

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Psychotria myriantha Müll Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiqumiotáxica e sobre o sistema nervoso central

FABIANE MOREIRA FARIAS

PORTO ALEGRE, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***Psychotria myriantha* Müll Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiquimiotáxica e sobre o sistema nervoso central**

Tese apresentada por **Fabiane Moreira Farias** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Amélia T. Henriques
Co-orientadora: Profa. Dr. Vera Maria Steffen

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 11.9.06 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Carla Dalmaz

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Helena Maria Tannhauser Barros

Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

Profa. Dra. Renata Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

F224p Farias, Fabiane Moreira

Psychotria myriantha Mull Arg. (rubiaceae) : caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades anti-quimiotáxica e sobre o sistema nervoso central / Fabiane Moreira Farias – Porto Alegre : UFRGS, 2006. - xv, 191 p.: il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Psychotria myriantha*. 2. Rubiaceae. 3. Alcalóides. II. Henriques, Amélia Teresinha. II. Steffen, Vera Maria. III. Título.

CDU: 547.94:582.972

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido com a orientação da Profa. Dra. Amélia Henriques e co-orientação da Profa. Dra. Vera Maria Steffen, nos laboratórios de Farmacognosia e Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A pesquisa foi financiada pelo CNPq e CAPES.

“O sucesso quase sempre se forma com uma parte de ideal e noventa e nove partes de suor na ação que o realiza.”

André Luiz

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Amélia Henriques pela orientação, estímulo e amizade durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Vera Steffen pela co-orientação, pela acolhida carinhosa em seu laboratório e por ter compartilhado comigo, além de seu conhecimento, sua amizade;

Ao Prof. Dr. José Ângelo Zuanazzi, por ter despertado meu interesse pela cromatografia líquida, pelo apoio, incentivo e por todos esses anos de boa convivência;

À Profa. Dra. Daniela Barros e a Profa. Dra. Mirna B. Leal pela colaboração, disponibilidade e gentileza;

Às funcionárias Patrícia Pinto, Dejanira Santos, Fátima Neckel e Liane Specke pela ajuda, disponibilidade e pelos bons momentos de convivência;

Aos amigos Marcelo e Carolina, de quem tive ajuda fundamental para realização deste trabalho, com total dedicação e competência, pelas nossas discussões científicas e principalmente pela grande amizade;

À minhas amigas Rafaela e Cláudia, agradeço pelo apoio e incentivo constantes, pelo carinho imenso e pela paciência nos momentos mais difíceis, pela grande e incondicional amizade e pela certeza de que continuaremos a caminhada juntas;

Ao Eduardo por ter sido meu aluno, meu irmão, meu grande amigo e companheiro por todos esses anos, por ter dividido sua alegria comigo, tornando os meus dias muito mais iluminados;

À Renata, que com muito carinho me ensinou a bater as asas, sendo responsável pela formação de toda a minha base científica, e que com um amor imenso me incentivou a voar sozinha;

À Edna e Miriam pelo carinho, amizade, companheirismo e por tudo que vivemos juntas;

Aos queridos Raquel, Guilherme e Tiago, por todos os momentos de alegria e por serem pessoas tão especiais;

À minha família, pelo apoio, pelo incentivo e pelo grande amor que nos une, por terem partilhado comigo cada dificuldade e cada alegria e por serem os grandes responsáveis por mais esta conquista;

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
OBJETIVOS GERAIS.....	5
CAPÍTULO I – ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES DE <i>Psychotria myriantha</i> Müll Arg. (RUBIACEAE)	
I. INTRODUÇÃO	9
I.1. Família RUBIACEAE	9
I.1.1. Gênero <i>Psychotria</i>	12
I.1.2. Atividades farmacológicas do gênero <i>Psychotria</i>	17
I.2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
I.2.1. Material vegetal	21
I.2.2. Equipamentos	21
I.2.3. Obtenção dos extratos de alcalóides	22
I.2.4. Avaliação dos perfis cromatográficos	24
I.2.4.1. Extrato diclorometano de alcalóides de <i>P. myriantha</i> (EDA)	24
I.2.4.2. Extrato <i>n</i> -butanol de alcalóides de <i>P. myriantha</i> (EBA)	24
I.2.5. Isolamento e purificação de alcalóides	25
I.2.5.1. Extrato diclorometano de alcalóides de <i>P. myriantha</i> (EDA)	25
I.2.5.2. Extrato <i>n</i> -butanol de alcalóides de <i>P. myriantha</i> (EBA)	26
I.3. RESULTADOS	27
I.3.1. Avaliação dos perfis cromatográficos	27
I.3.1.1. Extrato diclorometano de alcalóides de <i>P. myriantha</i> (EDA)	27
I.3.1.2. Extrato <i>n</i> -butanol de alcalóides de <i>P. myriantha</i> (EBA)	27
I.3.2. Isolamento e purificação de alcalóides	30
I.3.2.1. Extrato diclorometano de alcalóides de <i>P. myriantha</i> (EDA)	30
I.3.2.2. Extrato <i>n</i> -butanol de alcalóides de <i>P. myriantha</i> (EBA)	35
I.3.3. Rendimentos dos extratos de alcalóides totais e frações isoladas	37
I.3.4. Caracterização e identificação dos alcalóides isolados de <i>P. myriantha</i>	37
I.3.4.1. EBA	37
I.3.4.2. EBA2	40

I.3.5. Extrato metanólico bruto de folhas frescas de <i>P. myriantha</i>	43
I.4. DISCUSSÃO	45

CAPÍTULO II – *Psychotria myriantha*: INFLUÊNCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE SOBRE A ACETILCOLINESTERASE

II. INTRODUÇÃO	67
II.1. Usos tradicionais e atividades farmacológicas de <i>Psychotria</i>	67
II.1.1. Processo inflamatório	71
II.1.2. Agentes oxidantes	73
II.1.3. Inibição da acetilcolinesterase	75
II.1.4. Doença de Alzheimer, inflamação e estresse oxidativo	76
II.2. MATERIAIS E MÉTODOS	79
II.2.1. Equipamentos e materiais	79
II.2.2. Determinação da atividade antiinflamatória <i>in vitro</i>	79
II.2.2.1. Obtenção do fator quimiotático	81
II.2.2.2. Suspensão de neutrófilos	81
II.2.2.3. Determinação da atividade migratória dos leucócitos	81
II.2.3. Determinação da atividade antioxidante	82
II.2.4. Atividade inibidora da acetilcolinesterase	83
II.2.5. Atividade analgésica.....	84
II.2.5.1. Animais de experimentação.....	85
II.2.5.2. Tratamento.....	85
II.2.5.3. Ensaio da dor induzida por capsaicina	85
II.2.5.4. <i>Tail flick</i> (retirada da cauda ao estímulo térmico).....	86
II.3. RESULTADOS	87
II.3.1. Determinação da atividade antiinflamatória <i>in vitro</i>	87
II.3.2. Determinação da atividade antioxidante	87
II.3.3. Atividade inibidora da acetilcolinesterase	88
II.3.4. Atividade analgésica	90
II.3.4.1. Ensaio da dor induzida por capsaicina.....	90
II.3.4.2. <i>Tail flick</i> (retirada da cauda ao estímulo térmico).....	91
II.4. DISCUSSÃO	92

CAPÍTULO III – ATIVIDADE DO ÁCIDO ESTRICTOSIDÍNICO SOBRE OS NÍVEIS DE AMINAS BIOGÊNICAS

III. INTRODUÇÃO	99
III.1. Neurotransmissores DA e 5-HT.....	103
III.1.1. Dopamina (DA).....	103
III.1.2. Serotonina (5-HT)	107

III.2. Aminas biogênicas nas doenças neurodegenerativas e processos de memória.....	110
III.2.1. Doença de Alzheimer.....	110
III.2.2. Esquizofrenia.....	111
III.2.3. Doença de Parkinson.....	112
III.2.4. Memória e aprendizado	113
III.3. Plantas medicinais e distúrbios do sistema nervoso central.....	114
III.4. MATERIAIS E MÉTODOS	116
III.4.1. Equipamentos	116
III.4.2. Metodologia para a determinação de aminas biogênicas	116
III.4.2.1. Animais de experimentação	116
III.4.2.2. Tratamento	117
III.4.2.3. Preparação das amostras a partir das estruturas cerebrais	118
III.4.2.4. Estabelecimento dos parâmetros cromatográficos	118
III.4.3. Validação do método analítico para a quantificação de aminas biogênicas	119
III.4.3.1. Linearidade	119
III.4.3.2. Limites de detecção (LD)	120
III.4.3.3. Limites de quantificação (LQ)	120
III.4.3.4. Repetibilidade e precisão intermediária	121
III.4.4. Quantificação de aminas biogênicas e seus metabólitos	121
III.5. RESULTADOS	122
III.5.1. Estabelecimento dos parâmetros cromatográficos	122
III.5.2. Validação do método analítico para a quantificação de aminas biogênicas	123
III.5.2.1. Linearidade	123
III.5.2.2. Limites de detecção (LD)	125
III.5.2.3. Limites de quantificação (LQ)	125
III.5.2.4. Repetibilidade e precisão intermediária	126
III.5.3. Quantificação de aminas biogênicas e seus metabólitos	127
III.6. DISCUSSÃO	129
DISCUSSÃO GERAL	137
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
ANEXOS	171
Espectro de H ¹ RMN para ácido strictosidínico	
Espectro de C ¹³ RMN-DEPT para ácido strictosidínico	
Espectro de H ¹ -H ¹ COSY para ácido strictosidínico	
Espectro de HMBC para ácido strictosidínico	
Espectro de HSQC para ácido strictosidínico	

Espectro de H^1 RMN para miriantosina
Espectro de C^{13} RMN-DEPT para miriantosina
Espectro de H^1 - H^1 COSY para miriantosina
Espectro de HSQC para miriantosina
Espectro de HMBC para miriantosina
Solução salina de Hanks
Reagentes utilizados para coloração dos filtros no ensaio da câmara de Boyden
Efeito de EBA no teste da dor induzida por capsaicina
Efeito de EBA e ácido estrictosidínico no teste *tail flick*
Hipocampos tratados com injeção intra-hipocampal de ácido estrictosidínico
Córtices tratados com injeção intra-hipocampal de ácido estrictosidínico
Hipocampos tratados com injeção intraperitoneal de ácido estrictosidínico
Estriados tratados com injeção intraperitoneal de ácido estrictosidínico
Parecer Comitê de Ética

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura I.1 - Comparação entre os números de espécies nas famílias: Asteraceae, Orchidaceae, Fabaceae, Rubiaceae, Rutaceae e Mammalia	9
Figura I.2 - Formação da strictosidina	11
Figura I.3 - Alcalóides polindólicos isolados de espécies de <i>Psychotria</i>	14
Figura I.4 - Peptídeo cíclico isolado de <i>P. longipes</i>	15
Figura I.5 - Alcalóides indol monoterpênicos isolados de espécies de <i>Psychotria</i> coletadas no sul do Brasil	16
Figura I.6 - Esquema de obtenção dos extratos de alcalóides de <i>P. myriantha</i>	23
Figura I.7 - Cromatograma preliminar de EDA.....	28
Figura I.8 - Perfil cromatográfico de EBA por CLAE/DAD.....	28
Figura I.9 - Perfil cromatográfico de EBA por CLAE/UV/EM.....	29
Figura I.10 - Espectros de massas (CLAE/UV/EM) para EBA1 e EBA2	30
Figura I.11 - Cromatograma de EDA em CLAE/UV semi-preparativo, picos correspondem às frações PM 1 a 8.....	31
Figura I.12 - Espectros de UV das frações PM2 e PM5.....	31
Figura I.13 - Ampliação e comparação das regiões aromáticas dos espectros de H ¹ RMN para a fração PM2 e strictosamida.....	32
Figura I.14 - Comparação dos espectros UV do pico 5 do cromatograma de EDA e amostra autêntica de strictosamida	33
Figura I.15 - Cromatogramas resultantes da avaliação de strictosamida, uma mistura de EDA e strictosamida, vincosamida e a sobreposição dos cromatogramas de EDA e vincosamida	34
Figura I.16 – Estrutura do alcalóide strictosamida	35
Figura I.17 - Cromatograma de EBA1 em CLAE/DAD.....	36
Figura I.18 - Cromatograma de EBA2 em CLAE/DAD.....	36
Figura I.19 - Ampliação da região aromática do espectro de H ¹ RMN para EBA1	38

Figura I.20 -	Estrutura do alcalóide indol monoterpênico EBA1, identificado como ácido strictosidínico	40
Figura I.21 -	Ampliação do espectro H ¹ RMN. para EBA2	41
Figura I.22 -	Estrutura de EBA2, alcalóide identificado como miriantosina	43
Figura I.23 -	Perfil cromatográfico do extrato metanólico bruto de folhas frescas de <i>P. myriantha</i>	44
Figura I.24 -	Ampliação do espectro de H ¹ RMN para ácido strictosidínico, com deslocamentos característicos do núcleo indólico.....	48
Figura I.25 -	Ampliação do espectro de H ¹ RMN para EBA1 , apresentando os sinais correspondentes à molécula de açúcar.....	49
Figura I.26 -	Ampliação do espectro de C ¹³ RMN para EBA1	50
Figura I.27 -	Conectividades relativas entre os principais sinais de hidrogênio de EBA1 no espectro H ¹ -H ¹ COSY.....	51
Figura I.28 -	Correlações entre os sinais de hidrogênios e carbonos no espectro de HSQC para EBA1 , identificando a glicose.....	51
Figura I.29 -	Espectro de HMBC para EBA1 , apresentando a correlação entre o hidrogênio em δ_H 4,63 ppm (H-1') e o carbono em δ_C 95,1 ppm (C-21)..	52
Figura I.30 -	Ampliação do espectro de H ¹ RMN para EBA2	55
Figura I.31 -	Ampliação dos espectros de H ¹ RMN e de C ¹³ RMN para EBA2	56
Figura I.32 -	Ampliação do espectro de HMBC para EBA2	57
Figura I.33 -	Ampliações dos espectros de C ¹³ RMN e de H ¹ RMN para EBA2 , indicando a presença de uma metila.....	58
Figura I.34 -	Conectividades relativas entre os sinais de hidrogênio de EBA2 , obtidas pelo espectro de correlação H ¹ -H ¹ COSY.....	59
Figura I.35 -	Espectro de HMBC para EBA2	60
Figura I.36 -	Perfil cromatográfico de EBA em análise por CLAE/DAD.....	62
Figura II.1 -	Montagem da câmara de Boyden.....	80
Figura II.2 -	Reação da acetilcolinesterase com acetato de naftila.....	84
Figura II.3 -	Inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase: galantamina, EDA, EBA, ácido strictosidínico,	90

Figura III.1 -	Estrutura das aminas biogênicas	101
Figura III.2 -	Etapas da síntese enzimática de dopamina, norepinefrina e epinefrina.....	106
Figura III.3 -	Metabolismo da dopamina	107
Figura III.4 -	Metabolismo da serotonina	110
Figura III.5 -	Cromatograma da mistura de aminas biogênicas e seus metabólitos	125

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela I.1 - Gradiente linear empregado na análise preliminar de EDA	24
Tabela I.2 - Gradiente linear utilizado na análise preliminar de EBA	25
Tabela I.3 - Gradiente linear utilizado no fracionamento de EDA	25
Tabela I.4 - Rendimento de extratos de alcalóides e frações isoladas de <i>P. myriantha</i>	37
Tabela I.5 - Dados de RMN H^1 , C^{13} , COSY, HSQC e HMBC para EBA1	39
Tabela I.6 - Dados espectroscópicos para o composto EBA2.....	42
Tabela I.7 - Gradiente linear utilizado para avaliação cromatográfica do extrato metanólico bruto de folhas de <i>P. myriantha</i>	44
Tabela I.8 - Comparação dos dados de H^1 e C^{13} RMN de EBA1 e de ácido strictosidínico	54
Tabela II.1 - Usos tradicionais e atividades farmacológicas descritas para espécies de <i>Psychotria</i>	68
Tabela II.2 - Resultados do teste da câmara de Boyden para extrato e alcalóides isolados de <i>P. myriantha</i>	88
Tabela II.3 - Efeito do extrato EBA no teste da dor induzida por capsaicina.....	91
Tabela II.4 - Efeito do extrato EBA e ácido strictosidínico no teste da retirada da cauda ao estímulo térmico.....	92
Tabela III.1 - Espécies utilizadas pela medicina tradicional para o tratamento de doenças neurológicas e degenerativas e suas atividade farmacológicas sobre o sistema nervoso central.....	116
Tabela III.2 - Resultados das curvas de calibração para a quantificação de monoaminas em estriado e hipocampo de ratos	127
Tabela III.3 - Desvios padrão relativos entre as curvas de calibração construídas para a análise de linearidade	127
Tabela III.4 - Limites de detecção de dopamina, serotonina e metabólitos	128
Tabela III.5 - Limites de quantificação de dopamina, serotonina e metabólitos.....	128
Tabela III.6 - Valores de CV % de repetibilidade e precisão intermediária para homogeneizados de hipocampo e estriado de ratos	129

Tabela III.7 - Resultados do tratamento intra-hipocampal bilateral com ácido estrictosidínico sobre hipocampo e córtex de ratos.....	131
Tabela III.8 - Resultados do tratamento intraperitoneal agudo com ácido estrictosidínico.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS

3-MT	3-metoxitiramina
5-HIAA	Ácido 5- indolacético
5-HT	Serotonina, 5-hidroxitriptamina
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
COSY	H-H Correlation Spectroscopy
DA	Dopamina, 3,4-di-hidroxifeniletilamina
DE	Detector eletroquímico
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DHBA	3,4-di-hidroxibenzilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPAC	Ácido 3,4-di-hidrofenilacético
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
DPR	Desvio padrão relativo
EBA	Extrato <i>n</i> -butanol de alcalóides
EDA	Extrato diclorometano de alcalóides
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear simple quantum correlation
HVA	Ácido homovanílico
IP	Intraperitoneal
LD	Limites de detecção
LPS	Lipopolissacarídeos
LQ	Limites de quantificação
MeOH	Metanol

NE	Norepinefrina
PM	Frações de <i>Psychotria myriantha</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNS	Espécies reativas de nitrogênio (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)
SNC	Sistema nervoso central

RESUMO

***Psychotria myriantha* Müll Arg. (RUBIACEAE): Caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiquimiotóxica e sobre o sistema nervoso central**

O gênero *Psychotria* destaca-se na família RUBIACEAE pela produção de alcalóides bioativos e por sua taxonomia complexa, sendo muitas vezes relacionado aos gêneros *Palicourea*, *Cephaelis*, *Calycodendron* e *Calycosia*. A divisão de *Psychotria* nos subgêneros *Psychotria*, *Tetramerae* e *Heteropsychotria* foi proposta com o objetivo de auxiliar a classificação quimiotaxonômica do gênero. Estudos demonstram que o subgênero *Psychotria* (espécies pantropicais) produz alcalóides poliméricos, formados por duas ou mais unidades de triptamina; enquanto o subgênero *Heteropsychotria* parece estar envolvido com a produção de alcalóides indol monoterpênicos, de acordo com pesquisas realizadas com diferentes espécies coletadas no Sul do Brasil. O isolamento e purificação dos alcalóides strictosamida, ácido strictosidínico e miriantosina, a partir de *Psychotria myriantha*, corroboram com esta hipótese, permitindo a inclusão da espécie no subgênero *Heteropsychotria*. A literatura descreve várias atividades para extratos e alcalóides isolados de espécies de *Psychotria*, como antimicrobiana e analgésica, por exemplo. Neste trabalho, o extrato *n*-butanólico de alcalóides de *P. myriantha*, além de seus alcalóides isolados, apresentaram atividade inibidora da migração de leucócitos, sugerindo um efeito antiinflamatório, e capacidade de inibir a ação da enzima acetilcolinesterase. Extratos e alcalóides isolados da espécie foram avaliados quanto à atividade antioxidante em CCD, frente ao DPPH, apresentando resultado negativo. O extrato EBA e o alcalóide ácido strictosidínico aumentaram o tempo de latência no teste da retirada da cauda frente ao estímulo térmico, indicando uma atividade analgésica do tipo opióide. A influência do ácido strictosidínico, alcalóide isolado em maior quantidade em massa, sobre os níveis de DA, DOPAC, 3-MT, HVA, 5-HT e 5-HIAA em estruturas cerebrais de ratos foi verificada. Hipocampus de animais que receberam injeção intra-hipocampal bilateral de ácido strictosidínico (20 µg/µL) apresentaram redução de 83,4 % nos níveis de serotonina, em comparação ao grupo controle, enquanto os córtices desses animais apresentaram redução nos níveis de DOPAC (35,9%), 3-MT (24,7%) e 5-HIAA (9%). Hipocampus e estriados de ratos tratados com injeção i.p. de ácido strictosidínico (10 mg/kg) demonstraram

diminuição de 63,4 e 28,7% nos níveis de 5-HT, respectivamente. As alterações nos níveis de aminas biogênicas nas estruturas avaliadas, além das atividades analgésica e inibidora da acetilcolinesterase, indicam que *P. myriantha* e espécies do subgênero *Heteropsychotria* constituem uma potencial fonte de substâncias bioativas no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central.

Palavras chave: *Psychotria myriantha*, alcalóides indol monoterpênicos, strictosamida, ácido strictosidínico, miriantosina, inibição da migração de leucócitos, inibição da acetilcolinesterase, atividade analgésica, aminas biogênicas, hipocampo, córtex, estriado, dopamina e serotonina.

ABSTRACT

Psychotria genus is an important in RUBIACEAE due to bioactive alkaloids production and complex taxonomy, being related to *Palicourea*, *Cephaelis*, *Calycodendron* and *Calycosia* genera. The division of *Psychotria* in *Psychotria*, *Tetramerae* and *Heteropsychotria* subgenera was proposed with the aim of aiding the genus chemotaxonomic classification. Studies demonstrate that *Psychotria* subgenus produce polyindoline alkaloids formed by two or more triptamine units; whereas *Heteropsychotria* subgenus seems to be involved with indole monoterpene alkaloids production, according to researches with different species collected in Southern Brazil. Isolation and purification of strictosamide, strictosidinic acid and miriantosine from *Psychotria myriantha* corroborated this hypothesis, allowing its inclusion into *Heteropsychotria* subgenus. The scientific literature describes several activities to *Psychotria* extracts and alkaloids, such as antimicrobial and analgesic, for example. In this work, *P. myriantha* *n*-butanolic alkaloid extract and isolated compounds inhibited the leukocyte migration, suggesting an antiinflammatory activity, and a weak ability to inhibit the action of acetylcholinesterase enzyme. Alkaloids and extracts from *P. myriantha* were evaluated as regards their antioxidant activity using DPPH, with no positive results. EBA and strictosidinic acid increased the latency in the tail flick model, indicating an opioid analgesic activity. The influence of strictosidinic acid on the levels of DA, DOPAC, 3-MT, HVA, 5-HT and 5-HIAA in brain structures of rats was verified. Hippocampus with intra-hippocampal injection of strictosidinic acid (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) displayed a decrease of 83.4% in serotonin levels, in comparison with control group; whereas the cortex showed a decrease in the levels of DOPAC (35.9%), 3-MT (24.7%) and 5-HIAA (9%). Hippocampus and striatum that received intraperitoneal injection of strictosidinic acid (10 mg/kg) showed 5-HT levels reduction of 63.4 e 28.7%, respectively. The biogenic amine levels alterations in the studied structures, associated with the analgesic and acetylcholinesterase inhibitor activities, suggest that *P. myriantha* and species from the *Heteropsychotria* subgenus constitute a font of bioactive compounds in the treatment of central nervous system disturbs.

