 107,98 °C, a partir dessa temperatura foi possível observar a presença de quatro etapas de

decomposição, iniciando em 185,12°C com perda de massa de 23,11% tal evento referente ao processo de degradação. A mistura desses componentes ocasionou um aumento na estabilidade térmica, visto que a degradação da mistura binária iniciou em temperatura maior quando comparado com a LAC e o MLG separadamente, conferindo um indicio de compatibilidade física.

Figura 25 - Perfis de TG das misturas binárias do extrato MLG com excipientes farmacêuticos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Legenda: AMI – amido; CMC – carboximetilcelulose; EST – estearato de magnésio; LAC – lactose.

A curva TG de MLG + DC (Figura 26A) evidenciou que a mistura física é termicamente estável até 179 °C. Após essa temperatura, a mistura perdeu massa em duas etapas de decomposição, a primeira em 179,61 a 217,29 °C ($\Delta m\% = 43,57$) referente ao processo de

desidratação. A segunda etapa ocorreu por volta de 413,92 – 588,18 °C, resultando em uma perda de massa de 43,57 °C.

Em relação à curva TG do manitol (Figura 26B) observa-se a presença de uma única etapa de perda de massa, ocorrido por volta de 312 °C. Abaixo de 300° C o manitol permanece estável, a partir dessa temperatura o manitol começa a perder massa. A porcentagem de massa perdida alcança um máximo em 324 °C e praticamente todo o restante de sua massa é eliminada em 340 °C. A mistura de MLG + MAN (Figura 26B) expressou a presença de duas etapas de perda de massa (Tabela 2). A primeira etapa inicia em 53,46 °C com perda de massa de 61,92% provavelmente relacionado a um evento do extrato, uma vez que o excipiente se mostra estável nessa temperatura. A segunda etapa da curva TG ocorreu entre 275,45 a 319,62 °C ($\Delta m\% = 61,92$) o que sugere a ocorrência da degradação térmica do manitol.

No tocante à mistura de MLG + TAL (Figura 26C) verificou-se que apresenta uma maior estabilidade térmica, pelo fato de que os eventos térmicos nessa mistura evidenciaram características semelhantes referente a curva do extrato quando analisada separadamente. A curva TG da respectiva mistura é composta por eventos de perda de massa. O primeiro evento inicia em 81,25 °C ($\Delta m\% = 5,51$) relacionado a perda de umidade da amostra. O segundo evento ocorreu na faixa temperatura de 241,22 a 270,95 °C (-24,23%), correspondente ao início da decomposição térmica. O Terceiro evento de decomposição acontece em 547,22 °C com perda de massa de 26,96%.

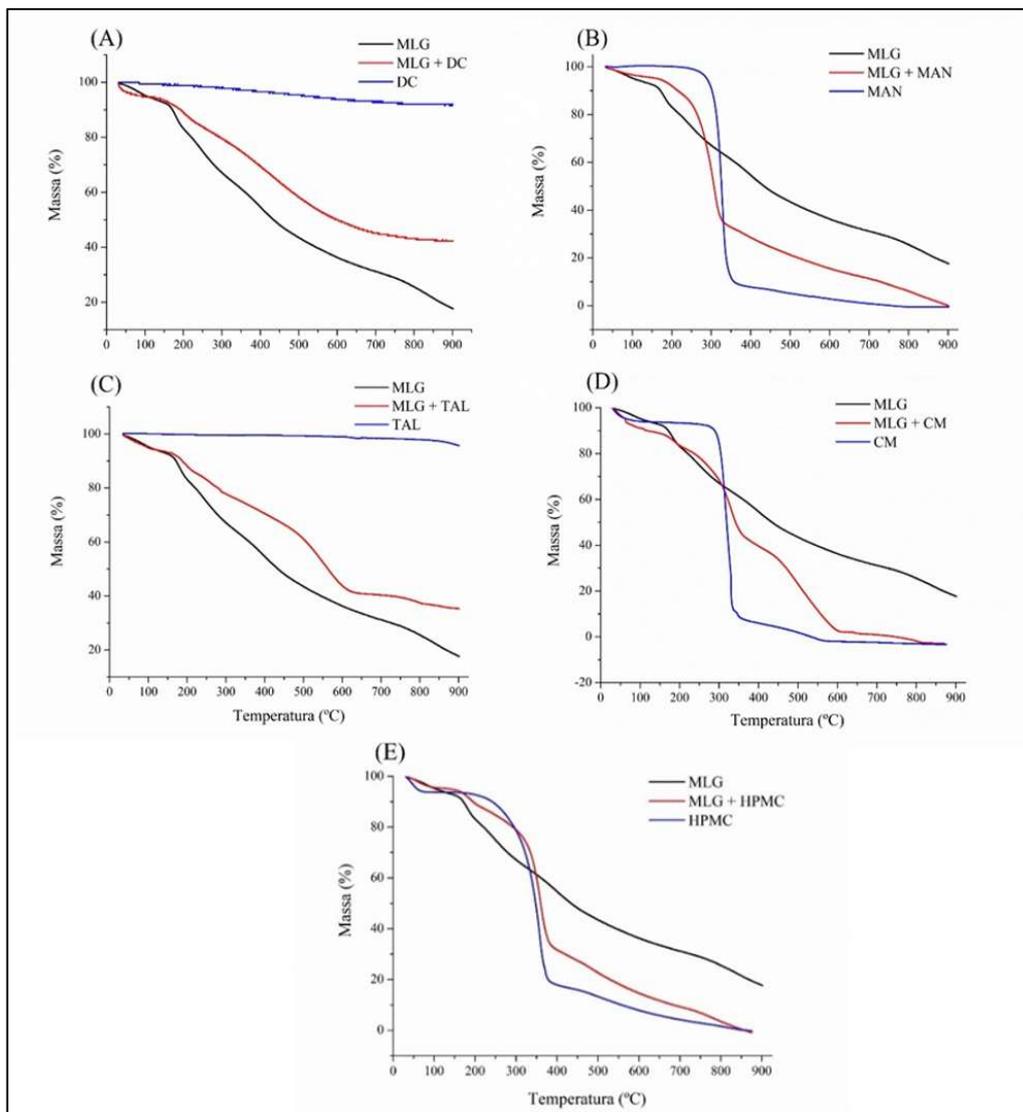
Os dados obtidos da curva TG de MLG + CM (Figura 26D) demonstraram que a celulose sofreu perda de umidade em três etapas térmicas. A primeira etapa foi entre 44,36 a 57,99 °C ($\Delta m\% = 5,11$) e refere a perda de água (FERNANDES et al., 2016). A segunda etapa onde é mais intensa, ocorreu entre 328,59 – 340,24 °C com perda de massa de 84,60%, nessa etapa houve degradação térmica de grande parte do adjuvante farmacotécnico. A terceira etapa corresponde a continuação da degradação da matéria-prima registrada na faixa de temperatura entre 481,59 – 557,07 °C ($\Delta m\% = 8,39$).

Na CM e sua mistura física (Figura 26D) o primeiro pico ocorreu na temperatura de 58,22 – 68,41 °C, sugerindo a ocorrência de perda de umidade como mencionado anteriormente. Posterior ao processo de desidratação, tem-se início a degradação da amostra, expresso entre 233,16 a 289,90 °C, com temperatura superior a degradação do extrato concedendo uma maior estabilidade térmica ao sistema.

A figura 26E mostra o perfil térmico da mistura MLG + HPMC, as curvas termogravimétricas revelam que a mistura perdeu massa em três eventos térmicos. O primeiro evento foi expresso em temperatura entre 53,00-76,00 °C ($\Delta m\% = 3,55\%$) a este evento é

atribuído a perda de água referente ao adjuvante. O segundo evento se processou em 177 °C, seguido do terceiro evento ocorrido na faixa de temperatura de 337,66 – 373,08 °C estando correlacionado com a degradação do HPMC e do IFAV, demonstrando um efeito positivo na interação da mistura binária pelo fato de que promoveu um aumento de temperatura de degradação do IFAV com o excipiente, conferindo estabilidade térmica.