Key Words: *Psychotria myriantha*, indol monoterpene alkaloids, strictosamide, strictosidinic acid, miriantosine, leukocyte chemotaxis inhibition, acetylcholinesterase inhibition, analgesic activity, biogenic amines, hippocampus, cortex, striatum, dopamine and serotonin.

INTRODUÇÃO GERAL

O uso de ervas, extratos vegetais e derivados de produtos naturais é uma modalidade terapêutica que vem resistindo à passagem do tempo e acompanhando o desenvolvimento dos povos (PHILLIPSON, 2001; PATWARDHAN, 2005). Em escritos da antiga civilização grega são encontrados relatos de classificação e descrição de algumas plantas, o que permite atualmente conhecer e identificar seu uso (PHILLIPSON, 2001).

Até a metade do século XIX, pelo menos 80% dos medicamentos eram derivados de plantas, que continuam despertando o interesse dos pesquisadores, embora a indústria farmacêutica tenha voltado seus interesses para os fármacos sintéticos após a Revolução industrial (GILANI e RAHMAN, 2005). Apesar disso, a etnofarmacologia e a descoberta de fármacos a partir de produtos naturais, permanecem gerando resultados importantes no cenário atual (PATWARDHAN, 2005). Muitos fármacos foram originalmente descobertos através do estudo de usos tradicionais, sendo que alguns deles ainda não puderam ser substituídos, apesar do avanço na química sintética (GILANI e RAHMAN, 2005). Ainda hoje, muitas classes de substâncias farmacologicamente ativas incluem um protótipo de origem natural (GILANI e RAHMAN, 2005) e muitos autores têm discutido a importância e o potencial das plantas medicinais como fontes de novos agentes terapêuticos (CORDELL *et al.*, 2001).

Os alcalóides são exemplos de metabólitos secundários que originaram diversos fármacos (BARREIRO, 2001). A quantidade de produtos descritos, sua diversidade estrutural e variadas atividades farmacológicas fazem dos alcalóides, junto com os antibióticos, um dos grupos mais importantes entre as substâncias naturais com interesse terapêutico (CORDELL *et al.*, 2001). Um dos representantes mais relevantes deste grupo de compostos é a morfina, isolada do látex de *Papaver somniferum* L. em setembro de 1806, com potente atividade hipnoanalgésica. A morfina foi o protótipo natural dos derivados 4-fenilpiperidínicos, importantes analgésicos, e continua sendo o fármaco de escolha para o tratamento da dor em pacientes com câncer terminal (BARREIRO, 2001; GILANI e RAHMAN, 2005).

O isolamento da morfina, bem como os trabalhos posteriores realizados, impulsionou os estudos químicos e farmacológicos sobre alcalóides, possibilitando a descoberta de inúmeras substâncias ativas, como por exemplo: a emetina, princípio

ativo de *Cephaelis ipecacuanha*, isolado em 1817 e largamente utilizado no tratamento de disenterias e como antiemético. Quinina foi isolada por PELLETIER e CAVENTOU em 1820, de *Cinchona officinalis*, e foi responsável pelo desenvolvimento de antimaláricos sintéticos como a cloroquina e a mefloquina (BARREIRO, 2001; PHILLIPSON, 2001). Muitos compostos derivados de plantas têm sido empregados com sucesso no tratamento do câncer, como por exemplo, vincristina e vimblastina, alcalóides indol-monoterpênicos isolados de *Catharanthus roseus*. A introdução de vincristina na terapêutica foi responsável por um aumento no índice de cura em casos de doença de Hodgkin e algumas formas de leucemia (ROCHA *et al.*, 2001).

De acordo com CORDELL *et al.* (2001), os alcalóides compreendem cerca de 20% dos produtos naturais conhecidos, constituindo quase 50% dos derivados de vegetais de significância farmacêutica e biológica. Camptotecina e seus derivados, alcalóides indol monoterpênicos, apresentam potente atividade antitumoral, agindo sobre a topoisomerase I (BAILLY, 2003; LORENCE e NESSLER, 2004). Alcalóides indol monoterpênicos têm sido investigados para uma grande variedade de efeitos farmacológicos, tais como contraceptivo, antitumoral, antiinflamatório, anti-malárico, anti-HIV, bactericida e leishmanicida, além de atividades estimulatórias sobre o sistema nervoso central. Huperzina A isolado de licopodiáceas e galantamina de espécies da família Amaryllidaceae têm apresentado resultados significativos no tratamento da doença de Alzheimer (LIANG e TANG, 2004; HERNANDEZ *et al.*, 2006).

Extratos etanólicos de algumas espécies de *Psychotria* (RUBIACEAE) do sul do Brasil demonstraram atividade analgésica inespecífica (LEAL, 1994) e estudos posteriores permitiram o isolamento de diferentes alcalóides indol monoterpênicos, como por exemplo a psicolatina (anteriormente denominada umbelatina) alcalóide majoritário de *P. umbellata* (KERBER, 1999) que apresentou efeito ansiolítico (BOTH, 2001; BOTH *et al.*, 2002b; BOTH *et al.*, 2005). Com base no potencial terapêutico apresentado pelos alcalóides e pela busca contínua de novos compostos farmacologicamente ativos entre esses metabólitos no gênero *Psychotria*, os objetivos deste trabalho foram:

- Analisar os alcalóides presentes nos extratos diclorometano e n-butanólico, obtidos a partir de partes aéreas de *P. myriantha*, visando o isolamento e a identificação dos compostos majoritários;
- Avaliar a atividade do (s) alcalóide (s) isolado (s) sobre os níveis de aminas biogênicas em hipocampo, córtex e estriado de ratos;
- Investigar, empregando métodos *in vitro*, as atividades antiinflamatória, antioxidante e inibidora da enzima acetilcolinesterase para os alcalóides isolados a partir do extrato butanólico de *P. myriantha*.
- Verificar a atividade analgésica do extrato butanólico de alcalóides de *P. myriantha* e do alcalóide majoritário, ácido strictosidínico.

Para apresentação dos assuntos com clareza, o ordenamento utilizado neste trabalho está estruturado em três capítulos. O capítulo I apresenta uma revisão sobre o gênero *Psychotria* e descreve a análise fitoquímica da espécie *P. myriantha*. No capítulo II são demonstrados os resultados da avaliação dos alcalóides isolados quanto à atividade antiinflamatória, antioxidante e inibidora da acetilcolinesterase, através de ensaios *in vitro* e da ação analgésica periférica ou central, utilizando modelos *in vivo*. O capítulo III apresenta a avaliação da atividade do alcalóide isolado a partir do extrato butanólico de alcalóides sobre os níveis de aminas biogênicas em estruturas cerebrais de ratos relacionadas ao processamento da memória e aprendizado, através da quantificação dos neurotransmissores por CLAE/DEQ.

CAPÍTULO I

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES DE *Psychotria myriantha* Müll Arg. (RUBIACEAE)

I. INTRODUÇÃO

I.1. Família RUBIACEAE

A família RUBIACEAE é composta por 650 gêneros e compreende 13000 espécies, sendo uma das maiores famílias descritas (fig. I.1) depois de Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae (ROBBRECHT, 1988; ROBBRECHT, 2005). RUBIACEAE é constituída por árvores de grande, médio e pequeno porte, arbustos, subarbustos e ervas anuais ou perenes, distribuídas em regiões tropicais dos dois hemisférios (ROBBRECHT, 1988; BARROSO, 1991), representando uma grande parte da vegetação lenhosa tropical, especialmente nas florestas chuvosas (ROBBRECHT, 2005).

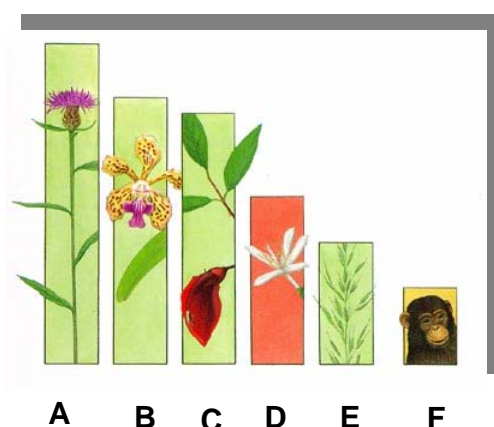


Figura I.1: Comparação entre o número de espécies nas famílias: **A** - Asteraceae (21000 spp.); **B** - Orchidaceae (17500 spp.); **C** - Fabaceae (16500 spp.); **D** - Rubiaceae (13000 spp.); **E** - Rutaceae (8000 spp.) e **F** - Mammalia (5000 spp.) (ROBBRECHT, 2005).

Até o ano de 2001, segundo CORDELL *et al.*, foram estudados 57 gêneros e 181 espécies desta família, permitindo o isolamento de cerca de 680 alcalóides. RUBIACEAE produz alcalóides pertencentes a mais de dez classes diferentes, onde se destacam os isoquinolínicos, com 44 substâncias elucidadas; os quinolínicos,

com 70 alcalóides; e os indólicos, com 391 compostos isolados (CORDELL *et al.*, 2001).

Os alcalóides indólicos são característicos em RUBIACEAE, assim como em APOCYNACEAE e LOGANIACEAE (BRUNETON, 1993), sendo derivados do metabolismo do triptofano. Contudo, estas moléculas multicíclicas complexas podem apresentar porções não triptofânicas, provenientes dos esqueletos monoterpenóides precursores, que podem ser dos tipos: aspidospermano, corinano e ibogano. Estudos com *Catharanthus roseus* demonstraram que o glicosídeo secologanina produz uma unidade terpenóide, envolvida na biossíntese de alcalóides indol-monoterpênicos (ROBBERS *et al.*, 1996), metabólitos encontrados também em RUBIACEAE (BRUNETON, 1993). São originados a partir da via de condensação da triptamina com o iridóide secologanina, formando strictosidina, sendo que as enzimas-chave envolvidas nestas reações são triptofano descarboxilase e strictosidina sintase (figura 1.2). Em plantas desta família, a secologanina também pode se condensar com duas moléculas de dopamina, formando alcalóides isoquinolínicos do tipo emetina, rota biossintética encontrada em espécies do gênero *Cephaelis* (SOLIS *et al.*, 1993; FABBRI *et al.*, 2000).

Segundo ROBBRECHT (1988), RUBIACEAE pode ser dividida em quatro subfamílias: *Rubioideae*, *Cinchonoideae*, *Ixoroideae* e *Antirheoideae*. Estudos taxonômicos sugerem que RUBIACEAE apresenta um acúmulo de três grupos distintos de iridóides, o que parece representar um padrão de tendência evolutiva (INOUYE *et al.*, 1988). A subfamília *Ixoroideae* é caracterizada pela produção de gardenosídeo, geniposídeo e ixorosídeo; subfamília *Rubioideae*, pela presença de asperulosídeo ou ácido desacetilasperulosídico; e subfamílias *Antirheoideae* e *Cinchonoideae* que apresentam loganina ou seco-iridóides (INOUYE *et al.*, 1988). A presença de iridóides em RUBIACEAE é de grande relevância devido ao fato de serem marcadores taxonômicos e a loganina, precursora de secologanina, um dos elementos formadores dos alcalóides indol-monoterpênicos e de alguns alcalóides isoquinolínicos (BRUNETON, 1993).

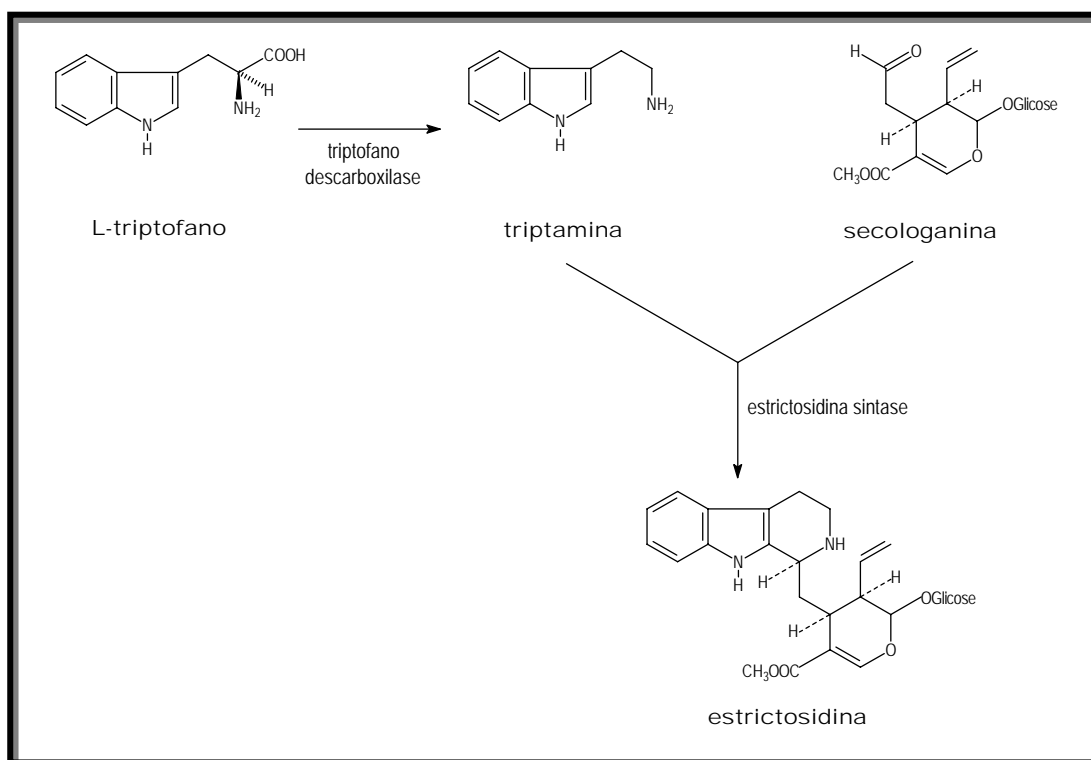


Figura 1.2: Biossíntese da estrictosidina a partir da formação de triptamina, pela ação da triptofano descarboxilase, e condensação com a secologanina, mediada pela enzima estrictosidina sintase.

Quanto à presença de alcalóides, todas as subfamílias caracterizam-se principalmente pelos indólicos, mas outros tipos podem ser encontrados em alguns gêneros. Em *Cinchonoideae*, algumas espécies de *Cinchona* e *Remija* apresentam alcalóides quinolínicos; *Nauclea*, piridínicos; e *Simira*, beta-carbolínicos. A subfamília *Ixoroideae* produz alcalóides diversos, como: piperidínicos e piridínicos (*Schumanniphyton*), beta-carbolínicos (*Pavetta*), metilxantínicos (*Coffea*) e peptídicos (*Feretia*). Em *Antirheoideae* são encontrados alcalóides quinolínicos (*Guettarda* e *Timonius*), polindólicos (*Hodkinsonia*) e peptídicos (*Canthium*). *Rubioideae* produz alcalóides quinolínicos (*Ophiorrhiza*), diaminas terciárias (*Oldenlandia*), isoquinolínicos (*Cephaelis* e *Spermacoce*), polindólicos (*Psychotria*) e quinazolínicos e beta-carbolínicos (*Galium*) (KERBER, 1999).

Os alcalóides têm desempenhado uma importante função como ferramentas na elucidação de efeitos farmacológicos, respostas fisiológicas e mecanismos

bioquímicos. Neste contexto, a família RUBIACEAE possibilitou a obtenção de compostos de interesse comercial e diversidade de usos farmacêuticos, decorrentes de suas atividades farmacológicas. Muitas destas substâncias foram e ainda são empregadas na terapêutica de diferentes sintomas e enfermidades (CORDELL *et al.*, 2001). Como exemplos destes alcalóides em RUBIACEAE podem-se citar: cafeína (*Coffea arábica*), utilizada em diversos medicamentos; emetina, isolada de *Cephaelis ipecacuanha*, com atividade emética e anti-amebocida; quinidina (*Cinchona ledgeriana*), usada como antiarrítmico; quinina (*Cinchona ledgeriana*), utilizada por suas propriedades antimalárica e tônica; e ioimbina, isolada de *Pausinystalia yoimba*, com efeito afrodisíaco (CORDELL *et al.*, 2001).

As espécies pertencentes à subfamília *Rubioideae* estão distribuídas em 15 tribos, onde a maior é Psychotrieae. Esta tribo é formada por aproximadamente 50 gêneros, alguns deles com delimitação incerta e controversa, como é o caso de *Psychotria* e *Palicourea* (LIBOT *et al.*, 1987).

I.1.1. Gênero *Psychotria*

O gênero *Psychotria* foi descrito por Linneaus em 1759, através da avaliação botânica da espécie *P. asiática* (DAVIS *et al.*, 2001). *Psychotria* abrange aproximadamente 2000 espécies (NEPOKROEFF *et al.*, 1999) de árvores e arbustos, amplamente distribuídos no estrato arbustivo das matas tropicais (ROTH *et al.*, 1985).

Devido à dificuldade na delimitação de suas fronteiras, *Psychotria* é motivo de grande controvérsia entre alguns autores e tem sido estreitamente relacionado à *Palicourea* e *Cephaelis*, apresentando, também, similaridades com os gêneros *Calycodendron* e *Calycosia* (LIBOT *et al.*, 1987). O primeiro estudo sistemático em RUBIACEAE, ocorreu em 1981, com a caracterização do gênero *Psychotria* por Schumann, que o separou de *Palicourea*. Desde então, não há consenso quanto às características mais adequadas na separação entre as espécies incluídas nestes dois gêneros, considerados morfologicamente muito semelhantes (STEYERMARK,

1972; TAYLOR, 1989, 1993, 1996). ROBBRECHT (1988) considera *Psychotria* e *Cephaelis* como dois gêneros distintos, enquanto TAYLOR (1997) inclui a maior parte das espécies de *Cephaelis* em *Psychotria* e algumas em *Palicourea*.

Cephaelis produz alcalóides isoquinolínicos, especialmente os tetraidroisoquinolínicos, originados a partir da tirosina. Os alcalóides tetraidroisoquinolínicos 7-metilneoipecosídeo e neoipecosídeo foram isolados das raízes de *Cephaelis ipecacuanha* por ITOH *et al.* em 1989. Outros seis alcalóides de *C. ipecacuanha*, 6-metil-ipecosídeo, ácido ipecosídico, demetilalangisídio, neoipecosídeo, 8-O-metil-neoipecosídeo e 3,4-deidroneoipecosídeo, foram isolados por ITOH *et al.*, em 1991. Entretanto, *P. dichroa* apresentou alcalóides indol-monoterpênicos, indicando a existência de diferentes rotas metabólicas (SOLIS *et al.*, 1993).

Os alcalóides polindólicos (fi. I.3) são compostos poliméricos que constituem o maior grupo de metabólitos encontrados em *Psychotria*. São resultantes da condensação de duas ou mais unidades de N₆-metil-triptamina. A partir de *Psychotria forsteriana* foram isolados alcalóides polindólicos: isopsicotridina C e psicotridina, contendo 5 unidades triptamínicas; quadrigemina A e quadrigemina B, com 4 unidades (ROTH *et al.*, 1985 e 1986), bem como os alcalóides diméricos: calicantina, isocalicantina e mesoquimonantina (ABJIBADÉ *et al.*, 1992). Os metabólitos calicantina e isocalicantina, além de quadrigemina C, estão presentes em *P. colorata* (CARVALHO, 1993). Psicoleína e quadrigemina C (GUERITTE-VOEGELEIN *et al.*, 1992), hodgkinsina, isopsicotridina A e isopsicotridina B, psicotridina, quadrigemina I, oleoidina e caledonina foram determinadas em *P. oleoides* (JANNIC *et al.*, 1999). *P. rostrata* apresentou quadrigemina B, calicantina, hodgkinsina, calicosidina e quimonantina (LAJIS *et al.*, 1993). Calicosidina e hodgkinsina foram isoladas de *Calycodendrum milnei* (*P. milnei* segundo ROBBRECHT, 1988) por ABJIBADÉ *et al.* (1990). Os compostos quinolínicos glomerulatina A, glomerulatina B e glomerulatina C foram encontrados em folhas de *P. glomerulata* (SOLIS *et al.*, 1997) (figura I.3).

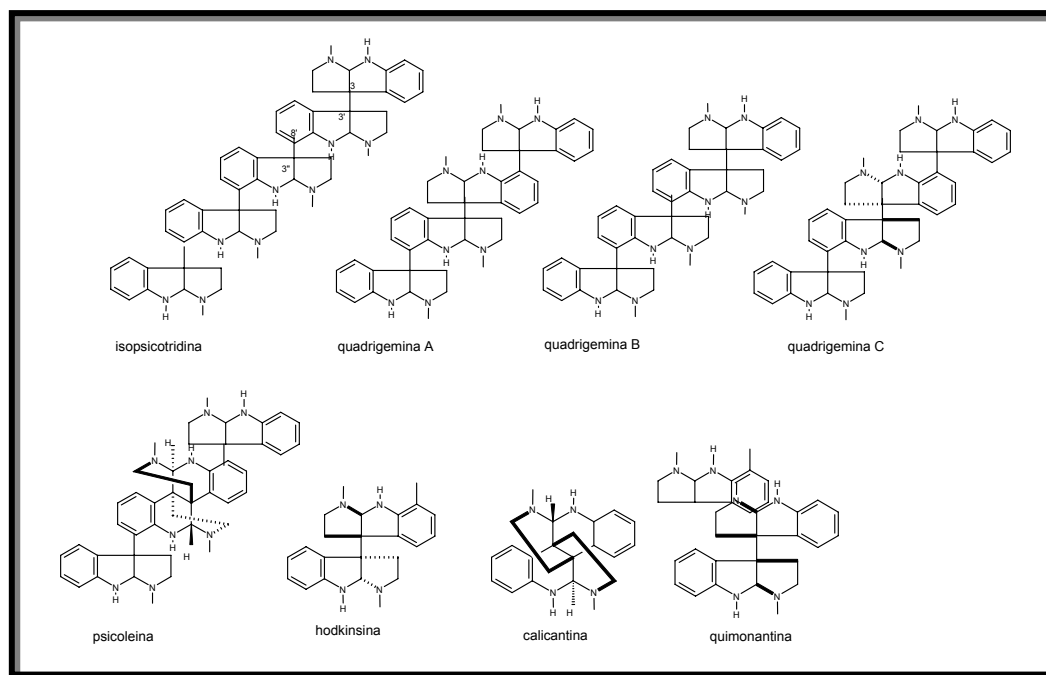


Figura I.3: Alcalóides polindólicos isolados de espécies de *Psychotria*.

Além dos alcalóides polindólicos, diversos outros compostos estão presentes em espécies de *Psychotria*. A análise cromatográfica do extrato de *P. longipes* permitiu o isolamento do peptídeo cíclico (fig. I.4) ciclopsicotrídio A (WITHERUP *et al.*, 1994). Os alcalóides indol-monoterpênicos: isodolicantosídeo, correantosídeo, correantina A, correantina B, 20-epi-correantina, correantina e 10-hidroxicorreantosídeo foram encontrados em folhas de *Psychotria correae* (ACHEMBACH *et al.*, 1995). O estudo fitoquímico de *P. viridis* demonstrou a presença de grande conteúdo de dimetil-triptamina, metil-triptamina e tetraidro-beta-carbolina (RIVIER e LINDGREEN, 1972; McKENNA *et al.*, 1984).

A avaliação dos perfis cromatográficos e dos espectros na região do ultravioleta para os extratos etanólicos de espécies de *Psychotria* coletadas no sul do Brasil, realizada por cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos, permitiu a verificação de cromóforos típicos de alcalóides indol monoterpênicos e β -carbolínicos glicosilados em catorze das quinze espécies estudadas (LOPES *et al.*, 2004). *N*- β -D-glicopiranosil-vincosamida foi identificada em folhas de *P. leiocarpa* (LOPES, 1998). De SANTOS (1999) isolou lialosídeo,

trabalhando com *P. suterella*. Este alcalóide β -carbólico foi isolado anteriormente de *Palicourea adusta* (VALVERDE *et al.*, 1999). Psicolatina, alcalóide majoritário de *Psychotria umbellata*, e braquicerina, de *P. brachyceras*, foram isolados por KERBER em 1999 (fig. I.5).

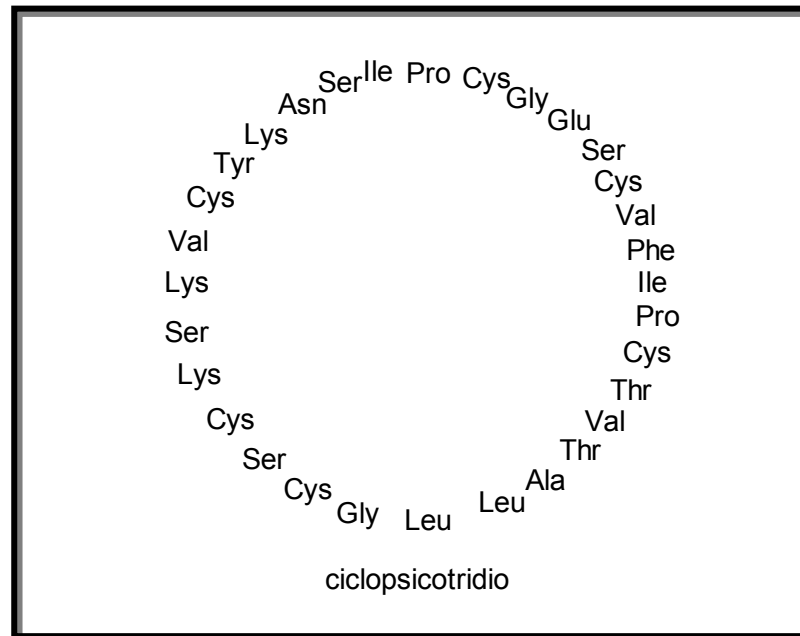


Figura I.4: Peptídeo cíclico isolado de *P. longipes*

Psychotria é taxonomicamente complexo e, baseado em características morfológicas e distribuição geográfica, pode ser dividido em três subgêneros: *Psychotria* (pantropical), *Tetrameræ* (inclui espécies da África e Madagascar) e *Heteropsychotria* (inclui as espécies de *Psychotria* neotropicais). A análise da morfologia de *Palicourea* e *Rudgea* indica uma relação íntima com os membros do subgênero *Heteropsychotria* (TAYLOR, 1989 e 1996). Estudos filogenéticos propõem a fusão de *Palicourea* e *Heteropsychotria* (NEPOKROEFF *et al.*, 1999).

No estado do Rio Grande do Sul o gênero *Psychotria* é representado pelas espécies: *P. brachyceras*, *P. umbellata*, *P. kleinii*, *P. suterella*, *P. birotula*, *P. leiocarpa*, *P. myriantha*, *P. carthagenensis*, *P. nitidula*, *P. hancornifolia*, *P. longipes*,

P. maporides, *P. nuda*, *P. pubigera*, *P. sessilis*, *P. stachioides*, *P. vellosiana* e *P. tenerior*.

Psychotria myriantha, analisada neste trabalho, é um arbusto de até dois metros de altura, que ocorre com freqüência regular em terrenos elevados, nas zonas do alto Uruguai e em terrenos baixos, na zona do litoral do Rio Grande do Sul (DILLENBURG e PORTO, 1985). Pouco se sabe a respeito desta espécie vegetal, já que na literatura científica não são encontrados artigos referentes a sua composição química e poucas descrições botânicas são apresentadas. Por esta razão, *Psychotria myriantha* torna-se uma importante fonte de estudo, na investigação taxonômica do gênero *Psychotria*.

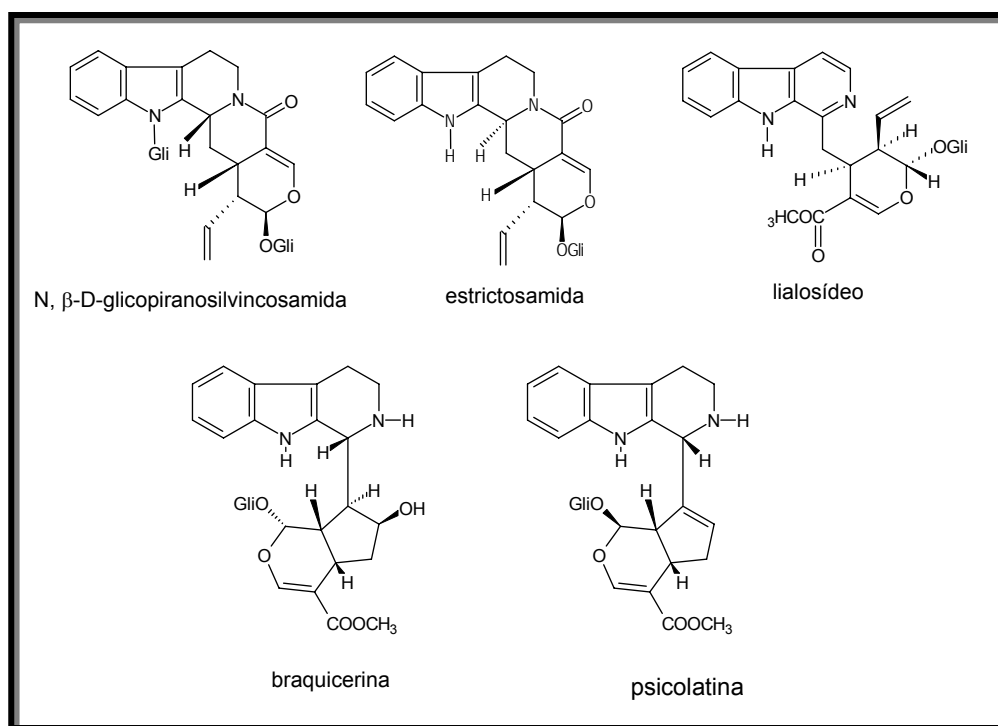


Figura 1.5: Alcalóides indol monoterpênicos isolados de espécies de *Psychotria* coletadas no sul do Brasil.

I.1.2. Atividades farmacológicas do gênero *Psychotria*

Psychotria é empregado na medicina popular em vários países no tratamento de diversas doenças (ADJIBADÉ, 1989). Vários alcalóides foram isolados e identificados a partir de espécies do gênero, demonstrando diversidade estrutural e um grande número de compostos ativos. Quadrigemina B, quadrigemina A, isopsicotridina C e psicotridina, isolados de *P. forsteriana*, apresentaram atividade inibidora dose - dependente sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por difosfato de adenosina (ADP), colágeno ou trombina (BERETZ, 1985). Extratos alcaloídicos de folhas de *P. forsteriana* mostraram potencial atividade citotóxica em linhagens de células de hepatoma de ratos e células leucêmicas humanas (ADJIBADÉ *et al.*, 1989). Dando seqüência aos estudos de citotoxicidade *in vitro*, ADJIBADÉ *et al.* (1990) testaram alcalóides polindólicos, encontrados em *P. oleoides*, *P. beccarioides* e *P. forsteriana*, contendo seis, sete e oito unidades triptamínicas, em células de hepatoma de ratos. Estes compostos apresentaram efeitos citotóxicos proporcionais ao aumento do peso molecular.

Em ensaios *in vitro* e *in vivo*, o extrato bruto de alcalóides de *P. oleoides*, caracterizado pela presença de alcalóides do tipo polindólico, demonstrou significativa influência sobre a secreção de hormônios hipofisários. O fracionamento bioguiado deste extrato permitiu o isolamento de psicoleína, que se mostrou capaz de interagir com os receptores de somatostatina, apresentando uma atividade antagonista na secreção de hormônio de crescimento em cultura de células hipofisárias (GUÉRITTE-VOEGELEIN *et al.*, 1992; RASOLONJANAHARY *et al.*, 1995). Psicotridina A, iso-psicotridina B, quadrigemina C (ADJIBADÉ, 1989), e quadrigemina B (MAHMUD *et al.*, 1993) apresentaram atividade antibiótica contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O composto dimérico Calicantina apresentou potente efeito convulsivante, comparável a estriquinina, atuando por um mecanismo de ação ainda não elucidado (ADJIBADÉ *et al.*, 1991).

O peptídeo cíclico, ciclopsicotrídeo, considerado o maior ciclopeptídeo isolado de uma fonte natural, apresentou atividade inibidora da neurotensina e estimulou o aumento dos níveis citosólicos de Ca^{+2} (WITHERUP *et al.*, 1994). Extratos orgânicos de *P. nigra* e *P. stenophylla* mostraram amplo espectro de atividade contra bactéria e fungos (JAYASINGHE *et al.*, 2002).

O gênero *Psychotria* possui inúmeras atividades farmacológicas descritas na literatura, dentre as quais se destaca a atividade sobre o sistema nervoso central. O interesse etnobotânico atribuído ao gênero *Psychotria* está no conteúdo de dimetiltriptamina apresentado por *P. viridis*, utilizada no preparo da bebida alucinógena “ayahuasca”, juntamente com *P. carthagenensis* e *Banisteriopsis caapi* (RIVIER e LINDGREEN, 1972; McKENNA *et al.*, 1984; WITHERUP *et al.*, 1994). Trata-se de uma decocção utilizada por nativos da Amazônia em rituais religiosos, para fins medicinais e sociais (LEAL e ELISABETSKY, 1996; FREEDLAND e MANSBACH, 1999).

Alcalóides como *N,N*-dimetiltriptamina (DMT), encontrado em *Psychotria viridis*, possuem ação alucinógena, principalmente quando associados a β -carbolinas, que inibem a enzima monoamino oxidase, impedindo a degradação da DMT administrada por via oral (McKENNA *et al.*, 1984; LIWSZYC *et al.*, 1992; LEAL e ELISABETSKY, 1996; FREEDLAND e MANSBACH, 1999).

Psychotria colorata, utilizada tradicionalmente por caboclos da Amazônia para o tratamento de dores de ouvido, dores abdominais e “dor” em geral, apresentou marcante atividade analgésica do tipo opióide, reversível por naloxona, quando testada frente aos ensaios das contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina e medida da retirada da cauda ao estímulo térmico (*tail flick*) (ELISABETSKY *et al.*, 1995). A análise fitoquímica do extrato de alcalóides totais, obtido a partir de flores desta espécie, permitiu o isolamento dos alcalóides pirrolidinoindolínicos (-) – calicantina, isocalicantina, (-) – quimonantina, hodgkinsina e quadrigemina E (VEROTTA *et al.*, 1998). Hodgkinsina mostrou efeito analgésico dose-dependente e reversível por naloxona em modelos de nocicepção e dor induzida por capsaicina (VEROTTA *et al.*, 2002).

Extratos etanólicos de *P. brachyceras*, *P. leiocarpa*, *P. myriantha* e *P. suterella*, nas doses de 100, 350 e 500 mg/kg, apresentaram atividade analgésica não dose-dependente e não reversível por naloxona, sugerindo uma ação inespecífica, quando testados pelo ensaio “tail flick”. Todos os extratos testados apresentaram um efeito hipotérmico (ELISABETSKY *et al.*, 1997). Em estudo posterior com o extrato de alcalóides totais de *P. suterella* e seu alcalóide isolado lialosídeo, De SANTOS (1999) verificou que a espécie não apresentou efeito

analgésico, mas tanto o extrato (100 mg/kg) quanto lialosídeo (30 mg/kg) apresentaram diminuição da atividade locomotora. Na dose de 300 mg/kg de extrato houve morte precedida por convulsões em 66% dos animais testados.

O extrato etanólico de *P. umbellata* demonstrou atividade analgésica dose - dependente e reversível por naloxona, indicando uma ação do tipo opióide (LEAL, 1994). Psicolatina, alcalóide indol monoterpênico majoritário de *P. umbellata* (KERBER, 1999), em modelos térmicos de nocicepção, produziu efeito dose-dependente, parcialmente reversível por naloxona, sugerindo participação de receptores do tipo opióide no seu mecanismo de ação. Em modelos de dor induzida por capsaicina, psicolatina demonstrou atividade analgésica dose-dependente (BOTH, 2001) e efeitos ansiolítico e antidepressivo (BOTH *et al.*, 2005).

Com exceção de *P. viridis* e *P. colorata*, as espécies encontradas no Brasil constituem o subgênero *Heteropsychotria*, caracterizado pela presença de alcalóides indol monoterpênicos. Embora inúmeras atividades ainda possam ser exploradas para *Heteropsychotria*, os trabalhos desenvolvidos por LEAL (1994), ELISABETSKY *et al.* (1997), De SANTOS (1999), BOTH (2001), BOTH *et al.* (2002a, 2002b, 2005 e 2006) sugerem que o sistema nervoso central está intensamente envolvido com as atividades biológicas dos alcalóides deste subgênero. Dessa forma, se faz necessário aprofundar os estudos relacionados à identificação dos alcalóides deste subgênero, visando investigar suas ações sobre a bioquímica cerebral, buscando elucidar mecanismos de ação e potenciais atividades dos mesmos. Com base nos dados apresentados, os objetivos enfocados neste capítulo são:

Objetivo Geral:

- Isolar e identificar os alcalóides majoritários presentes em *Psychotria myriantha* Müll. Arg. (RUABIACEAE).

Objetivos específicos:

- Obter extrato (s) de alcalóides a partir de partes aéreas de *P. myriantha*;
- Desenvolver um método de análise em CLAE, para a verificação do (s) perfil (is) cromatográfico (s) do (s) extrato (s) de alcalóides;
- Realizar o fracionamento do (s) extrato (s) e o isolamento dos compostos majoritários, empregando técnicas cromatográficas;
- Calcular os rendimentos percentuais do (s) extrato (s) e alcalóides isolados de *P. myriantha*;
- Efetuar a elucidação estrutural dos compostos isolados através do emprego de análises espectroscópicas e espectrométricas;
- Verificar a similaridade entre os alcalóides produzidos por *P. myriantha* e pelas demais espécies do subgênero *Heteropsychotria*, anteriormente estudadas.

I.2. MATERIAIS E MÉTODOS

I.2.1. Material Vegetal

Partes aéreas de *Psychotria myriantha* Müll. Arg. foram coletadas na Reserva Estadual do Turvo, município de Derrubadas (RS), por M. Sobral *et al.*, n. 8913, em 2002. Uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com número de ICN 124543.

I.2.2. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados na realização deste trabalho foram: cromatógrafo Waters 2690 acoplado a detector de arranjo de diodos Waters 996, Software Empower; cromatógrafo de líquido média pressão composto por Büchi 687 Gradient Former, Büchi chromatography pump B-688 e detector Knauer UV K2500; cromatógrafo Shimadzu LC-8A com detector Knauer UV, espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 20; cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas (CLAE/EM) com capturador de íons Finningan LCQ, com interface de ionização química à pressão atmosférica (APCI – *atmospheric pressure chemical ionization*), detector de arranjo de diodos (DAD) Hewlett-Packard Series 1100, polarímetro Perkin-Elmer 241, espectrômetro Varian Unity Inova 500 (500 MHz e 125 MHz). Coluna analítica Waters Symmetry C18 (3,5 µm; 4,6 x 7,5 mm), coluna analítica Nucleosil 100-5 C₁₈ AB (125 x 4.6 mm; 5 µm), coluna semipreparativa C18 com compressão radial Waters (Prep LC 25 mm module), coluna preparativa Waters Symmetry (7 µm; 19x150 mm), coletor de frações Gilson (FC204), concentrador Speedvac system.

I.2.3. Obtenção de extratos de alcalóides

Partes aéreas de *P. myriantha* foram secas à temperatura ambiente reduzidas a pó em triturador de facas. O material vegetal foi então submetido à maceração estática com etanol comercial, até o esgotamento do mesmo. Os extratos etanólicos resultantes foram concentrados em evaporador rotatório, para a eliminação do solvente, e retomados em solução aquosa de ácido clorídrico a 10%, para a obtenção dos alcalóides na forma de cloridratos. Em seguida, os extratos ácidos foram lavados com diclorometano, para a eliminação das resinas, graxas e demais substâncias apolares. As fases orgânicas foram desprezadas e as fases aquosas alcalinizadas a pH 9 - 10 com hidróxido de amônio. Posteriormente, as fases aquosas alcalinas foram exaustivamente extraídas com diclorometano e os extratos orgânicos resultantes, concentrados à secura em evaporador rotatório, para a obtenção do extrato diclorometano de alcalóides (EDA). A fase aquosa alcalina restante continuou apresentando resultado positivo no teste de precipitação de alcalóides com reagente de Bertrand, e foi extraída com n-butanol até resultado negativo frente a este reagente, obtendo-se assim, o extrato butanólico de alcalóides (EBA) (fig. I.6).

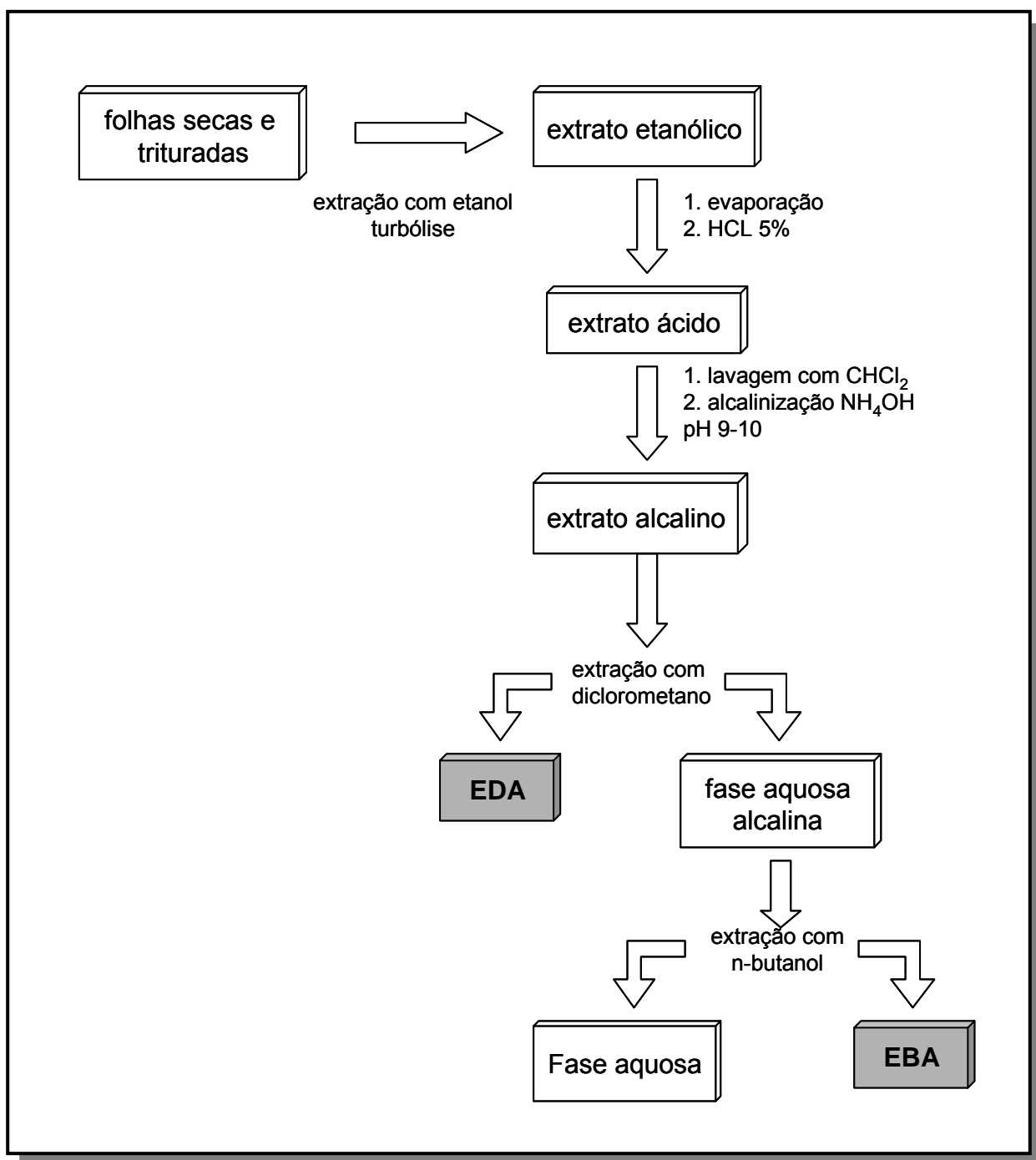


Figura I.6: Esquema de obtenção dos extratos de alcalóides de *P. myriantha*, empregando o método clássico de extração ácido-base. EDA: extrato diclorometano de alcalóides. EBA: Extrato butanólico de alcalóides.

I.2.4. Avaliação dos perfis cromatográficos

I.2.4.1. Extrato diclorometano de alcalóides de *P. myriantha* (EDA)

A fração de alcalóides obtida por extração das partes aéreas de *P. myriantha* com diclorometano (EDA) foi submetida à análise cromatográfica preliminar para observação de seu perfil cromatográfico e dos espectros dos compostos majoritários na região do ultravioleta ($\lambda = 280$ nm). EDA foi analisado em cromatógrafo líquido acoplado a detector de arranjo de diodos com acumulação de 200 a 400 nm, utilizando uma coluna analítica Waters Nova Pak C18 (4 μ m; 3,9 x 150 mm), guarnecida com pré-coluna, submetida a gradiente linear de metanol e água com fluxo de 1,0 mL/min (tab. I.1).

Tabela I.1: Gradiente linear empregado na análise preliminar de EDA.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Metanol (%)	Água (%)
0	1	30	70
30	1	100	0

I.2.4.2. Extrato *n*-butanólico de alcalóides de *P. myriantha* (EBA)

O extrato resultante da extração da fase aquosa alcalina com *n*-butanol (EBA) foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD), para verificação dos perfis de seus componentes e identificação de espectros de ultravioleta característicos de cromóforos indólicos. Para tanto, um gradiente linear de metanol e água foi aplicado a uma coluna C18 (3,5 μ m; 4,6 x 75 mm), com fluxo de 0,5 mL/min, conforme tabela I.2.

Tabela I.2: Gradiente linear utilizado na análise preliminar de EBA.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Metanol (%)	Água (%)
0	0,5	10	90
30	0,5	100	0

I.2.5. Isolamento e purificação de alcalóides

I.2.5.1. Extrato diclorometano de alcalóides de *P. myriantha* (EDA)

Após a observação dos cromatogramas preliminares e dos espectros de ultravioleta de seus componentes majoritários, EDA foi submetido a CLAE/UV, semipreparativa, permitindo a obtenção de frações enriquecidas de alcalóides. O fracionamento do extrato foi realizado em cromatógrafo líquido Perkin Elmer S200, empregando coluna composta por módulo de compressão radial Waters PrepLC e cartucho Waters PrepPak C18 (25 x 100 mm). A fase móvel foi constituída por metanol (MeOH) e água, aplicados em gradiente linear, com fluxo de 10 mL/min e detector ajustado em um comprimento de onda de 280 nm (tab. I.3).