Figura 26 - Curvas de TG das misturas binárias do extrato MLG com excipientes farmacêuticos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Legenda: DC – dióxido sílico coloidal; MAN – manitol; TAL – talco; CM – carboximetilcelulose; HPMC – hidroxipropilmetilcelulose.

Tabela 13 – Dados de TG referentes às etapas de decomposição do extrato de E. velutina, excipientes e suas misturas binárias nas proporções 1:1 (IFAV:excipiente).

(continua)

Amostras	Etapa 1		Etapa 2		Etapa 3		Etapa 4		Etapa 5	
	Início – Final (°C)	Perda de Massa (%)	Início – Final (°C)	Perda de Massa (%)	Início – Final (°C)	Perda de Massa (%)	Início – Final (°C)	Perda de Massa (%)	Início – Final (°C)	Perda de Massa (%)
MLG	94,06 – 109,83	6,46	170,70 – 280,98	60,85	785,17 – 845,12	13,54	----	----	----	----
AMI	45,46 – 88,27	10,15	302,96 – 330,64	69,43	567,15 – 609,53	16,84	----	----	----	----
MLG + AMI (1:1)	46,85 – 88,69	7,85	170,50 – 197,23	6,35	261,99 – 339,40	70,11	170,50 – 197,23	6,35	----	----
CMC	44,01 – 83,43	15,31	277,01 – 306,77	38,93	658,39 – 756,75	21,89	----	----	----	----
MLG + CMC (1:1)	39,33 – 58,37	12,41	200,54 – 214,07	9,23	279,83 – 307,90	25,04	370,84 – 456,66	13,63	793,10- 876,82	25,79
EST	98,94 – 114,27	2,90	332,33 – 379,69	85,74	489,28 – 619,26	2,23	----	----	----	----
MLG + EST (1:1)	39,71 – 62,06	4,65	324,22 – 559,06	89,09	809,91 – 817,48	4,76	----	----	----	----
LAC	140,08 – 151,72	4,97	198,95 – 225,76	50,82	277,26 – 450,90	47,10	----	----	----	----
MLG + LAC (1:1)	185,12 – 225,30	23,11	260,92 – 308,97	29,11	438,06 – 532,64	19,65	832,17 – 906,06	15,64	----	----
DC	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
MLG + DC (1:1)	179,61 – 217,29	8,24	413,92 – 588,18	43,57	----	----	----	----	----	----
MAN	312,25 – 340,09	91,74	453,32 – 651,15	8,02	----	----	----	----	----	----
MLG + MAN (1:1)	53,46 – 85,54	3,72	275,45 – 319,62	61,92	740,10 – 827,4	30,05	----	----	----	----

Tabela 13 – Dados de TG referentes às etapas de decomposição do extrato de E. velutina, excipientes e suas misturas binárias nas proporções 1:1 (IFAV:excipiente).

Amostras	Etapa 1		Etapa 2		Etapa 3		Etapa 4		Etapa 5		(conclusão)
	Início – Final (°C)	Perda de Massa (%)	Início – Final (°C)	Perda de Massa (%)	Início – Final (°C)	Perda de Massa (%)	Início – Final (°C)	Perda de Massa (%)	Início – Final (°C)	Perda de Massa (%)	
TAL	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
MLG + TAL (1:1)	81,25 – 91,02	5,51	241,22 – 270,95	24,23	547,22 – 617,60	26,96	----	----	----	----	----
HPMC	36,80 – 61,87	5,90	328,50 – 370,85	74,51	544,60 – 743,39	17,12	----	----	----	----	----
MLG + HPMC (1:1)	53,07 – 76,47	3,55	177,52 – 190,0	6,51	337,66 – 373,08	45,42	----	----	----	----	----
CM	44,36 – 57,99	5,11	328,40 – 340,24	84,60	481,59 – 557,07	8,39	----	----	----	----	----
MLG + CM	58,22 – 68,41	11,03	233,16 – 289,90	17,75	314,15 – 345,85	26,13	469,97 – 590,30	39,96	----	----	----

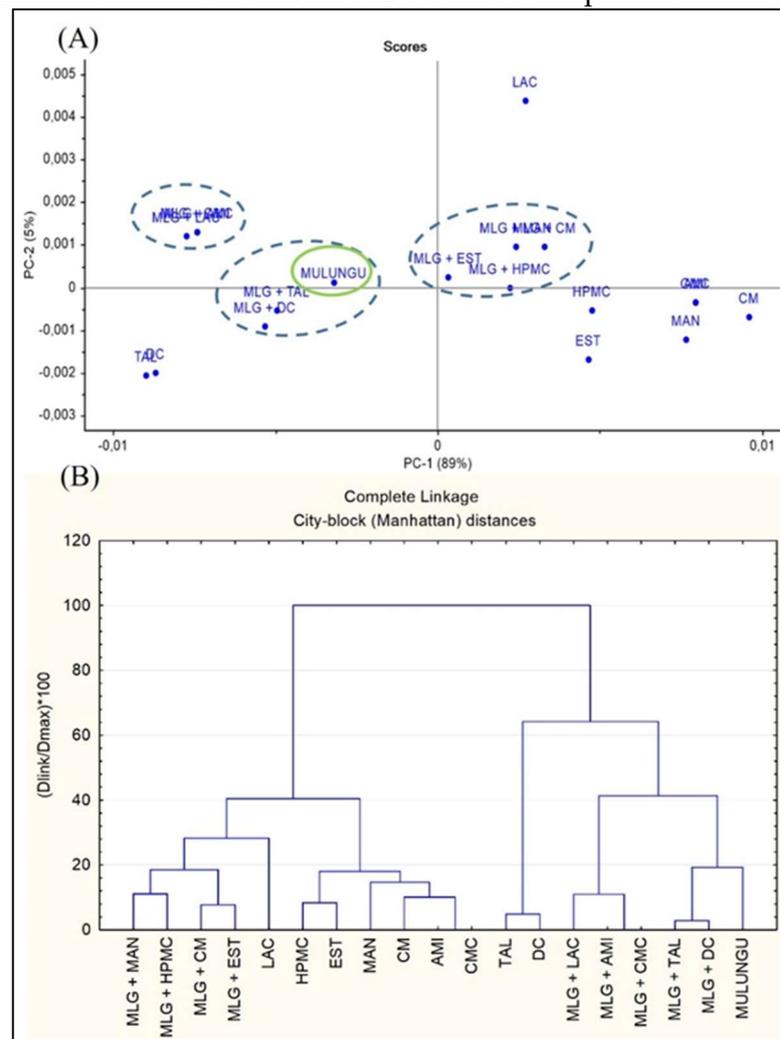
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Legenda: MLG – E. velutina; AMI – amido; DIOX – dióxido de sílico coloidal; MAN – manitol; – LAC – lactose; EST – estearato de magnésio; LAC – lactose; MAN – manitol; TAL – talco; CMC – carboximetilcelulose.

O gráfico de *scores* (Figura 27A) para as misturas binárias e substâncias puras gerado através da técnica de PCA pelos dados de TG, com PC1×PC2 apresentou 89% e 5% respectivamente de variância explicada. Deste modo, foi capaz de identificar com maior segurança possíveis interações presentes nas misturas através da técnica de TG.

Os resultados referentes aos cálculos de PCA (Figura 27A) evidenciou a formação de agrupamentos, os quais estão relacionadas as misturas binárias, ao extrato e ao excipiente. Em termos de distância, observou-se a formação de um grupo com maior proximidade das misturas com o extrato MLG em comparação com o adjuvante farmacêutico, indicando maior representação do IFAV na decomposição térmica das misturas analisadas, sugerindo interação positiva entre extrato-excipiente. Tal comportamento foram concordantes com o dendrograma de HCA (Figura 27B).