Tabela I.3: Gradiente linear utilizado no fracionamento de EDA.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Metanol (%)	Água (%)
0	10	30	70
20	10	100	0
5	10	100	0

I.2.5.2. Extrato *n*-butanólico de alcalóides de *P. myriantha* (EBA)

Após a determinação dos parâmetros cromatográficos, o fracionamento de EBA foi realizado em cromatógrafo líquido de média pressão (CLMP) acoplado à detecção UV ($\lambda = 280 \text{ nm}$), utilizando coluna preenchida com sílica Lichroprep C18 (Merck). A fase móvel foi aplicada em modo isocrático e foi composta por uma solução contendo metanol e água (30:70) em modo isocrático, com fluxo de 10 mL/min. Os picos majoritários foram coletados separadamente, concentrados em evaporador rotatório, liofilizados e cromatografados por CLAE/DAD, para verificação de seus perfis e pureza. Uma vez que se trata de produtos pouco estáveis, uma amostra do extrato EBA foi enviada para o Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de Genebra (Genebra – Suíça), e foi submetido aos mesmos procedimentos, para a realização das análises espectroscópicas e espectrométricas, além de rotação óptica.

EBA foi analisado por CLAE/UV/EM, equipado com uma interface APCI, para a determinação dos espectros de massas dos picos principais. Foi utilizada coluna analítica Nucleosil C₁₈ (5 μm ; 4.6 x 250mm), com metanol : H₂O : trietilamina 2 mM, de acordo com o gradiente apresentado na tabela I.2.

O extrato foi fracionado em CLAE semipreparativa, com coluna C₁₈ Symmetry prep (7 μm , 19 x 150mm) e modo isocrático, com fase móvel constituída por MeOH : H₂O: trietilamina 2 mM (30:70 V/V) e fluxo de 10 ml / min. Os picos majoritários foram coletados separadamente, processados e submetidos a análises espectroscópicas (¹H, ¹³C e 2D RMN, dimetilsulfóxido -DMSO) para a elucidação estrutural.

I.3. RESULTADOS

I.3.1. Avaliação dos perfis cromatográficos

I.3.1.1. Extrato diclorometano de alcalóides de *P. myriantha* (EDA)

A análise cromatográfica preliminar de EDA permitiu a visualização de oito picos principais, sendo que a avaliação dos espectros de ultravioleta indicou a existência de sobreposição de substâncias em alguns deles. Apesar da complexidade do extrato, os perfis espectrais dos picos 5 e 6, com tempos de retenção 9.6 e 12.5 minutos respectivamente, foram característicos para o grupamento cromóforo de alcalóides indol monoterpênicos, com absorções máximas em torno de 220 e 280 nm (fig. I.7).

I.3.1.2. Extrato n-butanólico de alcalóides de *P. myriantha* (EBA)

O cromatograma de EBA demonstrou a presença de apenas dois picos, com tempos de retenção de 8,59 (**EBA1**) e 9,43 minutos (**EBA2**), sendo que ambos apresentaram espectros de UV característicos de indol monoterpênicos (fig. I.8).

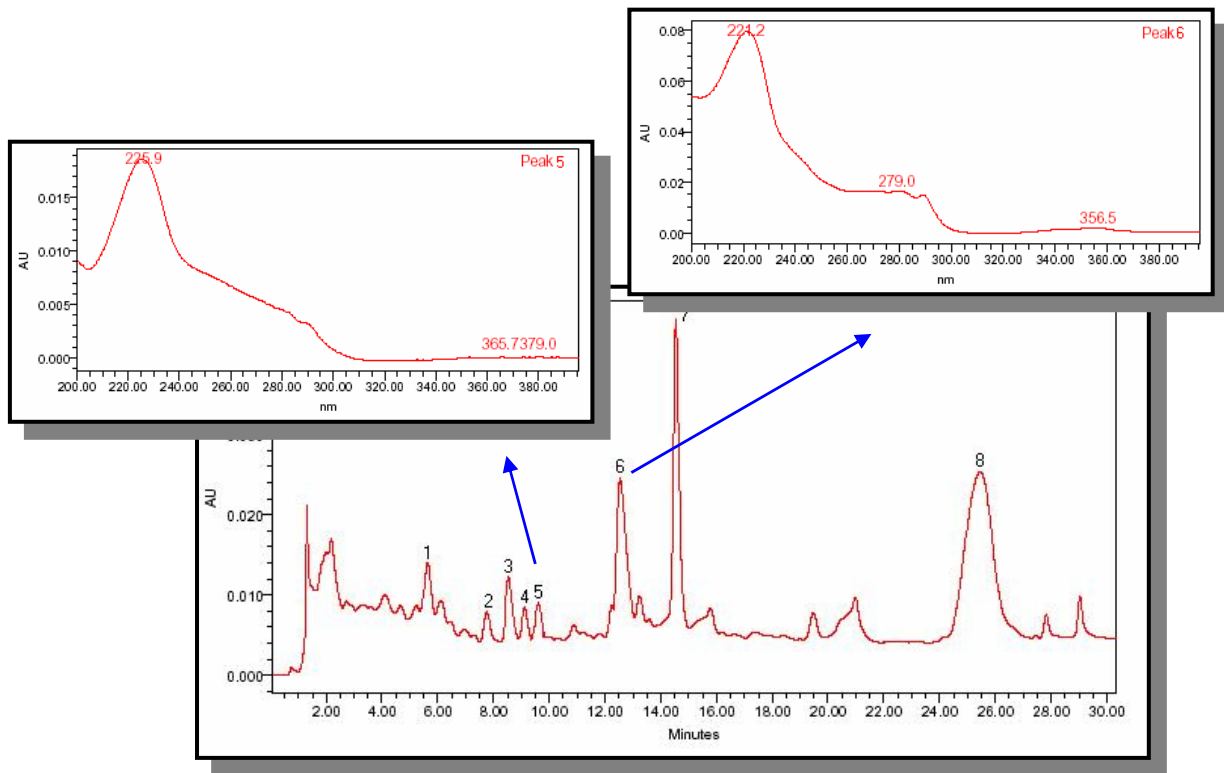


Figura I.7: Cromatograma preliminar de EDA; CLAE/DAD, $\lambda = 280$ nm; coluna Nova Pak C_{18} ($4 \mu\text{m}$; $3,9 \times 150$ mm); apresentando os perfis de UV típicos de alcalóides indol monoterpênicos glicosilados para os picos 5 e 6, com absorções máximas em torno de 220 e 280 nm.

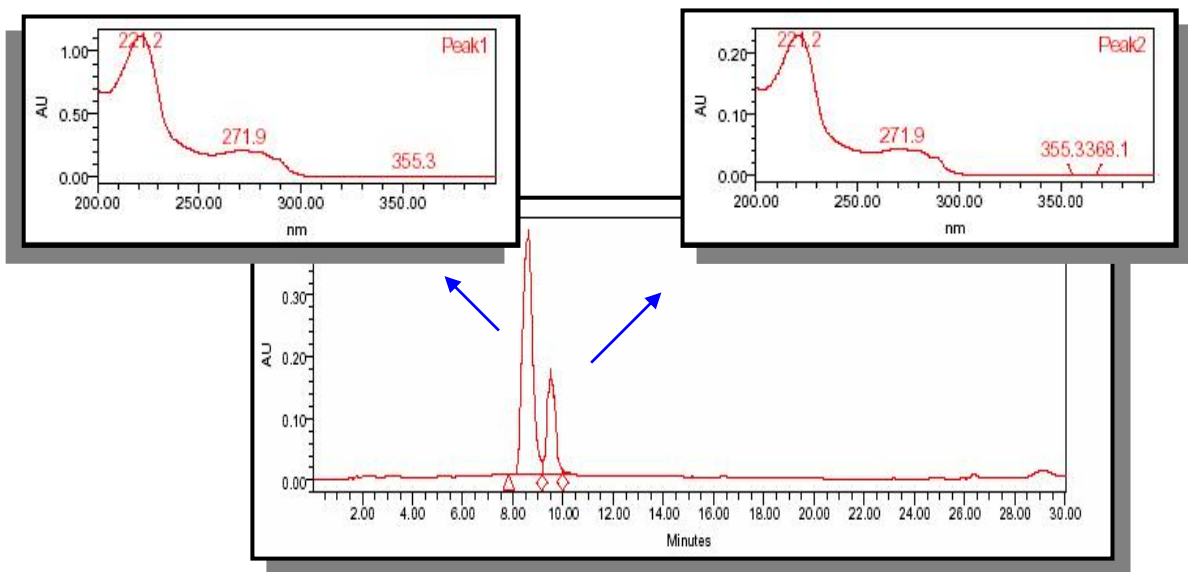


Figura I.8: Perfil cromatográfico em análise por CLAE/DAD, $\lambda = 280$ nm, coluna Symmetry C_{18} ($3,5 \mu\text{m}$, $4,6 \times 75$ mm) para EBA, com presença de dois picos com tempos de retenção 8,5 (EBA1) e 9,45 (EBA2) minutos, respectivamente e espectros de UV com característicos de alcalóides indol momoterpênicos, com absorções máximas em torno de 220 e 280 nm.

No Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica da Universidade de Genebra, EBA foi analisado por CLAE/UV/EM, empregando coluna analítica Nucleosil C₁₈ (5 μm, 4.6 x 250 mm) e o cromatograma resultante é apresentado na figura I.9, confirmando os resultados previamente obtidos. A análise espectrométrica por CLAE/UV/EM, com interface de ionização química à pressão atmosférica (APCI), indicou o íon molecular em *m/z* 517.1 para **EBA1** e *m/z* 531 para **EBA2** (fig. I.10).

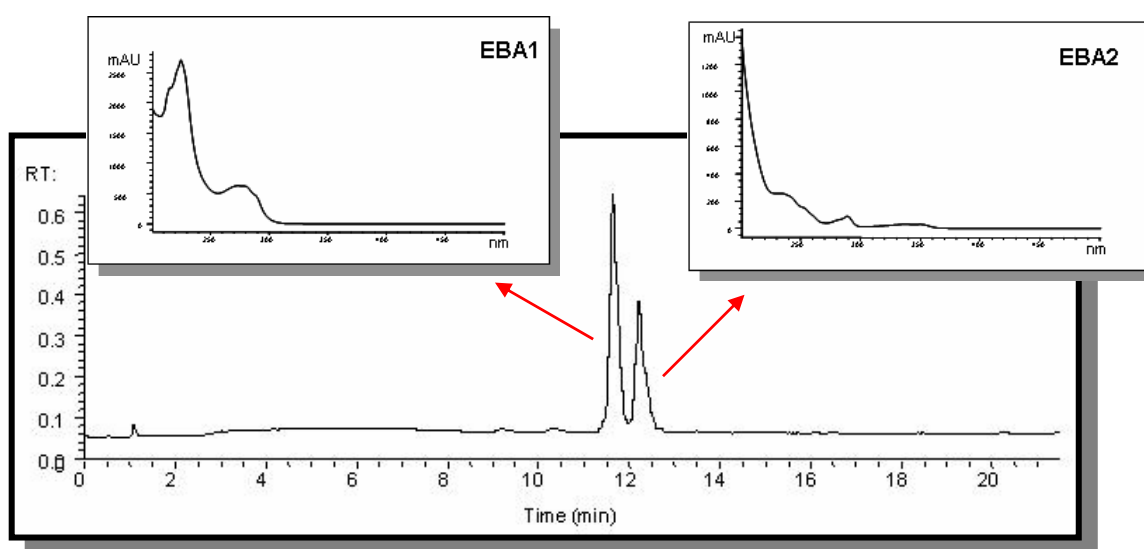


Figura I.9: Perfil cromatográfico de EBA em análise por CLAE/UV/EM, $\lambda = 254$ nm; coluna Nucleosil C₁₈ (5 μm, 4.6 x 250mm).

A rotação óptica $[\alpha]_D$ dos compostos foi determinada em polarímetro Perkin Elmer 241, utilizando metanol como solvente e 25 °C. **EBA1** (6 mg/mL) apresentou $[\alpha]_D^{25} = -143,14$; enquanto **EBA2** (10 mg/mL) resultou em $[\alpha]_D^{25} = -80,88$.

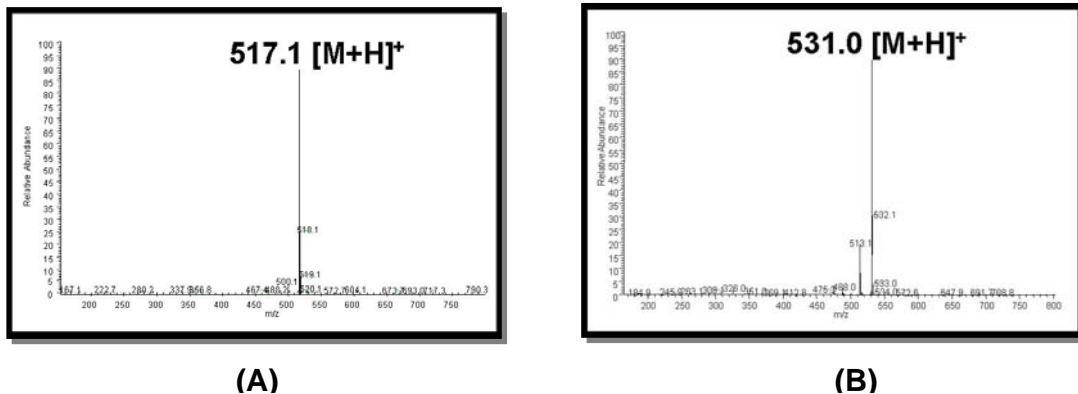


Figura 1.10: Espectros de massas obtidos por CLAE/UV/EM, $\lambda = 254 \text{ nm}$; (A) EBA1; (B) EBA2.

I.3.2. Isolamento e purificação de alcalóides

I.3.2.1. Extrato diclorometano de alcalóides de *P. myriantha* (EDA)

O fracionamento de EDA foi realizado por CLAE/UV, com coluna semipreparativa. Foram realizadas sucessivas injeções de 180 μL de solução de EDA dissolvido em uma mistura de metanol e água (30:70 V/V), na concentração de 20 mg/mL. A partir do cromatograma resultante, foram determinados oito picos principais, que foram coletadas separadamente e denominadas como frações PM1 a PM8 (fig. I.11).

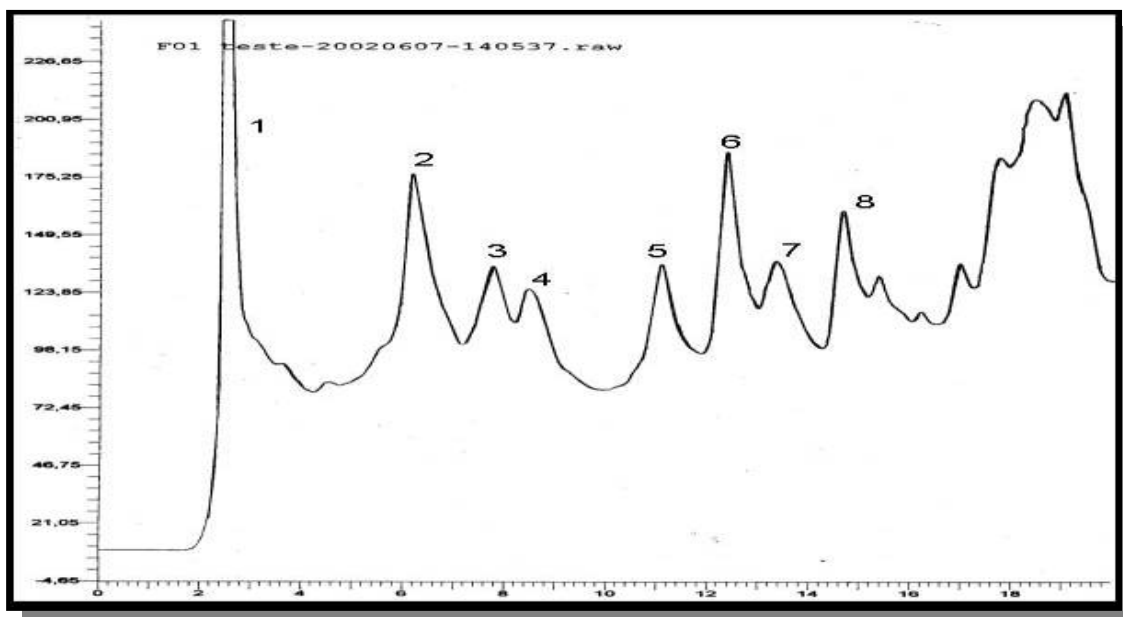


Figura I.11: Cromatograma de EDA em CLAE/UV semi-preparativo, $\lambda = 280\text{nm}$; picos de 1 a 8 correspondem às frações PM 1 a 8 coletadas isoladamente.

As oito frações isoladas apresentaram baixo rendimento, sendo que as únicas a atingirem quantidades em torno de 10 mg foram **PM2** e **PM5**. Ambas as frações apresentaram perfis de UV com cromóforos típicos para alcalóides indol monoterpênicos (fig. I.12).

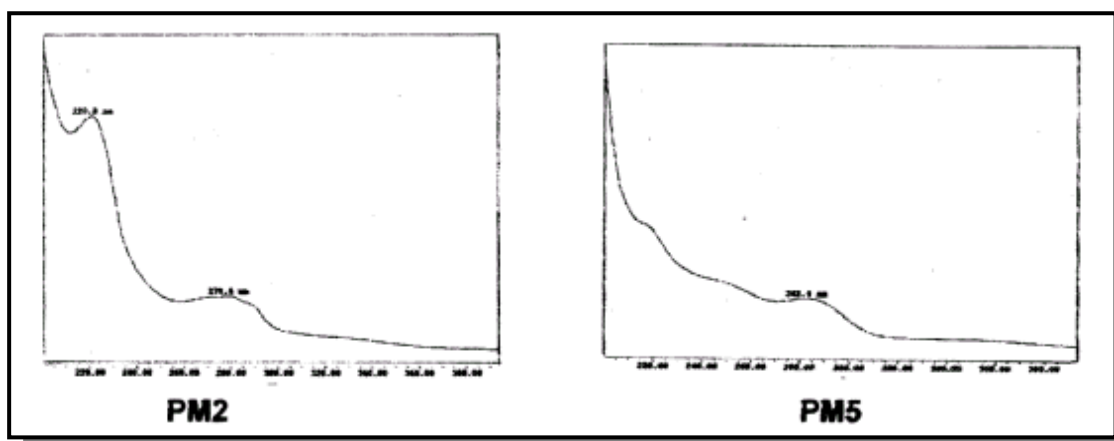


Figura I.12: Espectros de UV das frações PM2 e PM5, $\lambda = 280\text{nm}$.

As quantidades obtidas dos alcalóides isolados foram insuficientes para a realização de análises espectroscópicas completas. Somente foi possível a aquisição do espectro de H^1 RMN para **PM2**, mesmo assim apresentando baixa resolução decorrente presença de umidade e impurezas ainda contidas na amostra. Além de seu rendimento reduzido, as frações isoladas demonstraram grande instabilidade refletida na sua degradação durante a manipulação e realização das análises. Por essa razão, **EDA** e as alíquotas resultantes de seu fracionamento foram mantidos em frasco lacrado, em atmosfera de nitrogênio, protegido contra a luz e acondicionado em *freezer* (- 20 °C).

A análise do espectro de H^1 RMN da fração **PM2** permitiu a observação dos sinais característicos no núcleo indólico, apesar de sua baixa resolução. Através da comparação dos espectros (fig. I.13) foi possível verificar a presença de sinais semelhantes aos do alcalóide strictosamida, já descrito e isolado em espécies de *Psychotria*.

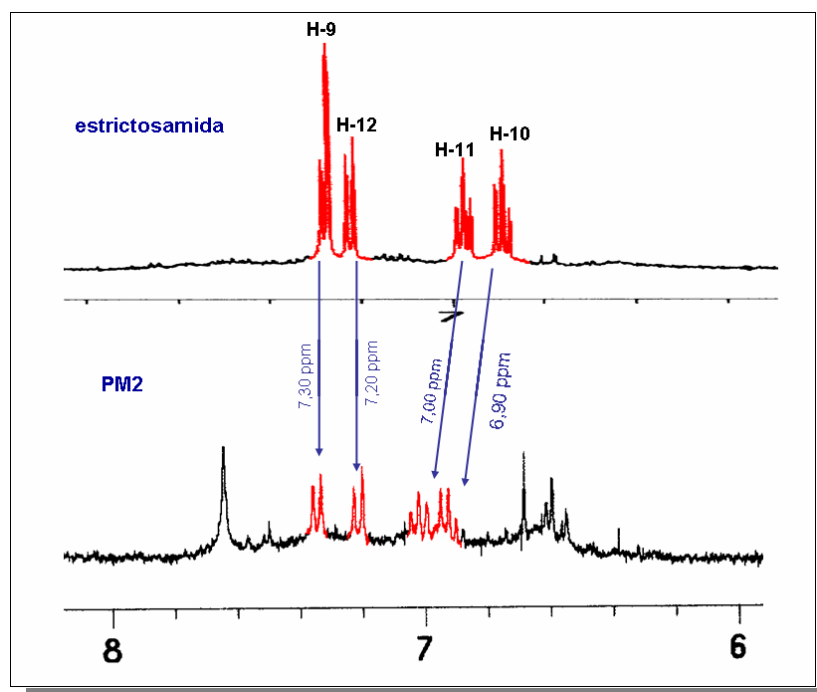


Figura I.13: Ampliação e comparação dos sinais presentes na faixa correspondente à região de hidrogênios aromáticos nos espectros de H^1 RMN para strictosamida e PM2 (CD_3OD , 500 MHz), demonstrando a presença de dubletos em 7,2 e 7,3 ppm e tripletos em 6,9 e 7,0 ppm em ambos os espectros.

Os espectros de UV de PM2 e dos picos 5 e 6 de EDA foram comparados, sendo que o espectro de PM2 e o pico número 5 apresentarem perfis semelhantes entre si e, também com a estrictosamida (fig. I.14).

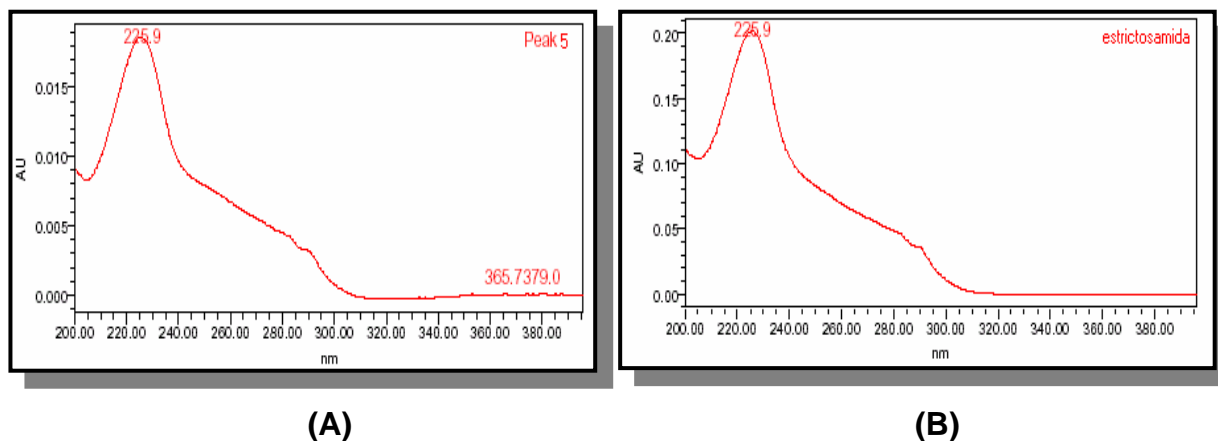
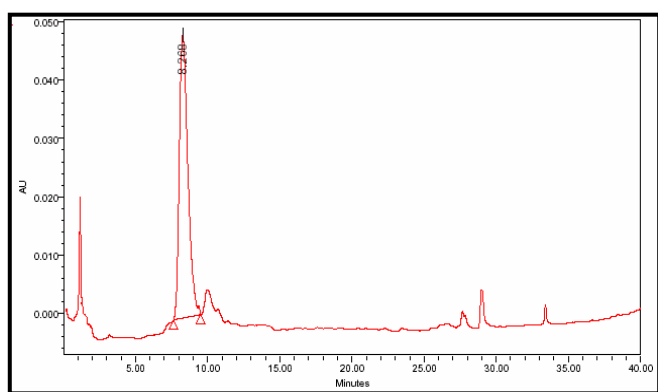
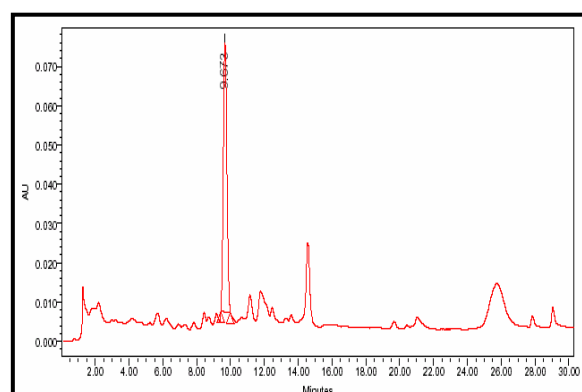


Figura I.14: Comparação dos espectros UV de (A) pico 5 do cromatograma de EDA e (B) amostra autêntica de estrictosamida.