Figura 27 – Análise de componentes principais (A) e análise hierárquica (B) dos dados de TG das misturas binárias do extrato MLG com os excipientes farmacêuticos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

5.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

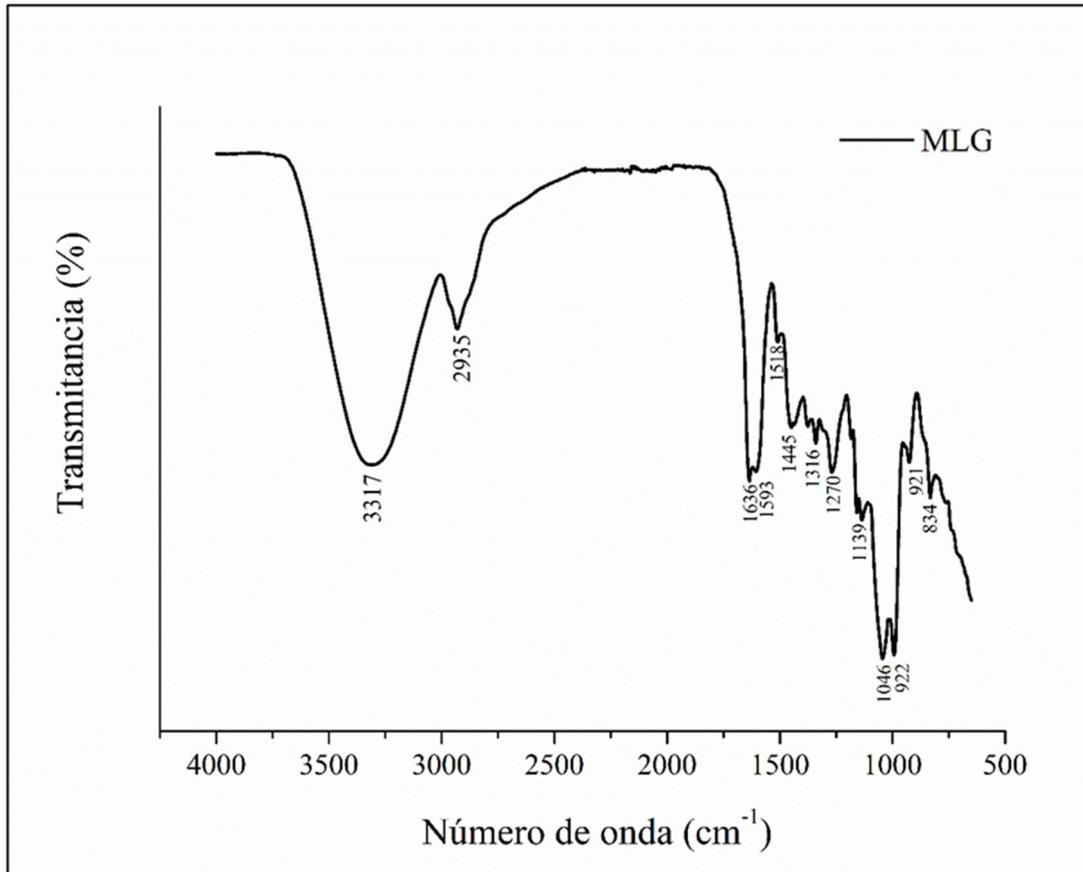
A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier foi empregada como método complementar para contribuir na identificação de prováveis interações químicas entre as amostras estudadas. Os espectros de FTIR demonstraram todas as atribuições possíveis referente aos grupos funcionais presentes no insumo farmacêutico ativo vegetal, nos excipientes e em suas misturas binárias, e estão dispostos nas figuras 28, 29 e 30.

O espectro de FTIR do extrato de MLG (Figura 28) evidenciou uma banda larga de absorção no intervalo de frequência de 3800 a 3000 cm^{-1} , sugestivo de grupos hidroxila, com absorção máxima em 3317 cm^{-1} . Esses grupos funcionais são atribuídos tanto a presença de compostos fenólicos presentes no extrato como também a presença de umidade e pelo fato de se tratar de uma substância com natureza amorfa e higroscópica. Na região 3000 a 2850 cm^{-1} , observou-se a presença de uma banda de baixa intensidade com absorção máxima em 2935 cm^{-1} característica de estiramento de ligações carbono-hidrogênio estando relacionada com compostos orgânicos presentes no extrato. Na região entre 1677 e 1531 cm^{-1} , observou-se a presença de um pico em 1636 cm^{-1} sugestivo de estiramento de ligações C=O das carbonilas. Próximo a essa região verificou-se também a presença de outras bandas observadas entre 1600 e 1475 cm^{-1} estando possivelmente relacionada ao estiramento das ligações C=C de aromáticos. Os picos na região entre 1450 e 1375 cm^{-1} são atribuídos a dobramentos de ligações C-H, nesta mesma região entre 1300 e 1000 cm^{-1} observou-se picos de estiramento de ligação C-O. As bandas observadas entre 938 e 802 cm^{-1} condiz com ligações C=C (PAVIA et al, 2010).

A presença dessas ligações químicas advém de uma diversidade de grupos funcionais como, éter, ésteres, ácidos carboxílicos presentes na estrutura química de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, antraquinonas entre outros fitocompostos existentes em *E. velutina* (CARVALHO et al., 2009; TODOROKI et al., 2021).

A técnica de FTIR é considerada como um método simples na identificação de interações em combinação de IFA com excipiente farmacêutico. As prováveis interações químicas das amostras foram avaliadas considerando o aparecimento de novos picos além de modificações nos intervalos de absorção e intensidade das bandas características no extrato (ALMEIDA et al., 2019; LILTORP et al., 2011).

Figura 28 – Espectro FTIR do extrato rotoevaporado de *E. velutina* (MLG)



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

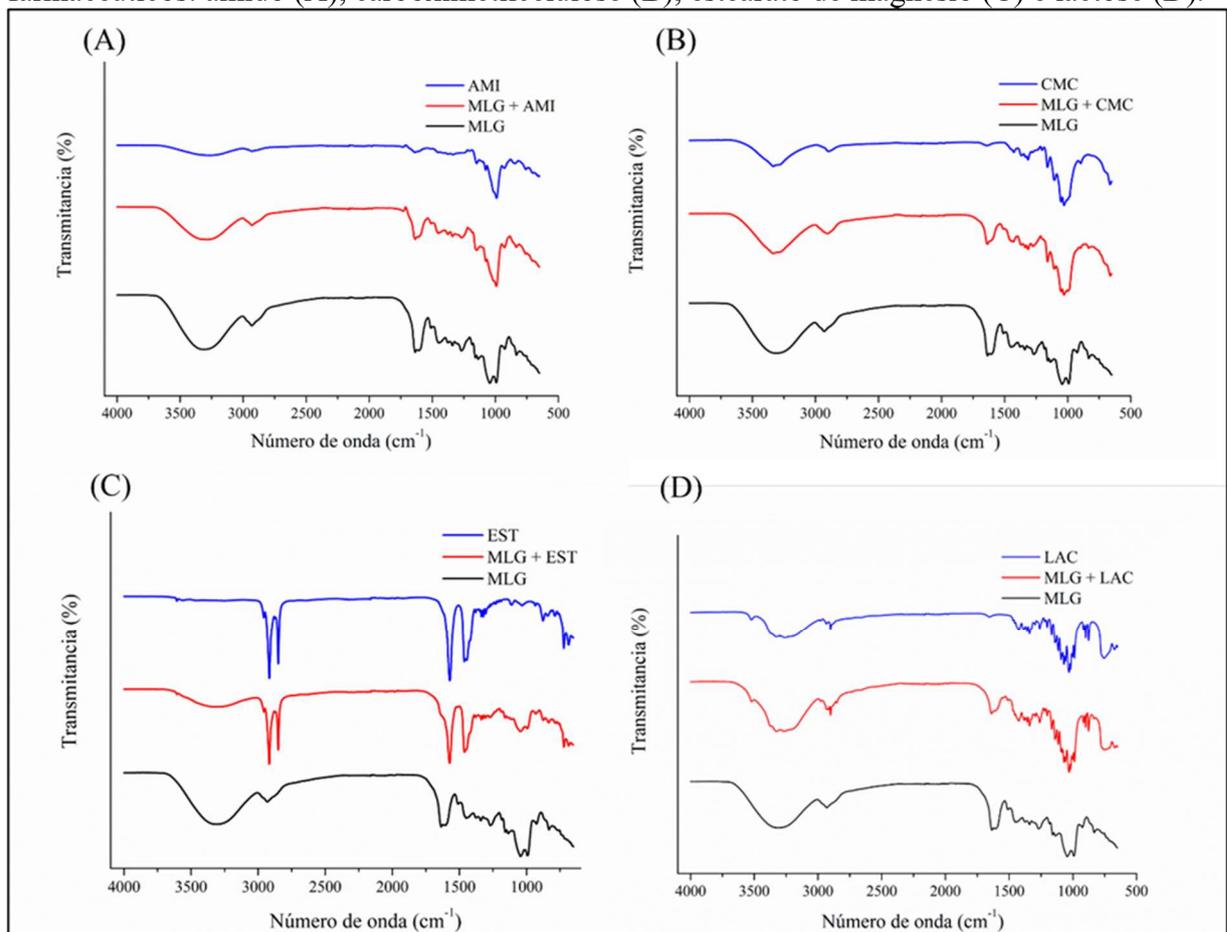
O espectro da mistura binária com amido de milho (Figura 29A) não evidenciou variações visíveis no perfil referente ao extrato analisado. É possível observar que as bandas características do IFAV as quais foram expressas no espectro, não sofreram modificações do tipo sobreposição ou surgimento de novas bandas, demonstrando que não há evidências de interações químicas entre os componentes da mistura.