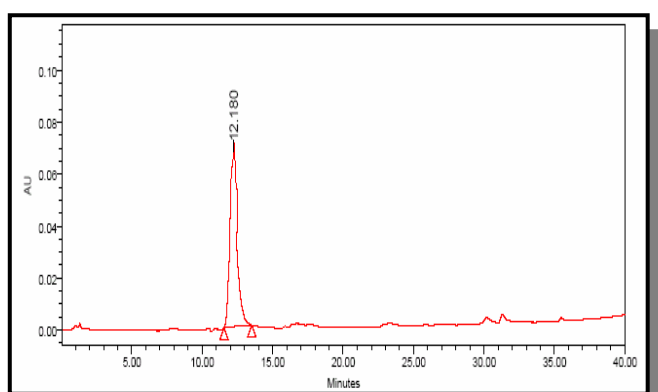
Para confirmar a presença de estrictosamida em **EDA**, o alcalóide foi submetido a exame cromatográfico, sob as mesmas condições empregadas para o extrato, sendo que o mesmo procedimento foi empregado para seu epímero vincosamida, para verificar se ambos não possuíam o mesmo tempo de retenção (fig. I.15). Adicionalmente, foi realizada uma co-injeção com **EDA** e a amostra autêntica do alcalóide estrictosamida, que resultou em um aumento na intensidade do pico 5 no tempo de retenção 9,6 minutos (fig. I.16).



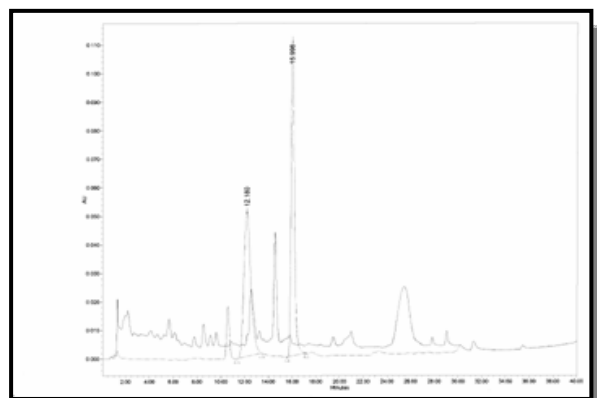
estrictosamida



EDA + estrictosamida



vincosamida



Vincosamida + EDA

Figura I.15: Cromatogramas resultantes da avaliação do alcalóide indol monoterpênico estrictosamida, uma mistura de EDA e estrictosamida, vincosamida e a sobreposição dos cromatogramas de EDA e vincosamida CLAE/DAD, $\lambda = 280 \text{ nm}$; coluna Nova Pak C_{18} ($4 \mu\text{m}$, $3,9 \times 150 \text{ mm}$).

Os resultados obtidos com as avaliações cromatográficas e o espectro de H^1 RMN de **PM2** permitiram identificar o alcalóide isolado do extrato diclorometano (EDA) de folhas de *P. myriantha* como sendo estrictosamida (fig. I.16).

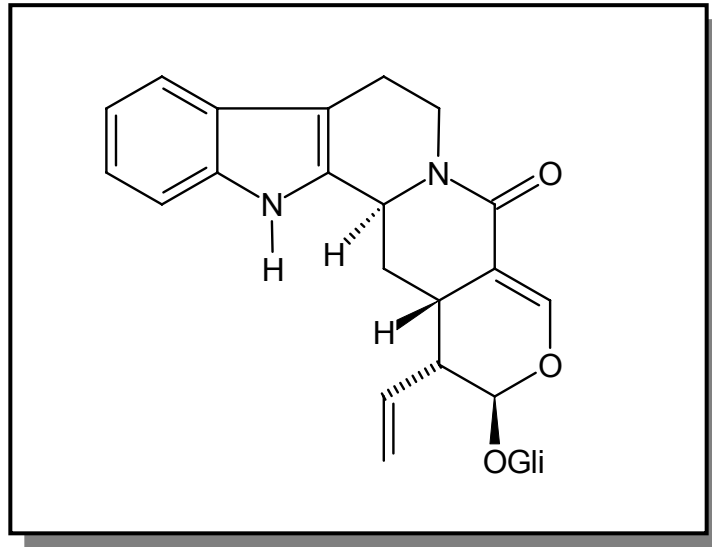


Figura I.16: Estrutura do alcalóide strictosamida.

I.3.2.2. Extrato n-butanólico de alcalóides de *P. myriantha* (EBA)

O extrato butanólico de *P. myriantha* demonstrou ser constituído por dois componentes majoritários, que foram fracionados por CLMP em modo isocrático, acoplado a detector UV com comprimento de onda ajustado em 280 nm. As duas frações coletadas, **EBA1** e **EBA2**, foram evaporadas à secura e analisadas por CLAE/DAD, para verificação dos perfis cromatográficos e pureza. As frações foram analisadas empregando uma mistura de metanol e água (40:60 V/V), em modo isocrático e coluna Waters Symmetry C18 (3,5 µm; 4,6 x 250 mm).

O cromatograma de **EBA1** apresentou um único pico, com tempo de retenção em torno de 11 minutos, indicando que a fração corresponde a somente um produto, de acordo com as investigações preliminares do extrato. A pureza do composto isolado foi verificada através da análise de espectros UV, resultantes a varredura em diferentes comprimentos de onda (fig. I.17).

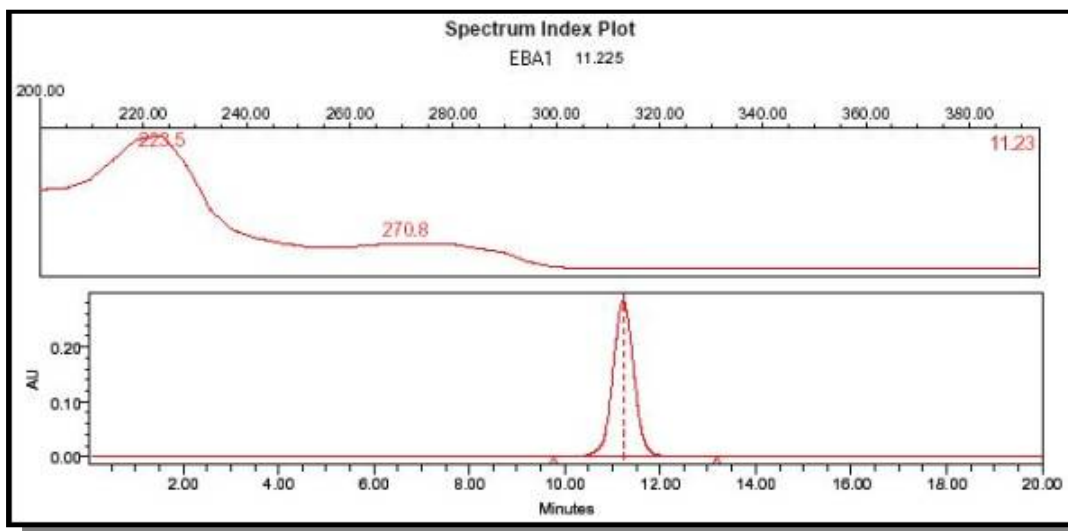


Figura I.17: Cromatograma de **EBA1** em CLAE/DAD, $\lambda = 280\text{nm}$.

De acordo com os dados obtidos pela investigação cromatográfica e varredura na região do ultravioleta, o extrato butanólico seria constituído por dois compostos majoritários com cromóforos indólicos. O cromatograma resultante do exame de **EBA2** apresentou dois picos com tempos de retenção em 13 e 16 minutos. O primeiro pico apresentou espectro UV característico de alcalóides indol monoterpenos, como visto na análise inicial de **EBA**; enquanto o segundo pico apresentou espectro com perfil bastante diferenciado do primeiro (fig. I.18).

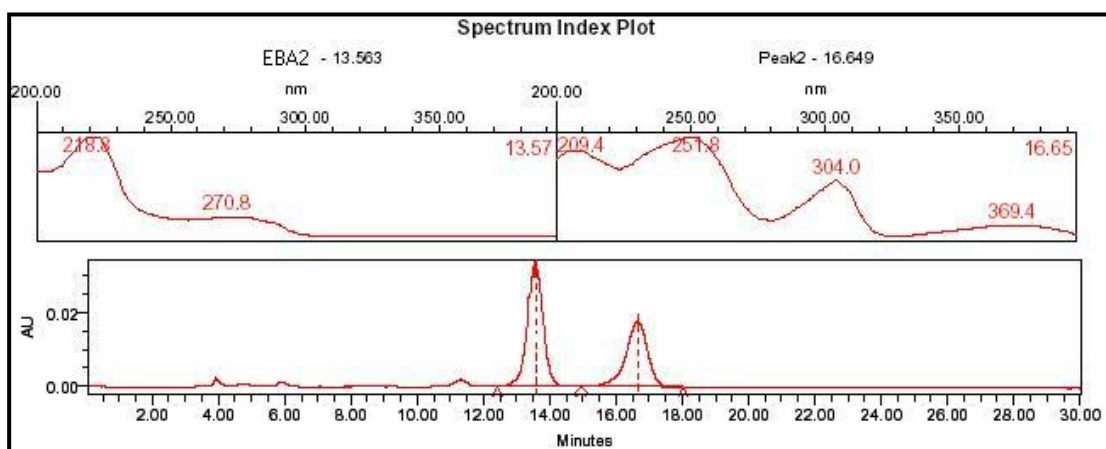


Figura I.18: Cromatograma de **EBA2** em CLAE/DAD, $\lambda = 280\text{nm}$.

I.3.3. Rendimentos dos extratos de alcalóides totais e frações isoladas

O rendimento dos extratos EDA e EBA de *P. myriantha*, em relação às folhas secas, foram de 0,08 e 3,1% respectivamente. O rendimento percentual das frações isoladas de ambos os extratos é apresentado na tabela I.4.

Tabela I.4: Rendimento de extratos de alcalóides e frações isoladas de *P. myriantha*.

Extrato de alcalóides	(%)	Frações	(%)
EDA	0,08	PM2	0,004
		PM5	0,002
EBA	3,1	EBA1	0,1
		EBA2	0,04

I.3.4. Caracterização e identificação dos alcalóides isolados de *P. myriantha*

I.3.4.1. EBA1

O composto **EBA1** apresentou-se como um sólido amorfo, $[\alpha]_D^{25} - 143.14^\circ$ (*c* 0.1, MeOH), cuja presença de um pico a 518,1 $[M+H]^+$ no espectro de massas (fig. I.10), permitiu determinar a massa molecular, correspondendo à fórmula $C_{26}H_{33}N_2O_9$. Os dados espectroscópicos referentes à **EBA1** são apresentados na tabela I.5.

Os resultados espectroscópicos obtidos para **EBA1** foram comparados com os dados da literatura. Os sinais referentes ao esqueleto indólico foram identificados no H^1 RMN (fig. I.19), como dois dubletos e dois tripletos na região aromática. A presença de uma unidade de glicose foi caracterizada pelos sinais peculiares de H^1 e C^{13} RMN. As correlações do espectro de HMBC apontam C-21 como o carbono onde ocorre a ligação do açúcar.

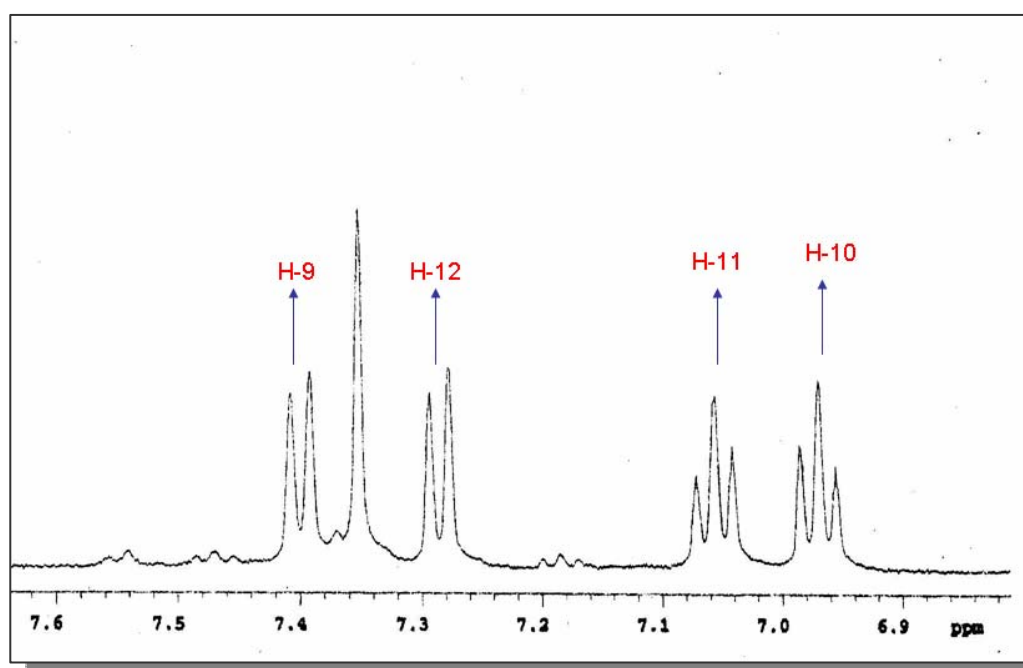


Figura I.19: Ampliação do espectro H^1 RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz; tetrametilsilano como padrão interno) para **EBA1**, apresentando os sinais característicos do núcleo indólico na região aromática.

Tabela I.5: Dados de ^1H , C^{13} , COSY, HSQC e HMBC para **EBA1** isolado de *P. myriantha* (^1H , COSY, HSQC e HMBC, 500 MHz; C^{13} , 125 MHz; DMSO-d_6 ; tetrametilsilano como padrão interno).

^1H	Multiplicidade	Atribuição	COSY	^{13}C	HSQC	Atribuição	HMBC
1,95		H-14		19,2	19,2 / 2,73	C-6	
2,2		H-14		31,8	31,8 / 2,9	C-15	
2,6		H-20	H-20 / H-21	33,7	33,7 / 1,95 / 2,2	C-14	
2,73		H-6		40		C-5	
2,9		H-15 / H-3'		44,3	44,3 / 2,6	C-20	C-20 / H-19 / H-18 b / H-18 a
2,92		H-5 / H-6		49,6	49,6 / 4,10	C-3	C-3 / H-5 / H-6
3,1		H-2'		61	61 / 3,5 / 3,7	C-6'	
3,2		H-4'		69,8		C-2'	
3,5		H-6' a		73,1		C-3'	
3,7	d	H-6' b		76,5		C-5'	
4,1		H-3		77,2		C-4'	
4,12		H-5'		95,1	95,1 / 4,63	C-21	C-21 / H-19 / H-1'
4,63	d	H-1'		98,9		C-1'	C-1' / H-21 / H-3'
5,13	d	H-18 a	H-18 a / H-19	106		C-7	
5,3	d	H-18 b	H-18 b / H-19	111,5	11,5 / 7,29	C-12	C-12 / H-10
5,62	d	H-21		113,4		C-16	
5,76	m	H-19		117,8	117,8 / 7,41	C-9	C-9 / H-10
6,97	t	H-10	H-10 / H-9	117,8	117,8 / 5,13 / 5,3	C-18	
7,05	t	H-11	H-11 / H-12	118,7	118,7 / 6,97	C-10	C-10 / H-12
7,29	d	H-12		121,2	121,2 / 7,05	C-11	C-11 / H-9
7,38	s	H-17		126,1		C-8	C-8 / H-12 / H-10
7,41	d	H-9		132,3		C-2	
				135,6		C-19	C-19 / H-21 / H18 b
				135,8		C-13	
				150		C-17	
				170		C-22	

A avaliação dos espectros de H^1 e C^{13} RMN para **EBA1**, além dos espectros de correlação COSY, HMBC e HSQC, e sua comparação com dados da literatura permitiram a elucidação estrutural e a identificação do composto como sendo o alcalóide indol monoterpênico ácido strictosidínico (fig. I.20).

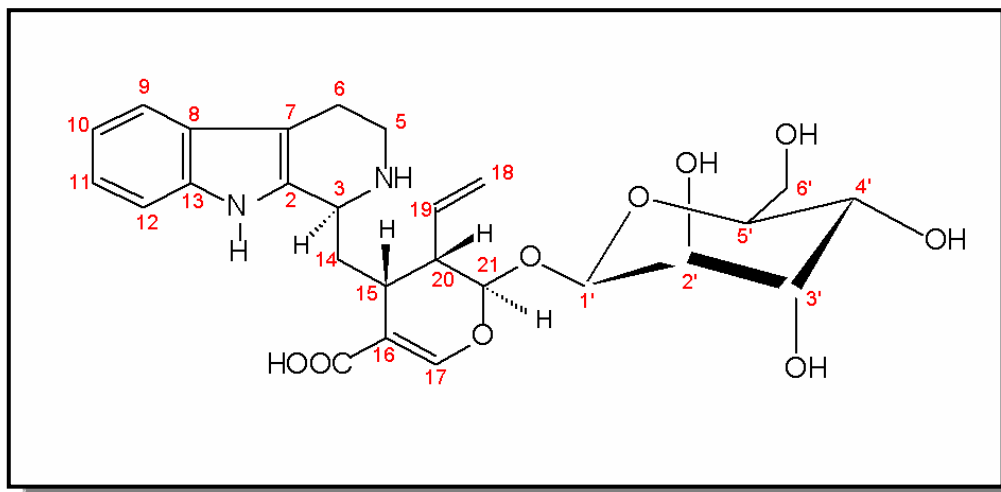


Figura I.20: Estrutura do alcalóide indol monoterpênico **EBA1**, identificado como ácido strictosidínico.

I.3.4.2. **EBA2**

O composto **EBA2** foi isolado como um sólido amorfo $[\alpha]_D^{25} - 80.8^\circ$ (c 0.1, MeOH). O espectro de massas para **EBA2** mostrou um pico em m/z 532,1 $[M+H]^+$, que indica massa unitária de 531 (fig. I.10), correspondendo à fórmula $C_{27}H_{35}N_2O_9$, sugerindo a presença de um grupamento metila adicional em comparação com **EBA1**.

Os dados espectroscópicos referentes à **EBA2** são apresentados na tabela I.6. No espectro de H^1 RMN, a existência do anel indólico foi confirmada pelos sinais típicos, dois dubletos e dois tripletos entre δ_H 6,5 e 8,5 ppm, correspondente à região aromática. Observou-se além destes, a presença de dois dubletos nesta região, em δ_H 7,93 e 8,23 ppm (fig. I.21), que estendem o cromóforo indólico.

A molécula de secologanina foi identificada pela análise dos espectros de COSY e HMBC. Os espectros de H^1 e C^{13} RMN apresentaram sinais com deslocamentos característicos do radical metila, que teve sua presença confirmada pela correlação destes sinais no HSQC. As correlações entre os sinais em δ_H 1,0 e δ_C 118,9 pelo HMBC indicaram a ligação da metila na posição C-20, demonstrando uma abertura no anel secologanina ligado ao esqueleto indólico.

O espectro de HMBC para **EBA2** (fig. I.35) aponta a ligação de uma molécula de açúcar na posição C-21. Os experimentos bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) proporcionaram a identificação do açúcar como sendo β -glicose.

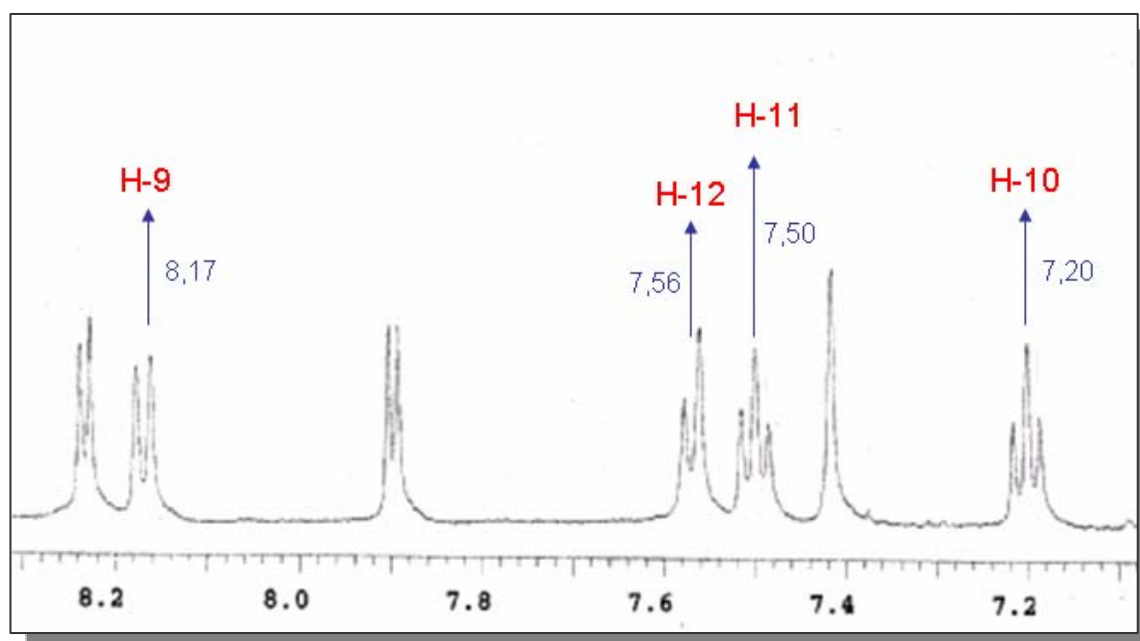


Figura I.21: Ampliação do espectro H^1 RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz; tetrametilsilano como padrão interno) para **EBA2**, apresentando os sinais característicos do núcleo indólico na região aromática, com respectivos deslocamentos químicos em ppm.

Tabela I.6: Dados espectroscópicos para o composto **EBA2** (RMN ^1H , 500 MHz; RMN ^{13}C , 125 MHz; DMSO- d_6 ; tetrametilsilano como padrão interno).