No tocante à mistura MLG-CMC (Figura 29B) o espectro mostrou preservação das bandas de absorção características principais tanto do IFAV quanto do CMC, com sobreposição de raros picos. Dessa forma, sugere-se que o extrato não interagiu quimicamente com esse adjuvante farmacotécnico.

Em relação ao espectro referente a mistura com estearato de magnésio (Figura 29C) pode-se observar que os picos características do IFAV que constitui a mistura não sofreram alterações aparentes. Perfil semelhante se repetiu para a mistura MLG-LAC (Figura 29D), algumas bandas de baixa intensidade relacionadas ao extrato foram sobrepostas em consequência de a faixa de absorção espectral ser semelhante à do excipiente. Desta forma,

mediante os espectros de FTIR da mistura não foi evidenciado como uma interação química entre os componentes. Somente a presença de sobreposição de bandas não são indicativos de interação química (CHAVES et al., 2013).

Figura 29 – Espectros FTIR referentes às misturas binárias do extrato MLG com excipientes farmacêuticos: amido (A), carboximetilcelulose (B), estearato de magnésio (C) e lactose (D).



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

O espectro referente a mistura MLG-DIOX (Figura 30A) demonstrou características condizentes de ambos os componentes. Entretanto, ocorreu diminuição de bandas de absorção relacionadas ao extrato, isso pode ser explicado pela presença de uma banda larga e de grande intensidade em 1053 cm^{-1} que diz respeito a deformação axial de ligação do tipo Si – O – Si dos grupos siloxanos referente ao insumo farmacêutico, possibilitando a sobreposição das outras bandas espectrais presentes na mistura (ALMEIDA, et al., 2019; LEDETI et al., 2017; PINTO et al., 2010).

A mistura com manitol mostrou, no seu respectivo espectro (Figura 30B), preservação de bandas de absorção características do IFAV bem como do excipiente farmacêutico. Observa-

se que algumas bandas do extrato estão sobrepostas pelas bandas do excipiente, tendo em vista, que as do manitol se mostram com maior intensidade em relação as do IFAV. Deste modo, sugere-se que não houve incompatibilidade entre o IFAV e o MAN.

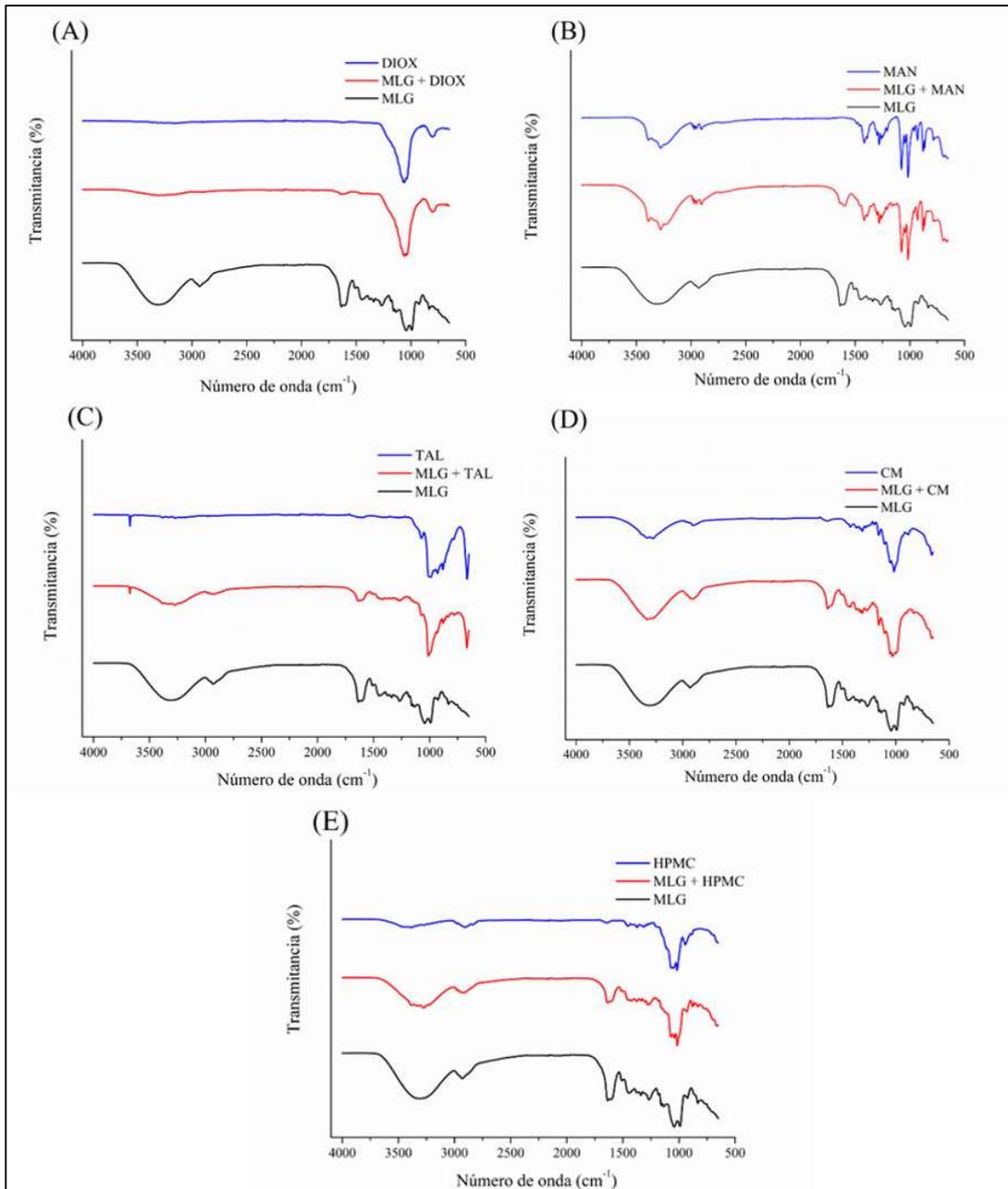
Com relação a mistura MLG-TAL (Figura 30C) observou-se indícios de compatibilidade química, o espectro obtido resultou em uma soma de bandas características do extrato e do insumo farmacêutico analisados isoladamente. Destarte, não ocorreu nenhum evento de incompatibilidade química entre os constituintes candidatos a formulação.

O espectro de FTIR do extrato com a celulose microcristalina (Figura 30 D) apresentou perfil semelhante aos descritos anteriormente, tendo em vista que foi possível observar a presença de picos característicos do IFAV, sem grandes deslocamentos ou ausência de bandas. Verifica-se algumas sobreposições de bandas, no entanto o emprego desse excipiente na formulação não promoverá prejuízos, indicando uma compatibilidade química entre ambos.

Perfil semelhante é demonstrado pelo espectro referente a mistura de MLG-HPMC (Figura 30E), no qual expressou a preservação das bandas do extrato bem como as do excipiente, sem ocasionar grandes deslocamentos de cada evento. Tais características apontam para uma compatibilidade química entre o IFAV e o HPMC.

Dessa forma, através dos espectros de FTIR referentes as misturas binárias IFAV-excipiente, não foi identificado nenhuma interação química sugerindo uma compatibilidade entre os componentes analisados.

Figura 30 – Espectros FTIR referentes às misturas binárias do extrato MLG com excipientes farmacêuticos.



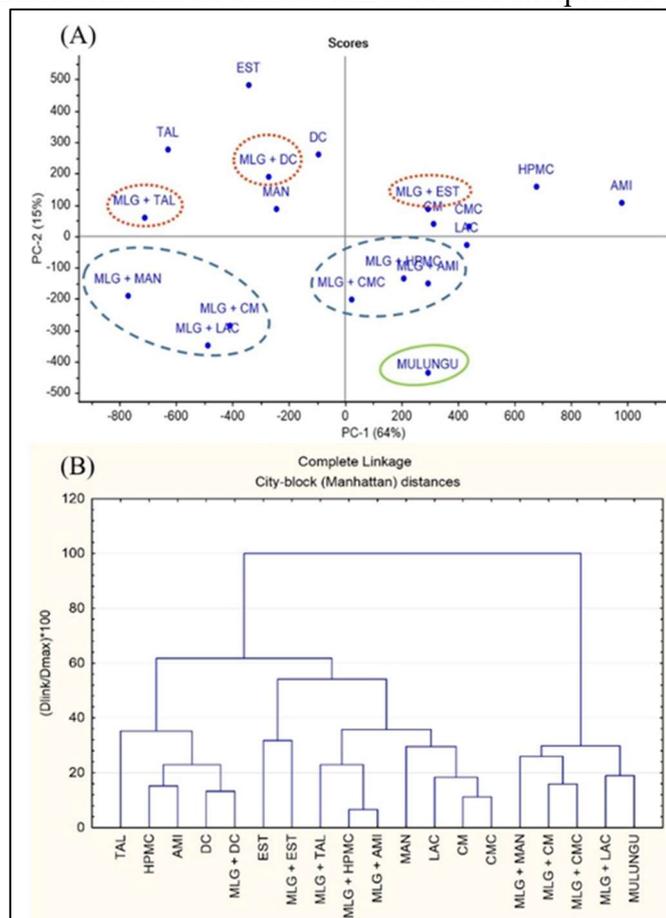
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

No gráfico de scores das misturas binárias e dos componentes isolados gerados pela técnica de PCA através dos dados de FTIR (Figura 31A), a variância explicada PC1×PC2 foi de 64% e 15%, respectivamente. Além disso, analisando as distancias entre os grupos formados, observou-se que a maioria das misturas binárias se localizaram próximo ao extrato e as substancias puras. Tais resultados corroboram com os obtidos do FTIR, uma vez que através dos espectros de absorção das misturas não foi visualizado nenhuma interação química entre os componentes candidatos a formulação. Também foi possível inferir que, os espectros resultaram

numa soma dos perfis espectroscópicos do extrato e do excipiente, confirmado pela técnica de PCA. Desse modo, sugere-se que houve indícios de compatibilidade entre o extrato e os excipientes farmacêuticos.

Neste mesmo gráfico além das amostras localizadas ao longo do eixo PC1 as quais obtiveram similaridade com o extrato, percebeu-se também a presença de grupos ao longo do eixo PC2, demonstrando maior distância do extrato em relação as misturas e proximidade com os excipientes o que parece influência da interação extrato-excipiente. Isso corrobora com a informação apresentada no dendrograma de HCA correspondentes as mesmas misturas analisadas, ilustrada na figura 31B.

Figura 31 – Análise de componentes principais (A) e análise hierárquica (B) dos dados de FTIR das misturas binárias do extrato MLG com os excipientes farmacêuticos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Em resumo, a partir dos resultados obtidos nos estudos de compatibilidade com DTA, TG e FTIR, os excipientes escolhidos para compor a formulação foram: hidroxipropilmetilcelulose, lactose e estearato de magnésio.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados possibilitaram alcançar uma matéria prima vegetal que respondeu aos parâmetros de identificação da planta analisada (*E. velutina*) e aos critérios de qualidade especificado para esse tipo de amostra (matriz complexa).

A triagem fitoquímica possibilitou a quantificação de vários compostos fenólicos: polifenóis totais, flavonoides e taninos presentes no extrato de *E. velutina*, sendo mais pronunciado a presença de polifenóis totais, dos quais a quercetina foi quantificada e determinada como marcador químico da espécie em questão.

Os estudos de toxicidade demonstraram que o extrato apresenta baixo perfil de toxicidade e que não causou nenhum óbito dos animais, enquadrando a substancia na classe 5, de acordo com a GSH, estimando-se que a DL_{50} se encontra acima de 2000 mg Kg^{-1} .

Nos ensaios de ansiedade, o extrato de *E. velutina* mostrou potencial ação ansiolítica, principalmente quando administrado na dose de 250 mg Kg^{-1} , justificando seu uso pela medicina popular.

Nos estudos de compatibilidade realizados através das técnicas de DTA, TG e FTIR em combinação com as técnicas quimiométricas de análise de dados (HCA e PCA) demonstraram-se complementar e apontam não haver nenhuma incompatibilidade química entre a associação IFAV-excipientes permitindo, dessa forma, a escolha de maneira consciente dos excipientes farmacêuticos para integrar a formulação final.

Através desses achados em nosso estudo, é possível concluir que o extrato de *E. velutina* agrega condições de continuidade das pesquisas direcionadas para a descoberta de um possível medicamento ansiolítico.

REFERÊNCIAS

- ABI-ACKEL, M. M.; LIMA-COSTA, M. F.; CASTRO-COSTA, E.; LOYOLA-FILHO, A. I. Uso de psicofármacos entre idosos residentes em comunidade: prevalência e fatores associados. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 20, p. 57-69, 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Diretoria colegiada: Resolução – nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, ano 140, n. 104, p. 56-59, 2 jun. 2003.
- ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 384 p. 2006.
- ALMEIDA, L. et al. Tablet of *Ximenia Americana* L. Developed from Mucoadhesive Polymers for Future Use in Oral Treatment of Fungal Infections. **Polymers**, v. 11, n. 2, p. 379, 2019.
- ANDRADE, M. F.; ANDRADE, R. C. G.; SANTO, V. Prescrição de psicotrópicos: avaliação das informações contidas em receitas e notificações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 471-479, 2004.
- ANDRADE, J. C.; SANTOS, W. M.; NÓBREGA, F. P.; ALMEIDA, L. F.; FERNANDES, F. H. A.; SANTANA, C. P.; VERAS, G.; MEDEIROS, A. C. D. Thermal characterization of *Angiosperma pyrifolium* Mart. Plant drugs. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 138, n. 5, p. 3747-3756, jan. 2019.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, London, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- AWAD R, LEVAC D, CYBULSKA P, et al. Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 85, p. 933–42, 2007.
- BALEOTTI, M. E. **Efeito sistêmico da buprenorfina na modulação de comportamentos defensivos relacionados com o transtorno da ansiedade generalizada e com o pânico**. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.
- BANNACH, G.; ARCARO, R.; FERRONI, D.; SIQUEIRA, A.; TREU-FILHO, O.; IONASHIRO, M. and SCHNITZLER, E. Thermo analytical study of some anti inflammatory analgesic agentes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, p. 163 - 170, 2010.
- BERTOL. C. D.; PEREIRA, R, N.; MENDES, C.; PAULINO, A. S.; SILVA, M. A. S.; FROEHLICH, P. E. Physicochemical characterization of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin in physical mixtures with excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, p. 1575-1584, 2017.
- BOLIGON. A. A.; BARBOSA, R.; DA COSTA, J. G. M.; DE MENEZES, I. R. A.; FELIPE, C. F. B.; KERNTOPF, M. R. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Annona coriacea* (Mart.) and caffeic acid in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 136, p. 111049, 2020.
- BOTTI, L. C. N.; LIMA, A. F. D.; SIMÕES, W. M. B. Uso de substâncias psicoativas entre acadêmicos de enfermagem da Universidade Católica de Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Saúde Mental, Álcool e Drogas**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 1, p1-12, 2010.