^1H	Multiplicidade	Atribuição	^{13}C	HSQC	Atribuição
1	t	H-23	10,4	10,4 / 1,0	C-23
1,25	s	H-15	30	30,5 / 1,25	C-15
2,6	m	H-20	45,5	45,5 / 2,6	C-20
2,7	m	H-14	45,6	45,6 / 2,7	C-14
3		H-2'	48,5	48,5 / 3,11	C-3
3,1		H-3'	61	61 / 3,41 / 3,7	C-6
3,11		H-3	69,9	69,9 / 3,1	C-3'
3,2		H-4'	73	73 / 3	C-2'
3,41		H-6' □	76,8	76,8 / 4,1	C-5'
3,7	t	H-6' □	77,3	77,3 / 3,2	C-4'
4,1		H-5'	95,4	95,4 / 5,47	C-21
4,5	d	H-1'	98,6	98,6 / 4,5	C-1'
4,6	d	H-18 a	111,8	111,8 / 7,9	C-6
4,8	d	H-18 b	112		C-16
5,47	d	H-21	112,5	112,5 / 7,56	C-12
5,7	m	H-19	118,9	118,9 / 7,2	C-10
7,2	t	H-10	121		C-7
7,4	s	H-17	121,5		C-8
7,5	t	H-11	126,6	126,6 / 8,17	C-9
7,56	d	H-12	127,5	127,5 / 7,5	C-11
8,17	d	H-9	134,5	134,5 / 5,7	C-19
8,23	d	H-5	134,8		C-2
			137	137 / 8,23	C-5
			140,2		C-13
			151	151 / 7,4	C-17
			170		C-22

A análise dos dados espectroscópicos obtidos para **EBA2**, permitiu a elucidação estrutural de um alcalóide indol monoterpênico ainda não descrito na literatura, denominado como miriantosína (fig. I.22).

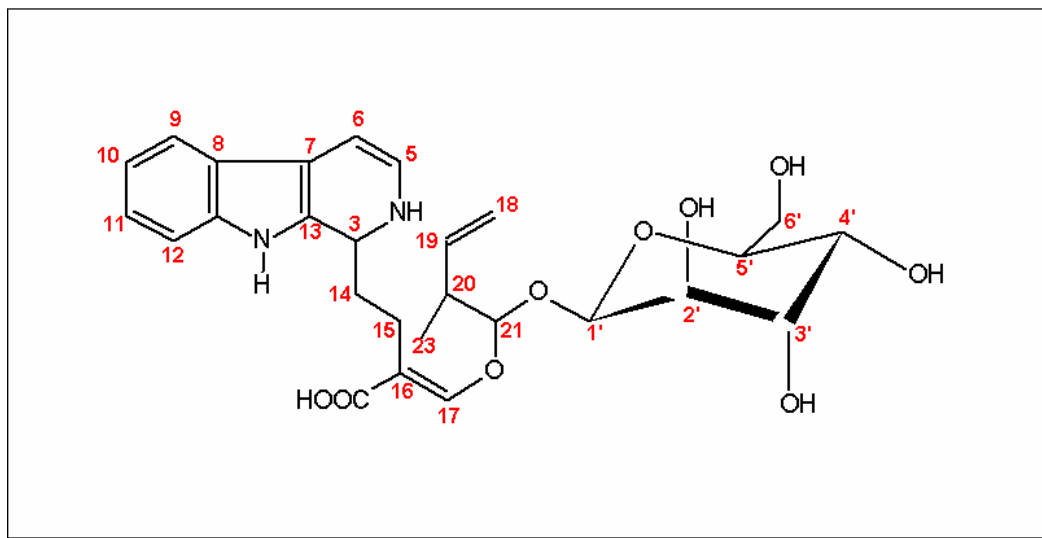


Figura I.22: Estrutura de **EBA2**, alcalóide identificado como miriantosina.

I.3.5. Extrato metanólico bruto de folhas frescas de *P. myriantha*

Uma análise cromatográfica do extrato bruto de folhas frescas de *P. myriantha* foi realizada com o objetivo de verificar se os alcalóides ácido strictosidínico e miriantosina estavam presentes no vegetal *in natura*, provenientes de seu metabolismo secundário, ou se correspondiam a artefatos originados durante os procedimentos de extração e purificação. Folhas frescas do material vegetal foram extraídas por maceração em metanol e cromatografadas diretamente por CLAE/DAD, utilizando coluna Waters Symmetry C18 (4,6 x 7,5 mm, 5 μ m) e λ =280 nm (tabela I.7).

Tabela I.7: Gradiente linear utilizado para avaliação cromatográfica do extrato metanólico bruto de folhas de *P. myriantha*.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Metanol (%)	Água (%)
0	0,5	20	80
30	0,5	100	0

Foram identificados três picos majoritários, sendo que apenas dois destes apresentaram cromóforos característicos do anel indólico. A comparação dos perfis dos espectros UV dos picos constituintes do extrato metanólico bruto e dos alcalóides isolados e a realização de co-injeções do extrato bruto com estes compostos, permitiram a identificação dos componentes majoritários como sendo ácido strictosidínico e miriantosina (fig. I.23). Dessa forma, verificou-se que os alcalóides isolados do extrato n-butanólico de folhas de *P. myriantha* estão presentes no vegetal e não constituem artefatos formados durante os processos de extração, com passagem ácido-base, isolamento e purificação.

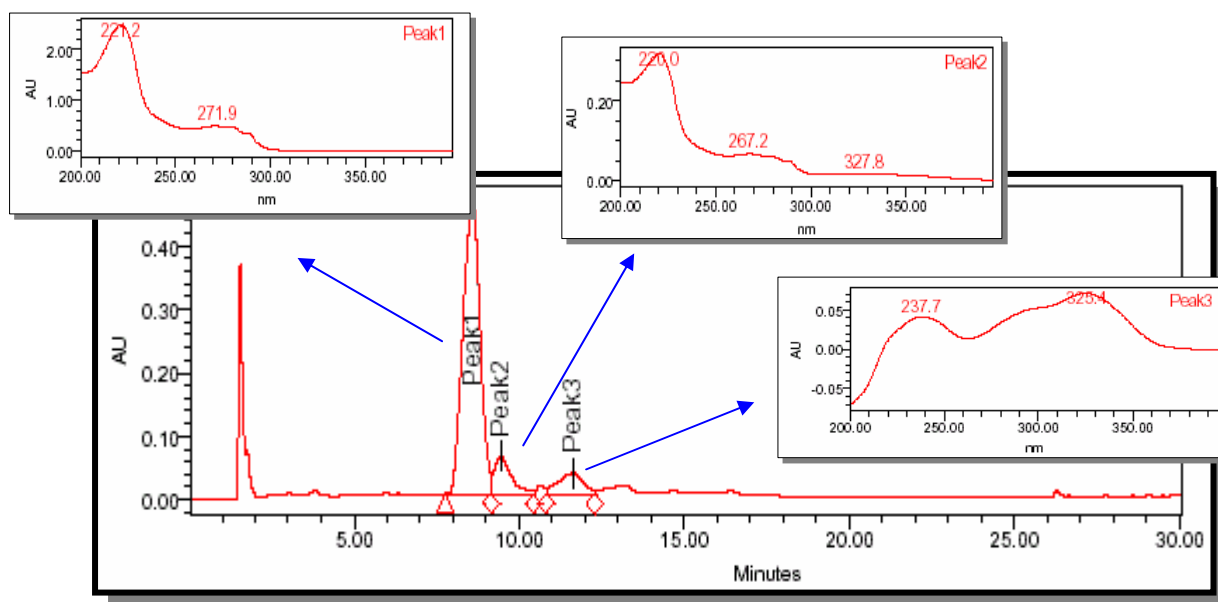


Figura I.23: Perfil cromatográfico do extrato metanólico bruto de folhas frescas de *P. myriantha*.

I.4. DISCUSSÃO

A partir do processamento das folhas de *P. myriantha*, foram obtidos dois extratos de alcalóides, um decorrente da extração da fase aquosa alcalina com diclorometano e outro resultante de seu esgotamento com n-butanol. O extrato butanólico apresentou o maior rendimento (3,1), contendo dois compostos majoritários, que também constituíam os principais produtos presentes na planta, conforme observado na análise do extrato bruto do vegetal fresco (fig. I.23), onde o perfil cromatográfico demonstrou a presença dos mesmos picos presentes no extrato butanólico (fig. I.8), com tempos de retenção semelhantes e espectros de UV correspondentes. Contrariamente, o extrato diclorometano apresentou baixo rendimento e perfil cromatográfico mais complexo, com maior número de picos referentes a compostos minoritários (fig. I.7 e fig. I.12).

Os alcalóides indólicos glicosilados identificados em espécies do subgênero *Heteropsychotria* já estudadas foram isolados, após o processamento clássico, a partir do extrato diclorometano, como é o caso de psicolatina (KERBER, 1999), lialosídeo e strictosamida (De SANTOS, 1999; De SANTOS *et al.*, 2001) e braquicerina (KERBER, 1999, KERBER *et al.*, 2001 e 2003) ou diretamente do extrato metanólico total, como *N*- β -D-glicopiranosil vincosamida (HENRIQUES *et al.*, 2004). Vários alcalóides indólicos têm sido isolados de extratos butanólicos de espécies de RUBIACEAE, entre elas *Ophiorrhiza pumila* (KITAJIMA *et al.*, 2002) e *Neonauclea sessifolia* (ITOH *et al.* 2003). *P. myriantha* apresentou o maior rendimento percentual de alcalóides na fração butanólica, sendo que o extrato diclorometano (**EDA**), embora mais complexo, representou pequena alíquota do conteúdo total desses metabólitos.

A investigação cromatográfica inicial de **EDA** indicou a presença de dois picos (5 e 6) com espectros de UV característicos do cromóforo indólico, sugerindo que os mesmos correspondam a alcalóides indol monoterpênicos. O fracionamento deste extrato resultou em oito frações principais, sendo que **PM2** e **PM5** apresentaram espectros de UV típicos de alcalóides indol monoterpênicos e bastantes semelhantes aos obtidos para os picos 5 e 6 do cromatograma inicial.

Embora oito frações tenham sido coletadas, estas foram obtidas em pequenas quantidades, sendo que somente **PM2** e **PM5** atingiram massa em torno de 10 mg. **EDA** e algumas das alíquotas resultantes de seu fracionamento apresentaram-se bastante instáveis quando à temperatura ambiente e/ou expostos à luz, mesmo durante a manipulação fundamental aos processos de purificação. **PM5** foi um dos exemplos desta condição de instabilidade, apresentando intensos sinais de degradação química durante a obtenção dos dados de RMN. Dessa forma, apenas **PM2** foi submetido à investigação espectroscópica, fornecendo apenas o espectro de H^1 RMN. Ainda assim, o espectro resultante apresentou baixa resolução, provavelmente decorrente da umidade residual presente na amostra, da presença de impurezas e do reduzido tempo de acumulação dos dados.

A análise do espectro de H^1 RMN para **PM2** permitiu a identificação de alguns sinais importantes. A presença de dois dubletos (δ_H 7,2 e 7,38 ppm) e dois tripletos (δ_H 6,95 e 7,02 ppm) na região aromática caracteriza sinais típicos do anel indólico não substituído. A comparação deste com espectros referentes a alcalóides indol monoterpênicos descritos na literatura sugeriu esqueleto estrutural análogo ao da strictosamida. Os valores encontrados são bastante semelhantes àqueles obtidos por De SANTOS (1999) para strictosamida e por LOPES (1998) e HENRIQUES *et al.* (2004) para *N*, β -D-glicopiranosil vincosamida.

A co-injeção de **EDA** com uma amostra autêntica de strictosamida proporcionou a identificação do pico 5. A comparação dos tempos de retenção do pico 5 de **EDA**, de **PM2** e do alcalóide isolado, bem como a comparação entre seus espectros UV, permitiu a identificação dos mesmos como sendo o alcalóide strictosamida.

Strictosamida é um alcalóide indol monoterpênico já isolado a partir de *Cephaelis dichroa* (SOLIS *et al.*, 1993), *Rhazya stricta* (RAHMAN *et al.*, 1991), espécies de *Nauclea* (ERDELMEIER *et al.*, 1991) e raízes de *Ophiorrhiza pumila* (KITAJIMA *et al.*, 2002). Atua, além disso, como o penúltimo precursor na formação de capmtotecina, alcalóide indol monoterpênico modificado, muitas vezes classificado entre os isoquinolínicos, com atividade atintumoral (YAMAZAKI *et al.*, 2003). Adicionalmente, esta substância apresenta atividades moluscicida, antibacteriana e antifúngica (ERDELMEIER *et al.*, 1991). Alguns autores sugerem

que strictosamida seja um artefato de strictosidina, formado durante a extração em meio alcalino. Contudo, ERDELMEIER *et al.* (1991) indicam sua presença em extratos metanólicos brutos de *Nauclea orientalis*.

No gênero *Psychotria*, strictosamida foi isolada em espécies neotropicais como *P. suterella* (De SANTOS *et al.*, 2001), *P. nuda* (dados não publicados) e *P. bahiensis* (PAUL *et al.*, 2003). Seu 3H epímero vincosamida foi isolado de *P. leiocarpa* (LOPES, 1998; HENRIQUES *et al.*, 2004). A presença deste alcalóide indol monoterpênico em *P. myriantha* sugere que strictosamida pode ser um produto comum na biossíntese de alcalóides de *Psychotria*, subgênero *Heteropsychotria*. Adicionalmente, a análise do cromatograma de vincosamida, verificação de seu tempo de retenção e comparação, através de sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos nas mesmas condições, indica a presença de vincosamida em **EDA**.

O fracionamento de **EBA** permitiu o isolamento de dois alcalóides indol monoterpênicos ácido strictosidínico e miriantosina, ainda não descritos no gênero *Psychotria*. Ácido strictosidínico foi primeiramente isolado por SMITH em 1968, sendo que miriantosina é um alcalóide indólico glicosilado de estrutura inédita.

A presença do anel indólico, no espectro de H^1 RMN se caracteriza por uma dupla de dubletos e uma dupla de tripletos na região aromática, na faixa em torno de δ_H 7 - 8 ppm (ERDELMEIER *et al.*, 1991). Esses sinais foram identificados no H^1 RMN de **EBA1** em δ_H 7,29 (H-12, $J = 7,81$ Hz), δ_H 7,41 (H-9, $J = 7,81$ Hz) e δ_H 6,97 (H-10, $J = 7,3$ e $7,81$ Hz) e δ_H 7,05 (H-11, $J = 7,3$ e $7,81$ Hz) ppm, respectivamente (fig. I.24). Em δ_H 5,13; 5,3 e 5,76 ppm encontram-se sinais que caracterizam a presença de um grupamento vinila terminal. O singleto em δ_H 7,38 (H-17), juntamente com o dubleto em δ_H 5,62 (H-21, $J = 9,7$ Hz), distinguem a secologanina. A existência de sinais referentes ao núcleo indólico e à secologanina confirmam se tratar de alcalóide indol monoterpênico (fig. I.24).

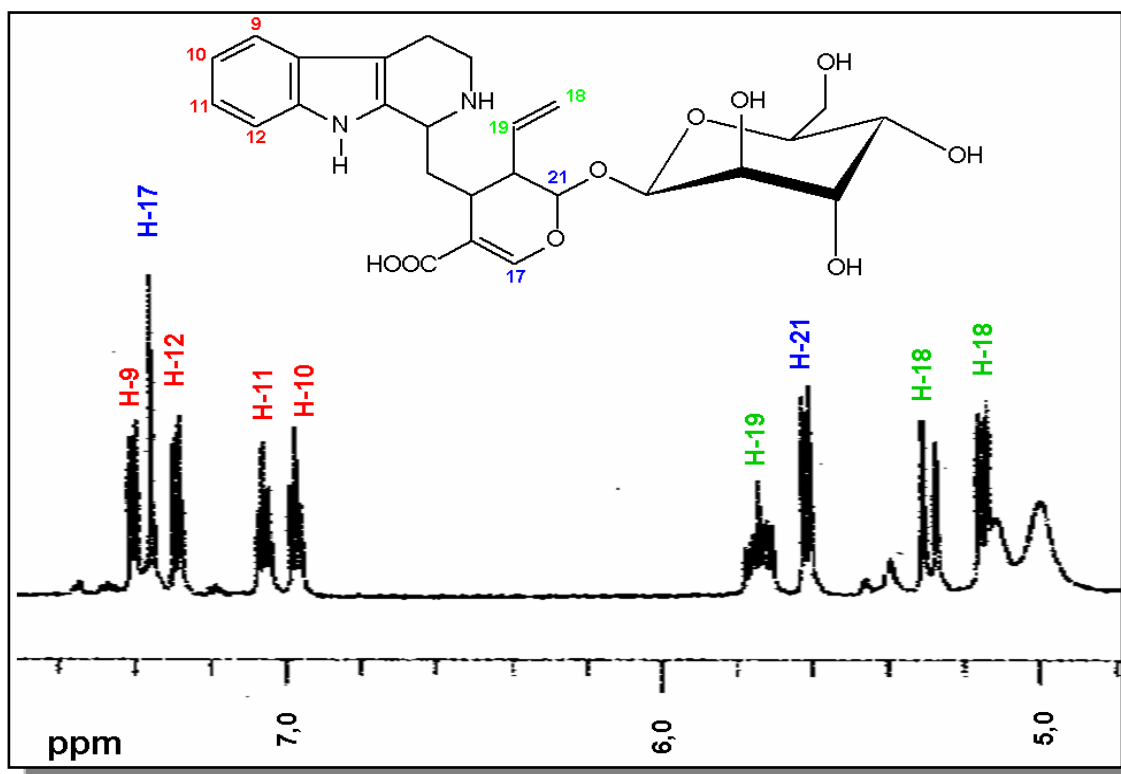


Figura I.24: Ampliação do espectro de ^1H RMN para **EBA1** ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz; tetrametilsilano como padrão interno), apresentando os deslocamentos químicos referentes ao núcleo indólico (δ_{H} 6,97; 7,05; 7,29 e H 7,41 ppm), à secologanina (δ_{H} 5,62 e 7,38 ppm) e ao grupamento vinila terminal (δ_{H} 5,13; 5,3 e 5,76 ppm).

O sinal em δ_{H} 4,63 ($J = 7,81$) corresponde ao próton anomérico (H-1') de uma unidade de açúcar (ERDELMEIER *et al.*, 1991). Os sinais entre δ_{H} 2,9 e 4,7 ppm correspondem a uma molécula de glicose, indicando tratar-se de um alcalóide indol monoterpênico glicosilado. Entretanto, esses prótons estão inseridos em um complexo de sinais, que dificultam a sua identificação (LEVESQUE *et al.*, 1983), como mostra a figura I.25.

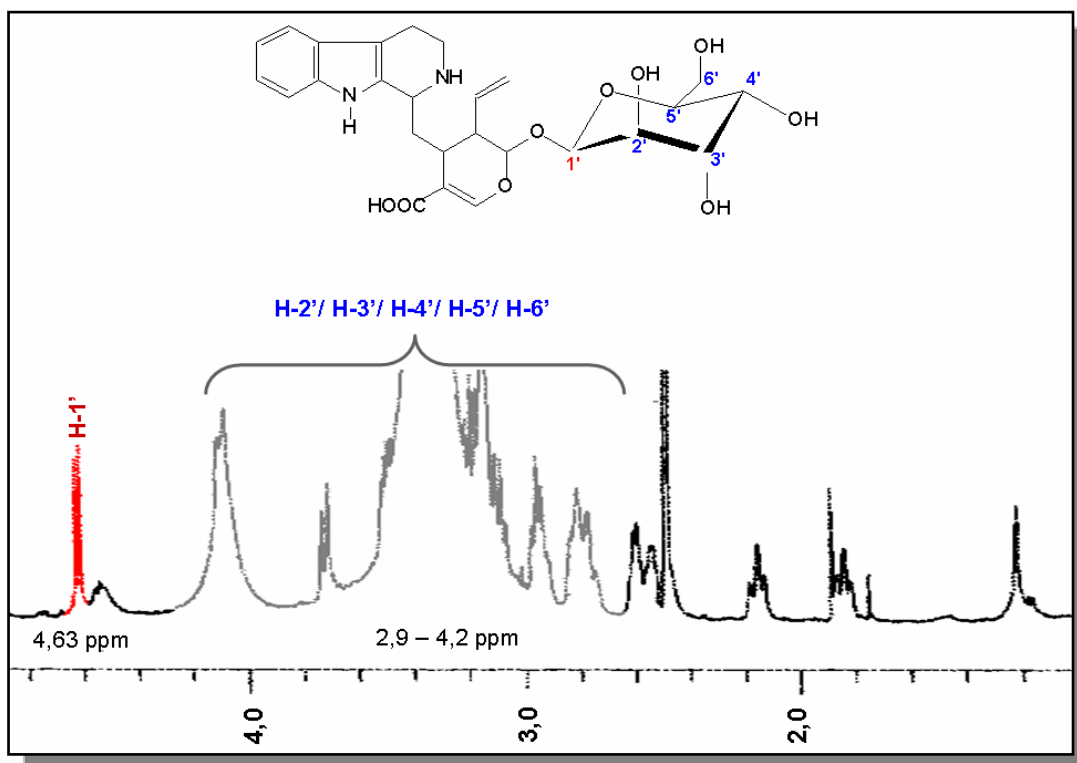


Figura I.25: Ampliação do espectro de ^1H RMN para **EBA1** ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz; tetrametilsilano como padrão interno), apresentando os deslocamentos químicos referentes ao hidrogênio anomérico H-1' (δ_{H} 4,63 ppm) e aos sinais dos hidrogênios H-2', H-3', H-4', H-5' e H-6' (δ_{H} 3,1; 2,9; 3,2; 4,12; 3,5 e 3,7 ppm, respectivamente).

A análise do espectro de C^{13} RMN (DEPT) permitiu visualizar os sinais com deslocamentos químicos entre 60 e 100 ppm, típicos de resíduos glicosídicos (fig. I.26).

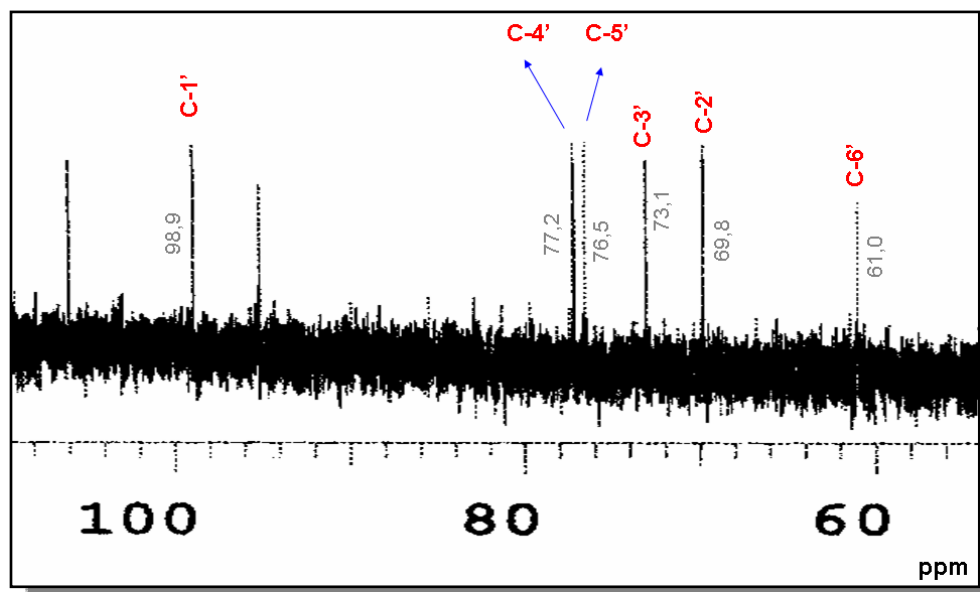


Figura I.26: Ampliação do espectro de C^{13} RMN para **EBA1** ($DMSO-d_6$, 125 MHz; tetrametilsilano como padrão interno), apresentando os deslocamentos químicos referentes aos carbonos anomérico C-1' (δ_C 98,9 ppm), C-2' (δ_C 69,8 ppm), C-3' (δ_C 73,1 ppm), C-4' (δ_C 77,2 ppm), C-5' (δ_C 76,5 ppm) e C-6' (δ_C 61,0 ppm).