BUNACIU, A. A., & ABOUL-ENEIN, H. Y. Adulterated drug analysis using FTIR spectroscopy. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. p. 1–15, 2020.

BRAGA, J. E. F.; et al. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 93-100, 2011.

BRANDÃO, L. E. M. **Avaliação dos efeitos do extrato de Passiflora cincinnata Masters em camundongos: efeitos na ansiedade e potencial neuroprodutor**. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 13 ed. Artmed Editora, 1760 p. 2018.

CAMPOS, N. P.; ROSA, C. A.; GONZAGA, M. F. Uso indiscriminado de benzodiazepínicos. **Revista Saúde em Foco**. Amparo, v. 9, p.485-491, 2017.

CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, p. 101–111, 2013.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.

CARVALHO, A. C. C. S.; ALMEIDA, D. S.; MELO, M. G. D., CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M. Evidence of the mechanism of action of Erythrina velutina Willd (Fabaceae) leavesaqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 374-378, 2009.

CONCEIÇÃO, C.V.; MORAES, M. A. A. Aprendizagem cooperativa e a formação do médico inserido em metodologias ativas: um olhar de estudantes e docentes. **Revista brasileira de educação médica**, v. 42, n. 4, p. 115-122, 2018.

COMBS, H.; MARKMAN, J. **Anxiety disorders in primary care.**, v. 98, n. 5, p. 1007-1023, 2014.

CRAG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): General Subjects**, Amsterdam, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DAVE, V. S. et al. Excipient Variability and Its Impact on Dosage Form Functionality. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 3, p. 906–915, 2015.

DINIZ, T. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. G.; MEDEIROS, M. A. M. B.; SILVA, M. G.; TELES, R. B. A.; MENEZES, P. P.; SOUZA, B. M. H.; FRANK, L. A.; ARAÚJO, A. A. S.; SERAFINI, M. R.; GUTERRES, S. S.; NUNES, C. E. P.; SALVADOR, M. J.; ALMEIDA, J. R. G. S. Anticonvulsant, sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil of *Annona vepretorum* in mice: Involvement of GABAergic and serotonergic systems. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1074–1087, 2019.

DJIOGUE, S.; HALABALAKI, M.; NJAMEN, D.; KRETZSCHMAR, G.; LAMBRINIDIS, G.; HOEPPING, J.; RAFFAELLI, F. M.; MIKROS, E.; SKALTSOUNIS, A.L.; VOLLMER, G. Erythroidine alkaloids: a novel class of phytoestrogens. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 80, n. 11, p. 861–869, 2014.

ERNST, E. Herbal remedies for anxiety—a systematic review of controlled clinical trials. **Phytomedicine**, v. 13, n. 3, p. 205-208, 2006.

FAHNING, B. M.; LOBÃO, E. B. **Nanotecnologia aplicada à Fármacos**, Faculdade Católica Salesiana do ES, Vitória, 2011.

FAHMY, N.M.; AL-SAYED, E.; EL-SHAZLY, M.; SINGAB, A. N. Comprehensive review on flavonoids biological activities of Erythrina plant species. **Elsevier**, p. 500-538, v. 123, 2018.

FARMACOPEIA brasileira: insumos farmacêuticos e especialidades. 6. ed. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2019. 1504 p. (v. 2, Monografias).

FÁVERO, V. R.; SATO, M. O. S.; SANTIAGO, R. M. Uso de ansiolíticos: abuso ou necessidade. **Visão Acadêmica**, v. 18, n. 4, 2018.

FINN, D. A.; RUTLEDGE-GORMAN, M. T.; CRABBE, J. C. Genetic animal models of anxiety. **Neurogenetics**, Berlim, v. 4, n. 3, p. 109-135, 2003.

Gabbott P. **Principles and Applications of Thermal Analysis**. Oxford: Blackwell Publishig; 2008.

GARÍN-AGUILAR, M. E.; LUNA, J. E. R.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; DEL-TORO, G. V.; VÁZQUEZ, M. M.; J. Effect of crude extracts of Erythrina americana Mill. On aggressive behavior in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 69, n. 2, p. 189-196, 2000.

GENNARO, A. R. **A ciência e a prática da farmácia**, Guanabara Koogan, Ed 20, Rio de Janeiro, 2004.

GOYATÁ slt, AVELINO ccv, SANTOS svm, SOUZA jr di, GURGEL mdsl, Terra FS. Effects from acupuncture in treating anxiety: integrative review. **RevBrasEnferm**. 2016, v 69 n. 3, p.564-71.

GULLICH, G.; RAMOS, B. A.; ZAN, T. R. A.; SCHERER, C.; MENDOZA-SASSI, R. A. Prevalência de ansiedade em pacientes internados num hospital universitário do sul do Brasil e fatores associados. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 16, p. 644-657, 2013

HALLGREN, Mats; KANDOLA, Aaron; STUBBS, Brendon; NGUYEN, Thi-Thuy-Dung; WALLIN, Peter; ANDERSSON, Gunnar; EKBLOM-BAK, Elin. Associations of exercise frequency and cardiorespiratory fitness with symptoms of depression and anxiety - a cross-sectional study of 36,595 adults. **Mental health and physical activity**, [S.L.], v. 19, p. 100351, out. 2020. Elsevier BV.

HAN, H.; MA, Y.; EUN, J. S.; LI, R.; HONG, J. T.; LEE, M. K.; OH, K. W. Anxiolytic-like effects of anjoinine A isolated from Zizyphi spinosi Semen: Possible involvement of GABAergic transmission. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 92:206-213, 2009.

HUSSAIN, M. M.; TUHIN, T. H.; AKTER, F.; RASHID, M. A. MM. Constituents of Erythrina- a Potential Source of Secondary Metabolites: A Review. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, p.237-253, v. 19, 2016.

JIRI, P.; SZIRMAI, A. Anxiety and Related Disorders; Mulungu and Rain Forest Anxiolytic, **IntechOpen**, 2011.

KAUR, G.; GREWAL, K.; JYOTI, U. K.; JAIN, R.; CHANDRA, J. MADAN. Oral controlled and sustained drug delivery systems. Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems, **Elsevier**, Netherlands, p. 567-626, 2018.

KOHR, N.; LIYANAGE, T.; NAJARZADEH, A.; PULEO, D. A. **Encyclopedia of Biomedical Engineering**. 1a ed. Lexington, Elsevier, 2018.

KOEN N., STEIN D.J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. **Dialogues Clin Neurosc** [Internet]. ;13(4):423-37, 2011.

- KUMAR, A.; LINGADURAL, S.; JAIN, A.; BARMAN, N. R. *Erythrina variegata* Linn: *Erythrina variegata* Linn: A review on morphology, phytochemistry, and pharmacological aspects. **Pharmacogn** v. 4, p. 147-152, 2010.
- LEDETI, I.; BOLINTINEANU, S.; VLASE, G.; CIRCIOBAN, D.; LEDETI, A.; VLASE, T.; SUTA, L.; CAUNII, A.; MURARIU, M. Compatibility study between antiparkinsonian drug levodopa and excipients by FTIR spectroscopy, X-ray diffraction and thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, n. 1, p. 433-441, 2017.
- LOLLATO, G.; SCARMINIO, I. S.; MOREIRA, E. G. Behavioral effects of aqueous and dichloromethane extracts of *Erythrina speciosa* Andrews, Fabaceae, leaves in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 939-944, 2010.
- MACHADO, R. J. A.; MONTEIRO, N. K. V.; MIGLIOLO, L.; SILVA, O. N.; PINTO, M. F. S.; OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, E. A. Characterization and Pharmacological Properties of a Novel Multifunctional Kunitz Inhibitor from *Erythrina velutina* Seeds. **PLoS One**, v. 8, 2013.
- MANGOLINI, V. I.; ANDRADE, L. H.; WANG, Y. Epidemiologia dos transtornos de ansiedade em regiões do Brasil. **Revista de medicina**, v. 98, n. 6, p. 415-422, 2019.
- MARINESCU, D. C.; PINCU, E.; MELTZER, V. Thermodynamic study of binary system Propafenone Hydrochloride with Metoprolol Tartrate: Solid-liquid equilibrium and compatibility with α -lactose monohydrate and corn starch. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, n. 2, p. 366–372, 2013.
- MARTINS, M.V. *Erythrina*. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2015.
- MARTINEZ, R.; GARCIA, A. M. B.; MORATO, S. Papel da luminosidade do biotério no comportamento do rato no labirinto em cruz elevado. **Estudos de Psicologia**, v. 10, n 2, 2005.
- MATOS, A. P S. et al. Compatibility study between diazepam and tablet excipients. **Journal of thermal analysis calorimetry**, v. 127, p. 1675-1682, 2016.
- MAURI, E.; CHINCARINI, G. M.; RINGAMONTI, R.; MAGAGNIN, L.; SACCHETTI, ROSSI, F. Modulation of electrostatic interactions to improve controlled drug delivery from nanogels. **Materials Science and Engineering C**, 72, p. 3038 – 315, 2017.
- MELO, I. C. A. R. Contribuição ao Conhecimento de *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae-Faboideae): Uma abordagem Farmacobotânica, **Química e Farmacológica**, 2011.
- MESQUITA, T. O.; FURTADO, T. Tratamento da ansiedade através da aplicação de técnicas mindfulness: uma revisão de literatura. **Revista Gestão & Saúde**, Rio Grande do Sul, v. 20, n. 1, p. 65-78, jun. 2019.
- MOTALEB, M. A.; HOSSAIN, M. K.; SOBHAM, I.; ALAM, M. K.; KHAN, N. A.; FERROZ, R. (2011). **Selected medicinal plants of Chittagong hill tracts** IUCN (International Union for Conservation of Nature). Dhak, Bangladesh: Progressive printers, Pvt, Ltd.
- NARDI, A. E.; FONTENELLE, L. F.; CRIPPA, J. A. S. 2012. Novas tendências em transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 34, p. 5-6, jun. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbp/v34s1/v34s1a02.pdf>.

NEP, E. I.; CONWAY, B. R. Preformulation studies on grewia gum as a formulation excipient. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 197–205, 2012.

NÓBREGA, J. S.; DA SILVA, F. D. A.; BARROSO, R. F.; CRISPIM, D. L.; OLIVEIRA, C. J. A. Avaliação do conhecimento etnobotânico e popular sobre o uso de plantas medicinais junto a alunos de graduação. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, Pombal, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2017.

NIELSEN M.; HANSEN E. H.; GØTZSCHE P. C. What is the difference between dependence and withdrawal reactions? A comparison of benzodiazepines and selective serotonin re-uptake 37 inhibitors. **Addiction**, v. 107, P. 900-908, 2012.

OLIVEIRA, A. M. et al. Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 289–297, 2018.

OLIVEIRA, R. M.; LIMA, R. A. Prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *Bauhinia forficata* L. e seu potencial candidicida. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological** v.4, n.1, p. 54-65, 2017.

OLIVEIRA, V. C. L.; MACHADO, R. J. A.; MONTEIRO, N. K. V.; LYRA, I. L.; CAMILO, C. S.; SERQUIZ, A. C.; OLIVEIRA, A. S.; RUFINO, F. P. S.; MACIEL, B. L. L.; UCHÔA, A. F.; SANTOS, E. A.; MORAIS, A. H. A. Gastroprotective and antielastase effects of protein inhibitors from *Erythrina velutina* seeds in an experimental ulcer model. **Biochem. Cell Biol.** v. 95, p. 243-250, 2017.

OZAWA, M.; HONDA, K.; NAKAI, A.; OHSAKI, A. Hypaphorine, an indole alkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 19: 234-236, 2009

PALUMBO, C. F. G.; GARDIN, N. E.; NAKAMURA, M. U. *Erythrina mulungu* Mart. Ex Benth and *Erythrina velutina* Willd.: pharmacological aspects and anthroposophic view of these Brazilian plants. **Arte Médica Ampliada**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 152-161, 2016.

PAULESU, E., SAMBUGARO, E., TORTI, T., DANELLI, L., FERRI, F., SCIALFA, G., SASSAROLI, S. Neural Correlates Of Worry In Generalized Anxiety Disorder And In Normal Controls: **A Functional Mri Study. Psychological Medicine**. Cambridge, 2009.

PIMENTA, Amine Becheleni. **Atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato bruto das partes aéreas da *Kielmeyera rubriflora* em camundongos**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

PINHEIRO, E. A.; SOUSA, L. S.; SILVA, A. A.; FARIAS, C. P.; VASCONCELOS, S. M. M.; HONÓRIO-JUNIOR, J. E. R. Effect of rutin on a model of chronic corticosterone-induced depression in mice. **Journal of Health & Biological Sciences**, Fortaleza, v. 6, n. 2, p. 145-151, 2018.

PINTO, M. F.; MOURA, E. A.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R.O. Thermal compatibility studies of nitroimidazoles and excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, n. 1, p. 323-329, 2010.

PIRES, S. A.; MUSSEL, W. N.; YOSHIDA, M. I. Solid-state characterization and pharmaceutical compatibility between citalopram and excipients using thermal and non-thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 1, p. 535–542, 2017.

PROCÓPIO, J. V. V.; SOUZA, V. G.; COSTA, R. A.; CORREIA, L. P.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R. O. Application of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS in the qualification of simvastatin

pharmaceutical raw material. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.106, p.665-670, 2011.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigma to measure the effects of drugson anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

RABBANI, M.; SAJJADI, S. E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 5, p. e417350, 2008.

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

RAMBO, F. D.; VIGNOLI-SILVA, M.; DRESCH, R. R.; BIELGEMEYER, R.; PASSOS, C. S.; MORENO, P. R. H.; NUNES, E.; MENTZ, L. A., HENRIQUES, A. T. Morphoanatomical identification and physicochemical parameters of the drug *Erythrina verna* Vell. Trunk bark. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 243-256, 2013.

RAMOS, R. M.; FEITOSA, M. J.; LIMA, V. S.; SANTOS, R. C. OLIVEIRA, A. M; SOARES, L. A. L.; SILVA, G. C. Comparative study of phytochemical composition, cytotoxicity and potentials antioxidante and photoprotector of the bark and leaf of *Erythrina velutina*. **Brazilian Journal of Desenvolpente**, Curitiba, v. 6, n. 6, p.33140-33158, jun. 2020.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ª Ed.. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2003. 920 p

RAZA, M. M.; AL-SHABANAH, O. A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment of hematological and biochemical parameters in plasm, liver and kidney of Swis albino mice. **Journal of Scientia Pharmaceutica**, v. 70, p. 135–145, 2002.

REYES, A. N.; FERMANN, I. L. Eficácia da terapia cognitivo comportamental no transtorno de ansiedade generalizada. **Revista Brasileira De Terapias Cognitivas**, v. 13, n. 1, p. 49-54, 2017.

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

RIOS, M. Y.; ORTEGA, A.; DOMÍNGUEZ, B.; DÉCIGA, M.; LA ROSA, V. G. Glauacetalin E and galphimidin B from *Galphimia glauca* and their anxiolytic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 259, p. 112939, 2020.

RODRIGUES, F. T. S. et al. Effects of standard ethanolic extract from *Erythrina velutina* in acute cerebral ischemia in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, n. September, p. 1230–1239, 2017.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; ALLENDORF, M.E. Use of FTIR for rapid authentication and detection of adulteration of food. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.2, p. 467-483, 2011.

ROSA, D. S.; FAGGION, S. A.; GAVIN, A. S.; SOUZA, M. A.; FACHIM, H. A.; SANTOS, W.F.; PEREIRA, A. M. S.; CUNHA, A. O. S.; BELEBONI R.O. Erysothrine, an alkaloid extract ed from flowers of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth: evaluating its anticonvulsant and anxiolytic potential. **Epilepsy & Behavior**, v. 23, p. 205–212, 2012.