Os resultados obtidos por COSY, que apresenta a correlação $H^1 - H^1$, possibilitaram a obtenção das conectividades relativas entre os hidrogênios de **EBA1**, confirmando a presença do anel indólico e sua ligação à secologanina (fig. I.27). Através do HSQC foi possível estabelecer a ligação entre os hidrogênios e carbonos presentes na molécula, além de identificar a relação entre os sinais em δ_H 3,1 e δ_C 69,8 ppm (C-2'); δ_H 2,9 e δ_C 73,1 ppm (C-3); δ_H 4,12 e δ_C 77,2 ppm (C-4'); δ_H 3,2 e δ_C 76,5 ppm (C-5'); δ_H 3,5, 3,7 e δ_C 61,0 ppm (C-6'), que correspondem a uma unidade de glicose (fig. I.28).

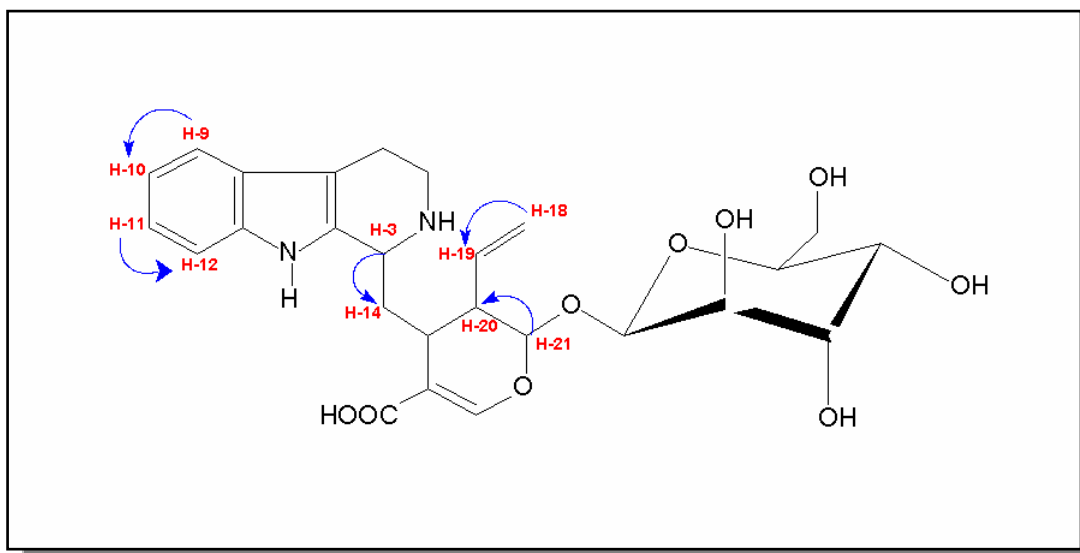


Figura I.27: Conectividades relativas entre os principais sinais de hidrogênio de **EBA1**, obtidas pelo espectro de correlação H^1-H^1 COSY.

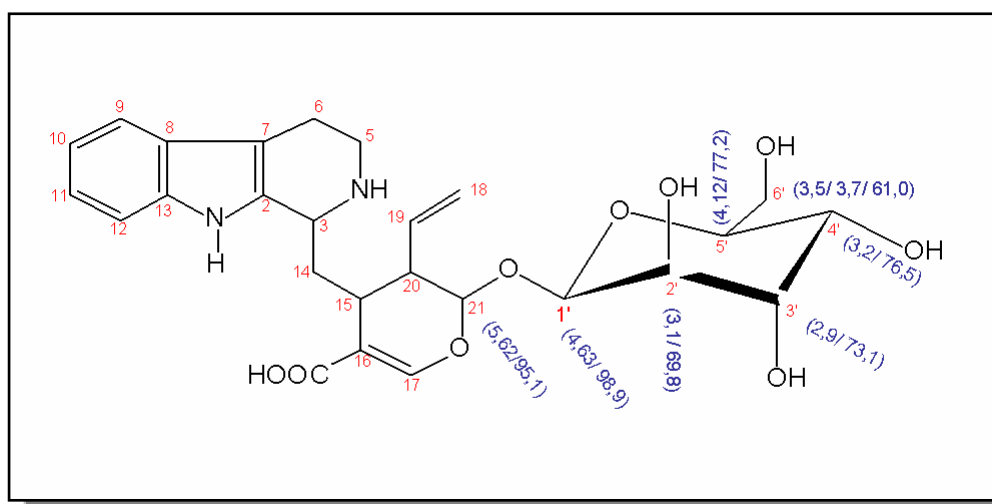


Figura I.28: Correlações entre os sinais de hidrogênios e carbonos, obtidas pelo espectro de HSQC, que permitiram a identificação da glicose como a molécula de açúcar presente em **EBA1**.

No espectro de HMBC, que fornece a relação entre hidrogênios e carbonos distantes por até três ligações, as correlações entre δ_H 4,63 e o sinal em δ_C 98,9 indicam que C-21 constitui o carbono de ligação do açúcar (fig. I.29). A ligação do sinal em δ_H 7,41 ppm (H-9) e os carbonos em δ_C 121,2 ppm (C-11) e δ_C 106,0 ppm (C-7); δ_H 7,29 ppm (H-12), δ_C 126,1 ppm (C-8) e δ_C 118,7 ppm (C-10); δ_H 7,38 ppm (H-17), δ_C 113,4 ppm (C-16), δ_C 33,7 (C-14) e δ_C 95,1 ppm (C-21); δ_H 6,97 ppm (H-10), δ_C 111,5 ppm (C-12) e δ_C 126,1 ppm (C-8); δ_H 7,05 ppm (H-11), δ_C 117,8 ppm (C-9), δ_C 33,7 (C-14) e δ_C 135,8 ppm (C-13); δ_H 5,62 ppm (H-21), δ_C 135,6 ppm (C-19) e δ_C 98,9 ppm (C-1'); δ_H 5,76 ppm (H-19) e δ_C 44,3 ppm (C-20) e δ_H 5,3 ppm (H-18), δ_C 135,6 ppm (C-19) e δ_C 44,3 (C-20), identificam os anéis indólico e secologanina, confirmando a presença de um alcalóide indol monoterpênico.

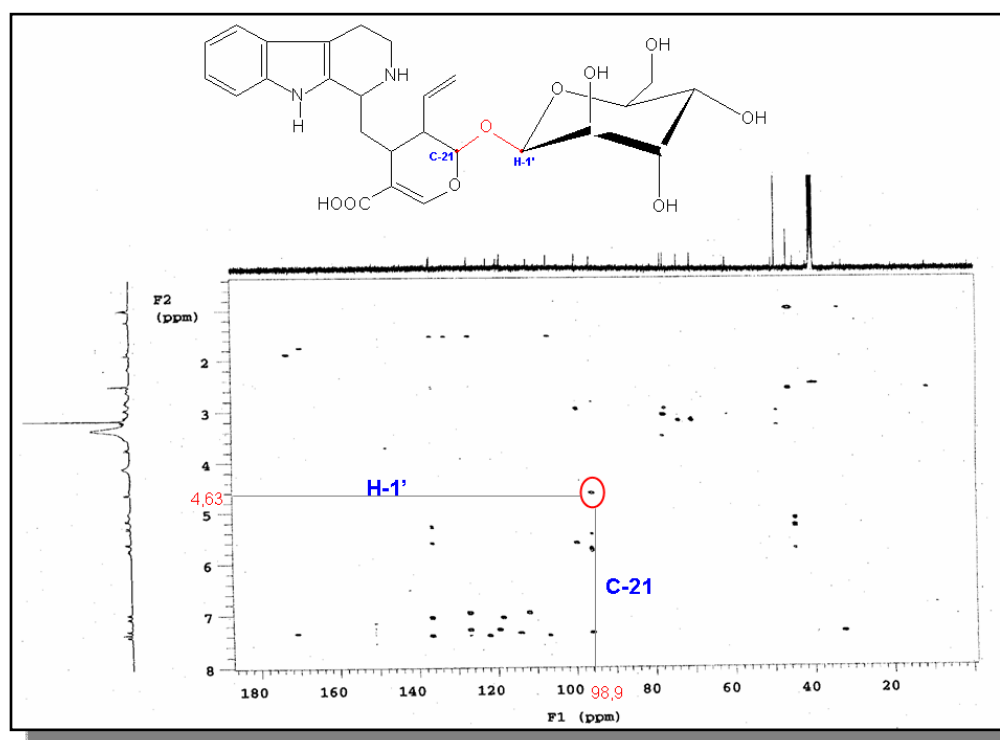


Figura I.29: Espectro de HMBC apresentando a correlação entre o hidrogênio em δ_H 4,63 ppm (H-1') e o carbono em δ_C 98,9 ppm (C-21), indicando a posição da ligação da glicose em **EBA1**.

Os resultados obtidos nos espectros de H^1 e C^{13} RMN para **EBA1** foram comparados com os dados da literatura, apresentando grande similaridade com os descritos para o ácido strictosidínico (tabela I.8). As diferenças observadas nos deslocamentos químicos decorrem do uso de solventes diferentes na obtenção dos espectros. A soma das informações resultantes das investigações espectroscópicas levou à identificação de **EBA1** como sendo ácido strictosidínico.

Este alcalóide foi primeiramente isolado como um produto natural a partir de raízes de *Rhayza orientalis* (SMITH *et al.*, 1968), tendo sido igualmente encontrado em *Hunteria zeylanica* (SUBHADHIRASAKUL *et al.*, 1994), família APOCYNACEAE, apresentando atividade analgésica periférica (REANMONGKOL *et al.*, 2000). A identificação de ácido strictosidínico no extrato butanólico de folhas de *P. myriantha* caracteriza seu primeiro relato no gênero *Psychotria*. Na família RUBIACEAE este alcalóide foi isolado a partir de folhas de *Ophiorriza filistipula* (ARBAIN *et al.*, 1993). Sua presença assim como seu epímero em C3 e derivado com duas moléculas de açúcar foi recentemente identificado em *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) do sul do Brasil (REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006).

Tabela I.8: Comparação dos dados de H^1 e C^{13} RMN de **EBA1** (DMSO- d_6) e de ácido estrictosidínico* (CD $_3$ OD).

Carbono	Ácido estrictosidínico		EBA1	
	δ_H (Hz)	δ_C (Hz)	δ_H (Hz)	δ_C (Hz)
2		130,54		132,3
3	4,41 (d, $J=11,8$)	52,28	4,1 (d, $J=10,4$)	49,6
5		43,02		40
6		19,63		19,2
7		107,3		106
8		127,55		126,1
9	7,44 (d, $J=7,6$)	119,05	7,41 (d, $J = 7.81$)	117,8
10	7,02 (dd, $J=7,6$ e $7,2$)	120,51	6,97 (dd, $J = 7.3$ e 7.81)	118,7
11	7,12 (dd, $J=8,1$ e $7,2$)	123,31	7,05 (dd, $J = 7.3$ e 7.81)	121,2
12	7,30 (d, $J=8,1$)	112,2	7,29 (d, $J = 7.81$)	111,5
13		138,19		135,8
14	2,11 (ddd, $J=13,0$; $11,8$ e $4,5$)	35,15	1,95 (m)	33,7
	2,36 (ddd, $J=13,0$; $13,0$ e $3,3$)		2,2 (m)	
15	2,97 (m)	34,07	2,9 (m)	31,8
16		113,68		113,4
17	7,55 (s)	153,17	7,38 (s)	150
18	5,17 (br dd, $10,7$; $1,5$ e c. 1)	118,68	5,13 (d, $J = 7.8$)	117,9
	5,30 (br dd, $J=17,4$; $1,5$ e c. 1)		5,3 (d, $J = 7.8$)	
19	5,85 (ddd, $J=13,0$; $10,7$ e $7,3$)	136,25	5,76 (m)	135,6
20	2,69 (br dd, $J=9,5$; $7,3$ e $4,5$)	45,72	2,6 (m)	44,3
21	5,82 (d, $J=9,5$)	96,57	5,62 (d, $J =9.7$)	95,1
22		175,98		170
1'	4,81 (d, $J=7,9$)	100,35	4,63 (d, $J =7.8$)	98,9
2'	3,21 (dd, $J=9,1$ e $7,9$)	74,74	3,1 (m)	69,8
3'	3,42 (dd, $J=9,1$ e $8,9$)	77,99	2,9 (m)	73,1
4'	3,22 (dd, $J=10,5$ e $8,9$)	71,81	3,2 (m)	77,2
5'	3,40 (ddd, $J=10,5$; $6,9$ e $2,0$)	78,72	4,12 (m)	76,5
6'	3,67 (dd, $J=11,7$ e $6,9$)	63,11	3,5 (m)	61
	4,01 (dd, $J=11,7$ e $2,0$)		3,7 (m)	

(*ARBAIN, *et al.*, 1993)

A elucidação estrutural de **EBA2** permitiu a identificação de um alcalóide indol monoterpênico ainda não descrito na literatura, designado como miriantosina. A existência do anel indólico no espectro de H^1 RMN foi confirmada pelos sinais em δ_H 8,17 (H-9, $J = 7,81$ Hz); δ_H 7,20 (H-10, $J = 7,33$ e $7,81$ Hz); δ_H 7,50 (H-11, $7,33$ e $7,81$ Hz) e δ_H 7,56 (H-12, $J = 7,82$ Hz), na região aromática do espectro. A observação de dois dubletos adicionais nesta área, em δ_H 7,93 (H-6, $J = 4,8$ Hz) e δ_H 8,23 ppm (H-5, $J = 4,8$ Hz), indica a presença de uma ligação dupla entre as posições 5 e 6, estendendo o cromóforo indólico (fig. I.30), como no alcalóide lialosídeo, isolado de *P. suterella* (De SANTOS, 1999; De SANTOS *et al.*, 2001).

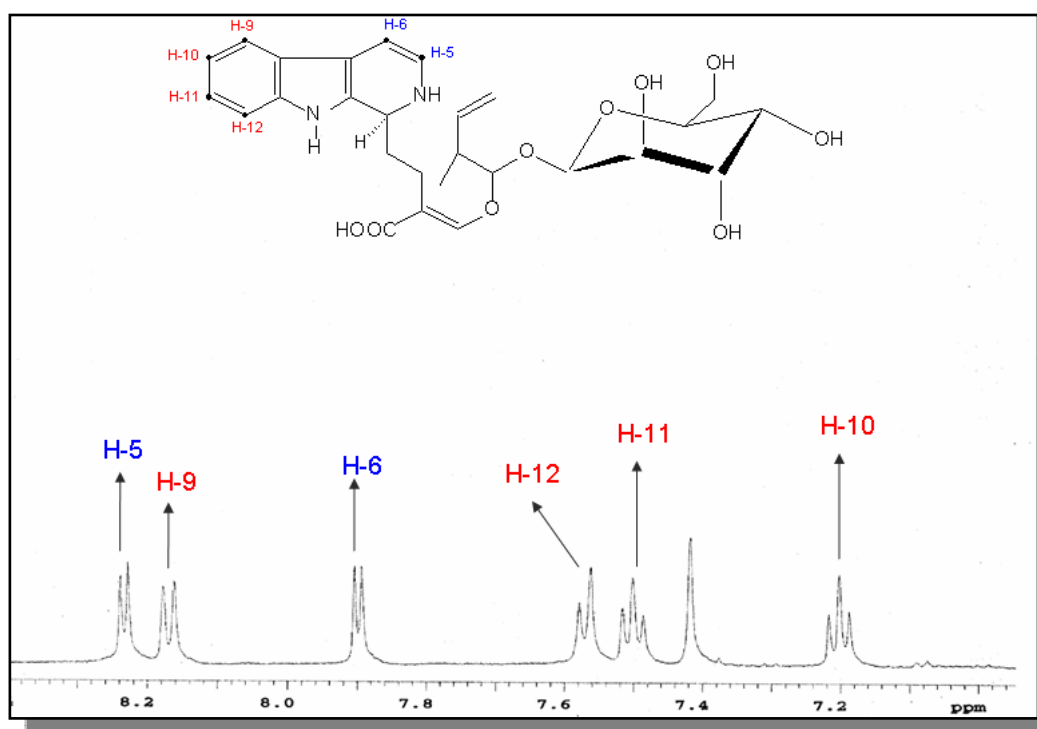


Figura I.30: Ampliação do espectro de H^1 RMN para **EBA2** (DMSO- d_6 , 500 MHz; tetrametilsilano, como padrão interno), apresentando os deslocamentos químicos típicos do núcleo indólico, com dois dubletos em δ_H 7,56 e 8,17 ppm (H-12 e H-9) e dois tripletos em δ_H 7,20 e 7,50 ppm (H-10 e H-11). Presença de dubletos em δ_H 7,93 e 8,23 ppm (H-6 e H-5), indicando a existência de uma ligação dupla entre estes hidrogênios.

Os espectros de H^1 e C^{13} RMN apresentaram os sinais característicos entre δ_H 3,0 e 4,5 ppm (hidrogênio anomérico) e δ_C 60 e 100 ppm, evidenciando a presença de um açúcar ligado à estrutura (fig. I.31).

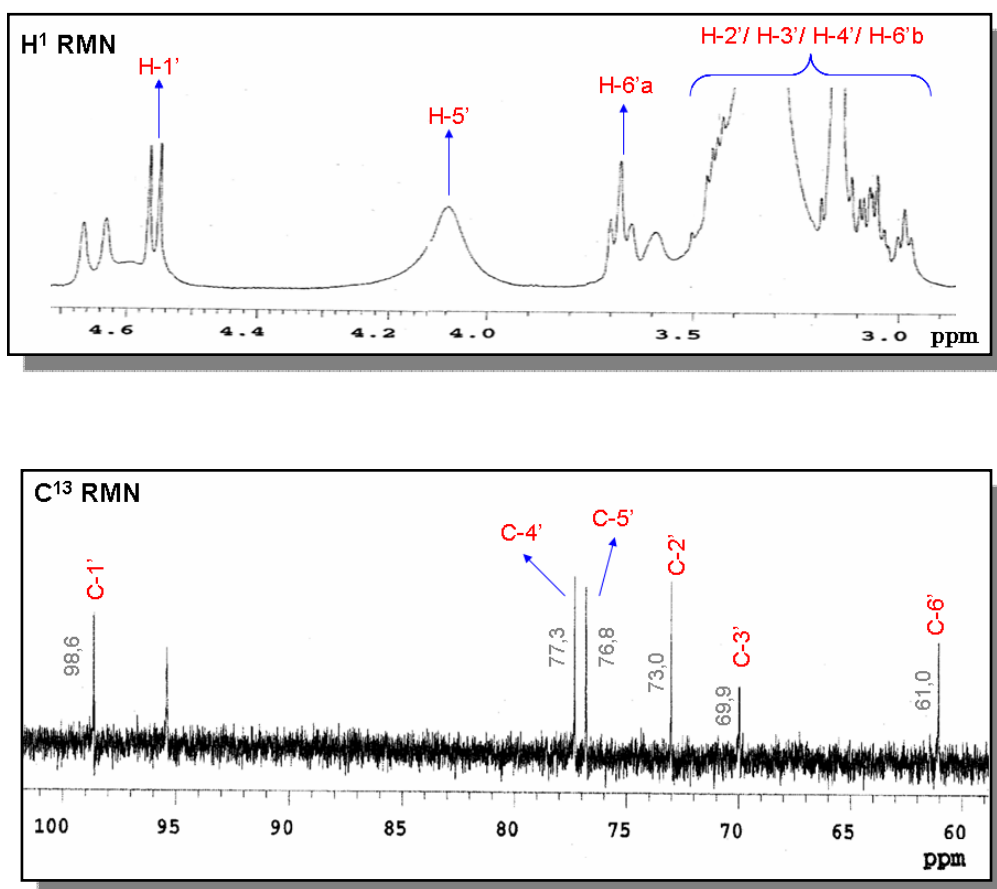


Figura I.31: Ampliação dos espectros de H^1 RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz) e de C^{13} RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz) para **EBA2**, apresentando os deslocamentos químicos característicos do açúcar: 1' (δ_H 4,5 / δ_C 98,6 ppm); 2' (δ_H 3,0 / δ_C 73,0 ppm); 3' (δ_H 3,1 / δ_C 69,9 ppm); 4' (δ_H 3,2 / δ_C 77,3 ppm), 5' (δ_H 4,1 / δ_C 76,8 ppm) e 6' (δ_H 3,41 / δ_H 3,7 / δ_C 61,0 ppm).

O espectro de HMBC para miriantosina apresenta a correlação entre o hidrogênio anomérico em δ_H 4,5 ppm e o carbono em δ_C 95,4 ppm (C-21), apontando a ligação do açúcar na posição C-21 (fig I.32). Os experimentos bidimensionais COSY, HSQC e HMBC proporcionaram a identificação do açúcar como sendo β -glicose.

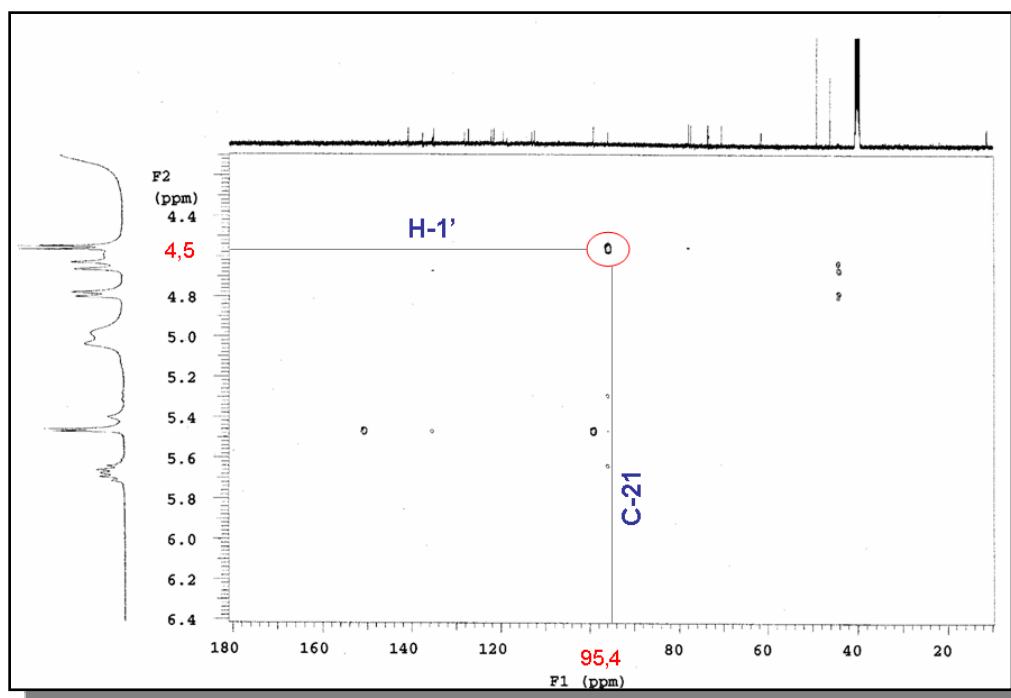


Figura I.32: Ampliação do espectro de HMBC (DMSO- d_6 , 500 MHz) para **EBA2**. Correlação entre δ_H 4,5 ppm (H-1') e δ_C 95,4 ppm (C-21), indicando a posição da ligação do açúcar.