ROMANELLI, C., COOPER, D., CAMPBELL-LENDRUM, D., MAIERO, M.; KARESH, W. B.; HUNTER, D.; GOLDEN, D. **Conectando prioridades globais: biodiversidade e saúde humana**. OMS/CBD 344p, 2015.

ROHMAN, A.; GHAZALI, M. A. B.; WINDARSIH, A.; IRNAWATI, I.; RIYANTO, S.; YUSOF, F. M.; MUSTAFA, S. Comprehensive Review on Application of FTIR Spectroscopy Coupled with Chemometrics for Authentication Analysis of Fats and Oils in the Food Products. **Molecules**, v.25, 2020.

SANTANA, C. P.; FERNANDES, F. H. A.; BRANDÃO, D. O.; SILVA, P. C. D.; CORREIA, L. P.; NÓBREGA, F. P.; MEDEIROS, F. D.; DINIZ, P. H. G. D.; VÉRAS, G.; MEDEIROS, A. C. D. Compatibility study of dry extract of *Ximenia americana* L. and pharmaceutical excipients used in solid state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 133, n. 1, p. 603-617, 2017.

SANTOS, L. S. S.; BARROS, S. B. A.; RAHIM, A. and GUSHIKEM, Y. In situ synthesis of gold nanoparticle son mesoporous sílica surface-functionalized withpyridiumligands. **Journal of Nanoparticle research**, Dordrecht, v. 22, p. 49, 2020.

SANTOS ROSA, D. et al. Erysothrine, an alkaloid extractd from flowers of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth: Evaluating its anticonvulsant and anxiolytic potential. **Epilepsy & Behavior**. v. 23, n. 3, p. 205–212, 2012.

SANTOS, L. W.; COELHO, M. F. B.; AZEVEDO, R. L. B.; LIMA, A. K. B.; SOUZA, J. W. N. *Erythrina velutina* Willd. - Fabaceae: Árvore de múltiplos usos no nordeste brasileiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 08, n. 05, p. 72-80, 2013.

SCHLEIER, R.; QUIRINO, C. S.; RAHMEL, S. *Erythrina mulungu* – descrição botânica e indicações clínicas a partir da antroposofia. **Revista Arte Médica Ampliada**, v. 36, n. 4, p. 162-167, 2016.

SARRIS, J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: a systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 703-716, 2007.

SARRIS J.; Kavanagh D. J. Kava and St John's wort: current evidence for use in mood and anxiety disorders. **Journal of Alternative Complementary Medicine**, v.15, p.827-836, 2009.

SARRIS, J.; MCINTYRE, E.; CAMFIELD, D. A. Plant-Based Medicines for Anxiety Disorders, Part 1. **CNS Drugs**, p.207-219, v. 27, 2013.

SARRIS, J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: 10-year updated review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 7, p. 1147-1162, 2018.

SAVAGE, K.; FIRTH, J.; STOUGH, C.; SARRIS, J. GABA-modulating phytomedicines for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. **Phytotherapy Research, Wiley**, v.32, 2018.

SILVA, K. B. **Tecnologia de sementes de *Erythrina velutina* Willd.** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2008.

SILVA, A. H. **Desenvolvimento e caracterização do extrato de *Erythrina velutina* para o tratamento de doença neurodegenerativa.** Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Faculdade de Odontologia, Farmácia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SILVA, M. M. B.; SANTANA, A. S. C. O.; PIMENTEL, R. M. M.; SILVA, F. C. L.; RANDAU, K. P.; SOARES, L. A. L. Anatomy of leaf and stem of *Erythrina velutina*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 200-206, 2013.

SILVA, M. G. P.; SILVA, M. M. P. Avaliação do uso de fitoterápicos em distúrbios psiquiátricos. **Revista de Atenção à saúde**, v. 16, n. 56, p. 77-82, 2018.

SILVA, I. A.; LIMA, A. L.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; SA-BARRETO, L. L.; CUNHA-FILHO, M. Compatibility and stability studies involving polymers used in fused deposition modeling 3D printing of medicines. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 12, p. 424-435, 2021

SODERPHALAM, R.; HJORTH, S.; ENGEL, J.A. Effect of 5HT1A receptor agonists and L-5 HTP in Montgomery's conflict test. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 32, p. 259-265, 1989.

SOTO-HEM'ANDEZ, R. M.; GARCIA-MATEOS, R.; MIGUEL-CH'AVEZ, R. S. Erythrina, a potential source of chemicals from the Neotropics. **Bioact Compd Phytomedicine**, p. 163-184, 1996.

SOUZA, J. L.; NUNES, V. V.; CALAZANS, C. C.; SILVA-MANN, R. Biotechnological potential of the medicinal plant *Erythrina velutina* Willd: A systematic review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 45, 2022.

SOUSA, F. C.F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SIEPANN, J.; FAHAM, A.; CLAS, S. -D.; BOYD, B. J.; JANNIN, V.; BERNKOP-SCHNURD, A.; LEROUX, J. -C. Lipids and polymers in pharmaceutical technology: Lifelong companions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 558, p. 128-142, 2019.

SPINELLA, M. **The psychopharmacology of herbal medicine: Plant Drugs That Alter Mind**. In: Brain and behavior. Cambridge: MIT Press; 2001.

TAMBE, S. et al. Recent Advances in Amorphous Solid Dispersions: Preformulation, Formulation Strategies, Technological Advancements and Characterization. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 2203-2022, 2022.

THABET, Y.; KLINGMANN, V.; BREITKREUTZ, J. Drug Formulations: Standards and Novel Strategies for Drug Administration in Pediatrics. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, p. S26-S35, 2018.

TODOROKI, k.; FUNASAKI, M.; ETOH, T.; MATSUZAKI, K. Two Erythrina alkaloids and three diarylpropanoids from *Erythrina velutina*. **Tetrahedron**, v.96, 2021.

VASCONCELOS, S. M. M.; MACEDO, D. S.; MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; CUNHA, G. M. A.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.; RODRIGUES, A. C. P.; SILVEIRA, E. R. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 389-393, 2004.

VEIGA JUNIOR. V. F; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA, S. et al. Solid-state compatibility studies of a drug without melting point. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131(3), p. 3201-3209, 2017.

VERAS NETO, J. G.; BRITO, A. L. B.; SILVA, A. C.; SILVA, P.; COSTA, G. B.; FELIX, L. C. N.; FERNANDES, D. D. S.; FONTES, M. M.; Classificação do biodiesel na região do visível. **Química Nova**, v. 3, n. 2, p. 315-318, 2012.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B. Preliminary study of the antibacterial activity of *Erythrina velutina* Willd. Fabaceae (Leguminosae) bark. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15 n. 2, p. 137-143, 2005.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316), p. 16, 2010.

VINKERS, C.H.; OLIVIER, B.; Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABAA Receptor Modulators? **Advances in Pharmacological Sciences**, p. 1-19, 2012.

WANGCHUK, P. Aplicações terapêuticas de produtos naturais em fitoterápicos. **Programas de Biotecnologia e Biomedicina**, v. 8, p. 1-20, 2018.

WILLIS, K.J. Estado das plantas do mundo, 2017.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

ANEXO A – CERTIFICADO



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “DESENVOLVIMENTO DE UM MEDICAMENTO FITOTERÁPICO DE LIBERAÇÃO PROLONGADA UTILIZANDO EXTRATO DE *Erythrina velutina* Willd. PARA O TRATAMENTO DE ANSIEDADE” registrada com o nº 024/2021, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, que envolve o uso de camundongos *Mus musculus swiss*, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto 6.899 de 05 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual da Paraíba.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/2022 a 09/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongos <i>Mus musculus/ swiss</i>
Nº de animais	68 (sessenta e oito)
Idade/peso	06 a 08 semanas/ 25 a 35g
Sexo	fêmeas (10) e machos (58)
Origem	Centro de Bioterismo da UEPB

Informação ao pesquisador:

Lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-UEPB o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, previsto para conclusão em 09/2022.

Campina Grande, 16 de março de 2022.

Ana Cláudia Dantas de Medeiros
Coordenadora da CEUA/UEPB