No espectro de H^1 RMN para **EBA2**, foi observado um tripleto em δ_H 1,0 ppm, enquanto o C^{13} RMN permitiu a visualização de um sinal em δ_C 10,4 ppm. Estes deslocamentos, nas duas regiões espectrais, são característicos de grupos metila (fig. I.33). A análise de EBA2 por HSQC mostrou a correlação entre δ_H 1,0 ppm e δ_C 10,4 ppm, confirmando a presença deste radical metila.

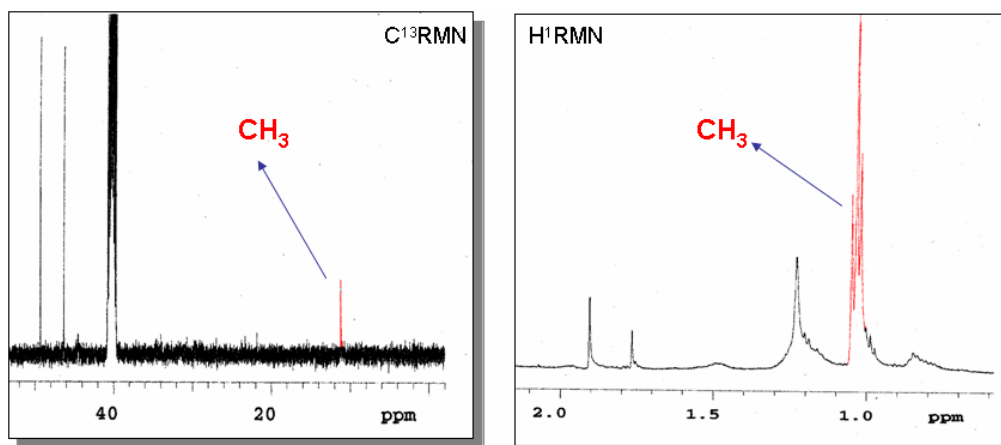


Figura I.33: Ampliações dos espectros de C^{13} RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz) e de H^1 RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz) para **EBA2**, apresentando os deslocamentos químicos referentes à metila em δ_H 1,0 e δ_C 10,4 ppm.

As correlações H^1 - H^1 COSY entre os hidrogênios em δ_H 7,2 (H-10); δ_H 7,5 (H-11) e δ_H 8,17 ppm (H-9) confirmam a existência do anel indólico, enquanto a relação entre δ_H 7,9 (H-6) e δ_H 8,23 ppm (H-5) demonstra a extensão do cromóforo, formando uma β -carbolina. A secologanina foi caracterizada pela ligação entre a vinila terminal em δ_H 4,6 e 4,8 ppm (H-18a e H-18b) e δ_H 5,7 ppm (H-19). Contudo, observou-se uma correlação incomum entre δ_H 2,6 (H-20) e o tripleto em δ_H 1,0 ppm, indicando a presença de um grupamento metila ligado nesta porção da molécula (fig. I.34).

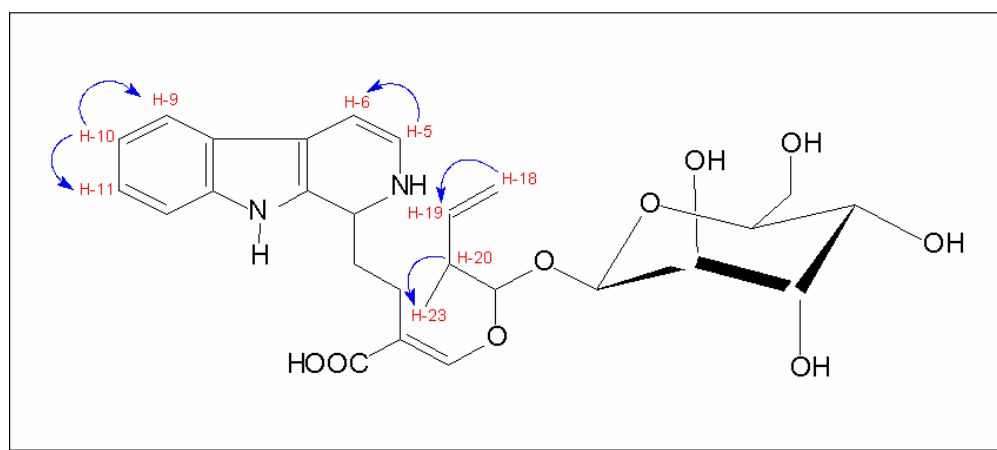


Figura I.34: Conectividades relativas entre os sinais de hidrogênio de **EBA2**, obtidas pelo espectro de correlação H^1 - H^1 COSY.

A constatação de correlações, no HMBC, entre o hidrogênio em δ_H 2,6 ppm (H-20) e os carbonos em δ_C 118,9 (C-18), 134,8 (C-19), 95,4 (C-21) e 10,4 ppm (CH₃), determinam a vizinhança entre estes sinais e corroboram a ligação da metila no carbono C-20 (fig. I.35).

A metilação nesta posição indica uma abertura do anel secologanina ligado ao esqueleto β -carbolina, retratando uma via biossintética não usual de incorporação deste iridóide à triptamina. A rota clássica para a formação de alcalóides monoterpênicos indólicos é constituída pela condensação de uma unidade de triptamina e do iridóide secologanina, levando à formação de strictosidina (SOLIS *et al.*, 1993).

A configuração da posição C-3 diferencia os alcalóides strictosamida, que possui H-3 em posição alfa, de seu epímero vincosamida, com configuração beta. As diferenças entre os deslocamentos químicos dos sinais em C-5 e C-14 são utilizadas para atribuir a configuração a posição C-3 (ERDELMEIER, 1991). Segundo ERDELMEIER (1991), há uma diferença de cerca de 4 ppm entre os deslocamentos químicos de C-5 para strictosamida e vincosamida. Vincosamida apresenta H-14a deslocado em 0,5 ppm para frequências mais altas e o sinal de C-14 cerca de 6 ppm mais desblindado que em strictosamida. ARBAIN *et al.* (1993) determinaram configuração alfa para o H-3 do ácido strictosidínico, através da comparação de seu espectro de H¹RMN com os de strictosidina (H-3 α) e vincosida (H-3 β).

Para miriantosina, H-3 apresentou sinais em 3,11 ppm e os deslocamentos químicos de C-5, C-14 e H-14a foram diferentes dos obtidos para ácido strictosidínico. A presença da ligação dupla entre as posições C-5 e C-6 e da abertura do anel secologanina na estrutura do alcalóide são apontadas como responsáveis por tais alterações. Dessa forma, para determinação da configuração de H-3 para miriantosina são necessárias análises espectroscópicas adicionais.

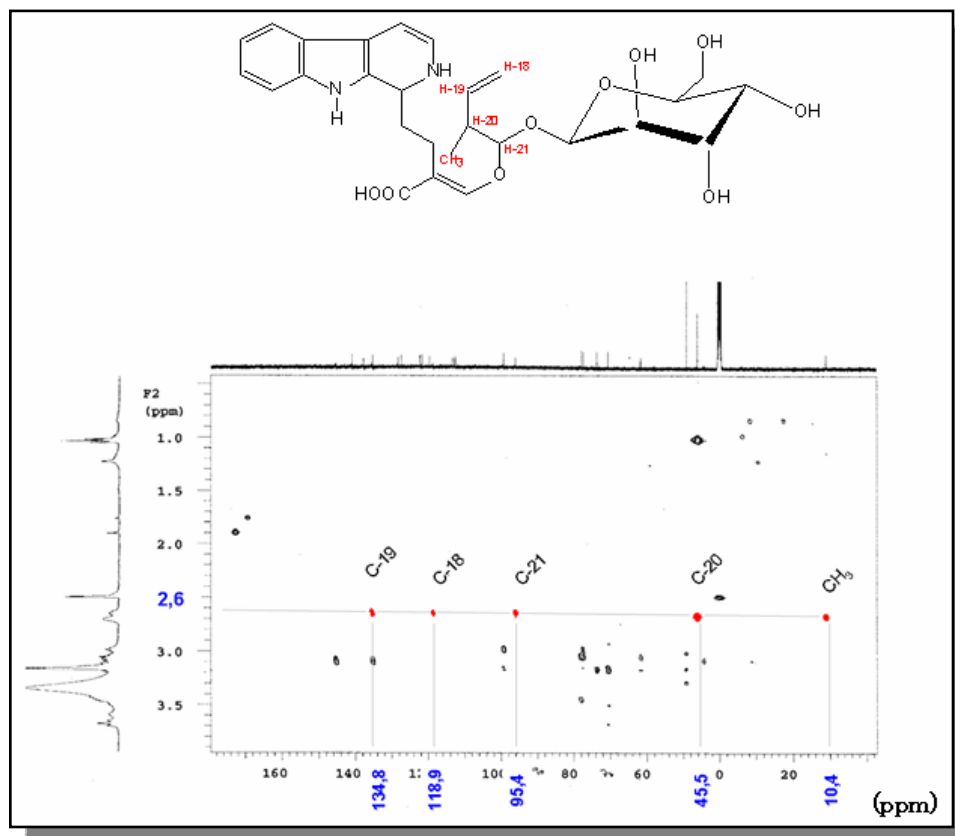


Figura I.35: Espectro de HMBC para **EBA2**, apresentando as correlações entre H-20, os carbonos C-19, C-18 e C-21 e a metila em δ_C 118,9 ppm.

Na análise cromatográfica de **EBA**, verificou-se a presença de apenas dois picos, com tempos de retenção 8,5 e 9,4 minutos. Ambos apresentaram perfis de alcalóides indol monoterpênicos no UV. O fracionamento de **EBA** foi realizado em dois laboratórios diferentes, sob condições experimentais bastante semelhantes, resultando em duas frações (**EBA1** e **EBA2**).

As análises espectroscópicas que levaram à identificação dos alcalóides foram realizadas no Laboratório Farmacognosia e Fitoquímica da Universidade de Genebra. Neste laboratório, a fração **EBA2** apresentou apenas um pico na análise cromatográfica, correspondendo a miriantosina (fig. I.9). **EBA2** obtido no laboratório desta universidade, apresentou perfil cromatográfico distinto, sendo constituído por dois picos, um com UV e tempo de retenção correspondentes a miriantosina e outro

bastante diferente, em tempo de retenção maior (fig. I.18), contrariando o resultado obtido para o extrato **EBA** (fig. I.8). Este fato sugere a instabilidade química da miriantosina, que pode decorrer da abertura do anel secologanina. A realização de uma nova análise cromatográfica (tab. I.2) com uma amostra de miriantosina isolada na Universidade de Genebra demonstrou a degradação do pico do alcalóide, formando um composto com características de UV divergente do cromóforo de alcalóides monoterpene indólicos (fig. I.36).

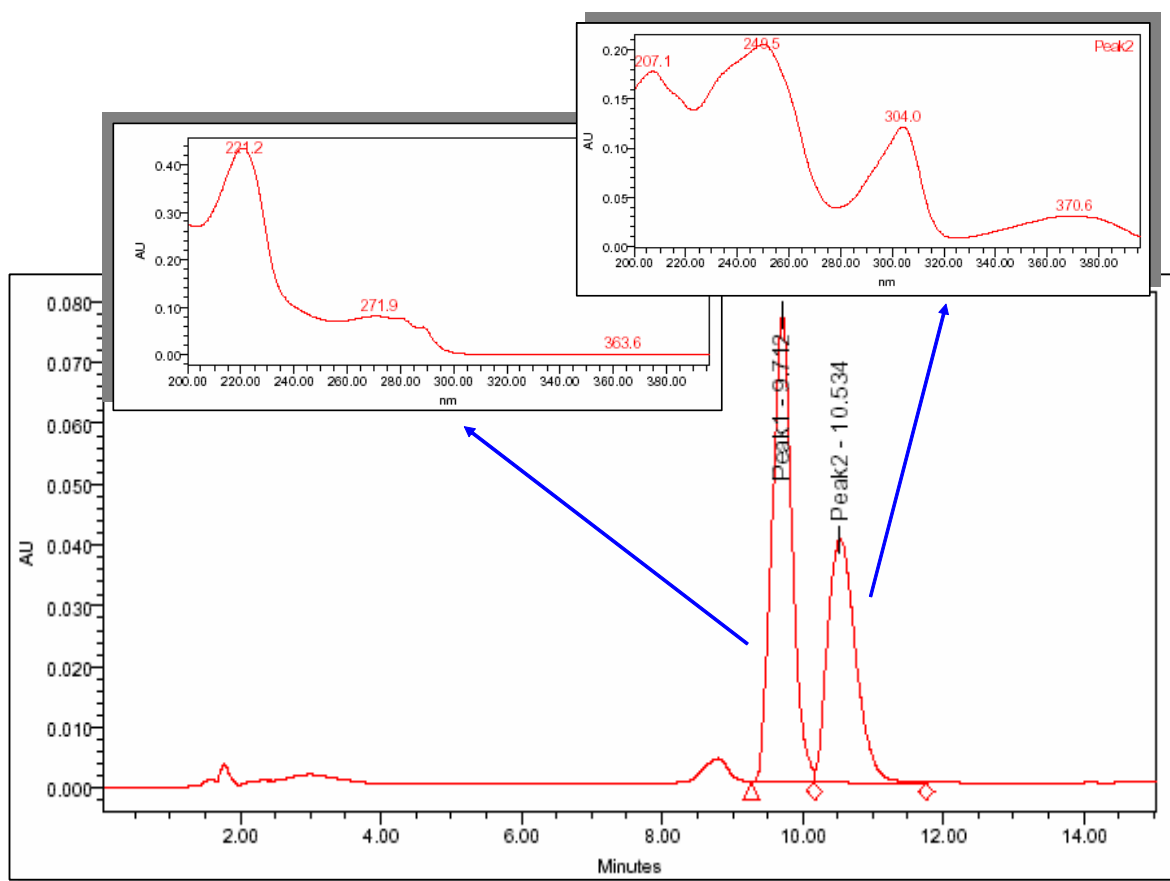


Figura I.36: Perfil cromatográfico de **EBA2** em análise por CLAE/DAD, $\lambda = 280$ nm; coluna Symmetry C₁₈ (3,5 μ m, 4,6 x 7,5 mm).

Psychotria é caracterizado pela sua complexidade taxonômica, que dificulta a delimitação de suas fronteiras. Este gênero está relacionado à *Calycodendrum*, *Calycosia* (LIBOT *et al.*, 1987) e *Cephaelis*, além de apresenta estreita similaridade com *Palicourea* (TAYLOR, 1993 e 1996). Características puramente morfológicas são ineficientes na classificação do gênero, sendo necessária a utilização de dados moleculares na revisão dos limites genéricos (TAYLOR, 1993 e 1996; NEPOKROEFF, 1999). Informações como distribuição geográfica e morfologia, levaram PETTIT (1964 e 1966) e STEYERMARK (1972) a propor a subdivisão em três subgêneros: *Psychotria*, abrangendo as espécies pantropicais; *Tetramerae*, com espécies da África e Madagascar e *Heteropsychotria*, incluindo a maioria das espécies encontradas nos neotrópicos. NEPOKROEFF (1999), utilizando estudos filogenéticos, sugere a fusão de *Palicourea* no subgênero *Heteropsychotria*, formando um gênero próprio.

Devido à controvérsia com respeito de *Psychotria*, vários estudos fitoquímicos foram desenvolvidos com o propósito, além de isolar e identificar os metabólitos do gênero, de auxiliar a classificação do mesmo através de dados quimiotaxonômicos. Dessa forma, verificou-se que os alcalóides indólicos são os principais metabólitos do gênero *Psychotria*, sendo em sua maioria do tipo polindolinas, que parecem caracterizar o subgênero *Psychotria* (KERBER, 1999; De SANTOS *et al.*, 2001). Com exceção de *P. glomerulata* (SOLIS *et al.*, 1997) e *P. colorata* (ELISABETSKY *et al.*, 1997; VEROTTA *et al.*, 1998), esses alcalóides poliméricos não têm sido encontrados em espécies neotropicais.

Alcalóides indol monoterpênicos O-glicosilados têm sido freqüentemente isolados de espécies da família RUBIACEAE, principalmente em *Psychotria* e *Palicourea*, um gênero exclusivamente neotropical (ACHEMBACH *et al.*, 1995; KERBER *et al.*, 2001). As similaridades entre ambos são bastante grandes e *Palicourea* também se caracteriza pela presença de alcalóides polindólicos, mas com a peculiaridade de organizarem-se de forma dimérica, ao invés daqueles encontrados no subgênero *Psychotria*, que apresentam variados graus de polimerização (LOPES *et al.*, 2004).

O isolamento dos alcalóides N-b-D-glicopiranosil vincosamida, de *P. leiocarpa* (LOPES, 1998; HENRIQUES *et al.*, 2004); psicolatina, composto majoritário de *p.*

umbellata; braquicerina de *P. brachyceras* (KERBER *et al.*, 2001 e 2003); lialosídeo, estrictosamida e naucletina, de *P. suterella* (De SANTOS, 1999; De SANTOS *et al.*, 2001), além da investigação, por CLAE/DAD, de 12 outras espécies neotropicais (LOPES *et al.*, 2004) sugerem que o subgênero *Heteropsychotria* seja caracterizado pela produção de alcalóides indol monoterpênicos.

O isolamento e a identificação de estrictosamida, ácido estrictosidínico e miriantosina corroboram a hipótese de produção de alcalóides indol monoterpênicos por espécies neotropicais, incluindo *Psychotria myriantha* no subgênero *Heteropsychotria*.

CAPÍTULO II

***Psychotria myriantha*: INFLUÊNCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS, AÇÃO ANTIOXIDANTE E SOBRE A ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE E EFEITO ANALGÉSICO**

II. INTRODUÇÃO

II.1. Usos tradicionais e atividades farmacológicas de *Psychotria*

Espécies de *Psychotria* são empregadas na medicina popular de vários países, no tratamento de diversas doenças como: problemas do estômago, complicações do parto, disenteria, hemorragia menstrual, febres, problemas brônquicos, cólicas, constipação, hipertensão e afecções cutâneas (ADJIBADÉ, 1989; LEAL, 1994). A tabela II.2 apresenta exemplos de usos populares e atividades farmacológicas descritas para o gênero.

Psychotria viridis é, provavelmente, a espécie de *Psychotria* mais citada na literatura científica devido a sua inclusão, juntamente com *P. carthagenesis* e *Banisteriopsis caapi*, na bebida conhecida como “ayahuasca”, utilizada nas regiões amazônicas em rituais religiosos e outras finalidades. *P. viridis* é caracterizada pelo grande conteúdo de *N,N*-dimetiltryptamina (RIVIER e LINDGREEN, 1972; McKENNA *et al.*, 1984; WITHERUP *et al.*, 1994), alcalóide com potente ação alucinógena (McKENNA *et al.*, 1984; LIWSZYC *et al.*, 1992; LEAL e ELISABETSKY, 1996; FREEDLAND e MANSBACH, 1999).

Tabela II.1: Usos tradicionais e atividades farmacológicas descritas para espécies de *Psychotria*.

Espécie	Local	Uso tradicional	Atividades farmacológicas	Referência
<i>P. capensis</i>	África do Sul	diarréia e parasitoses intestinais	antibacteriana	McGAW <i>et al.</i> , 2000
<i>P. gardneri</i> e <i>P. stenophylla</i>	Sri Lanka		antibacteriana e antifúngica	JAYASINGHE <i>et al.</i> , 2002
<i>P. microblasta</i>	Nova Guiné		antimicrobiana	KHAN <i>et al.</i> , 2001
<i>P. ipecacuanha</i> e <i>P. poeppigiana</i>	Colômbia	picada de cobras	não neutralizaram o efeito hemorrágico induzido por veneno de <i>Bothrops atrox</i> .	OTERO <i>et al.</i> , 2000
<i>P. klugii</i>	Peru		antimalárica e leishmanicida	MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2003
<i>P. serpens</i>	Taipei	infecções virais e bacterianas	inibir a replicação do vírus HSV-1	KUO <i>et al.</i> , 2001
<i>P. elata</i>	Panamá	hipertensão, disfunções cardiovasculares, distúrbios mentais, desordens alimentares	inibição da constrição dos vasos sanguíneos, ação ansiolítica e regulação do consumo alimentar	CABALLERO-GEORGE <i>et al.</i> , 2001
<i>P. hawaiiensis</i>	Hawai	doenças infecciosas	antiviral e antimicrobiana	LOCHER <i>et al.</i> , 1995

Atividade analgésica do tipo opióide e reversível por naloxona foi descrita para *Psychotria colorata*, utilizada tradicionalmente por caboclos da Amazônia para o tratamento de “dores” em geral (ELISABETSKY *et al.*, 1995). O mesmo tipo de ação foi demonstrado pelo extrato etanólico de *P. umbellata*, subgênero *Heteropsychotria* (LEAL, 1994). O alcalóide indol monoterpênico psicolatina, composto majoritário em *P. umbellata* (KERBER, 1999), produziu atividade dose-dependente, parcialmente reversível por naloxona, em modelos térmicos de nocicepção, sugerindo participação de receptores do tipo opióide no seu mecanismo de ação (BOTH, 2001; BOTH *et al.*, 2002b). Este alcalóide apresentou atividade ansiolítica nas doses de 7,5 e 15,0 mg/kg, em camundongos testados em modelos de ansiedade e ação antidepressiva nas doses de 3,0 e 7,5 mg/kg, em animais submetidos à tarefa do nado forçado (BOTH *et al.*, 2005). Os extratos etanólicos das espécies de *P. brachyceras*, *P. leiocarpa*, *P. myriantha* e *P. suterella*, testados pelo ensaio “tail flick”, apresentaram ação analgésica inespecífica e efeito hipotérmico (ELISABETSKY *et al.*, 1997). O alcalóide ácido strictosidínico apresentou atividade antinociceptiva nos testes das contorções abdominais e placa quente, sugerindo atividade analgésica periférica (REANMONGKOL *et al.*, 2000). Os dados descritos

para as espécies *P. umbellata*, *P. brachyceras*, *P. suterella* e *P. myriantha*, componentes de *Heteropsychotria*, sugerem que espécies deste subgênero apresentam atividades relacionadas à analgesia, estimulando a investigação deste efeito no extrato butanólico e no alcalóide isolado de *P. myriantha*.

Com base na diversidade de usos populares e atividades farmacológicas descritas para espécies do gênero *Psychotria*, os objetivos deste capítulo foram:

- Investigar, por meio de ensaios *in vitro*, o comportamento dos alcalóides isolados das folhas de *P. myriantha* quanto à atividade antiinflamatória, antioxidante e inibidora da acetilcolinesterase.
 - Avaliar, de forma preliminar, a atividade inibidora da quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares para os extratos diclorometano e n-butanólico de alcalóides de isolados *P. myriantha*, estrictosamida, ácido estrictosidínico e miriantosina, empregando o ensaio *in vitro* da câmara de Boyden;
 - Verificar possíveis propriedades antioxidantes para os alcalóides: EDA, EBA estrictosamida, ácido estrictosidínico e miriantosina, por bioautografia frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH);
 - Identificar a potencial influência dos alcalóides isolados e dos extratos de *P. myriantha* sobre a inibição da enzima acetilcolinesterase, por bioautografia.

➤ Analisar o extrato butanólico de alcalóides (EBA) e ácido estrictosidínico, quanto à atividade analgésica.

- Avaliar EBA quanto ao seu percentual de inibição no teste de dor induzida por capsaicina em camundongos;
- Verificar a influência do tratamento com ácido estrictosidínico e com o extrato EBA sobre os tempos de reação em camundongos submetidos ao modelo da retirada da cauda ao estímulo térmico (*tail flick*);
- Estabelecer o tipo de efeito analgésico apresentado por EBA e ácido estrictosidínico.

II.1.1. Processo inflamatório

Os processos inflamatórios constituem a resposta de um tecido vivo a um estímulo lesivo, compreendendo uma série de eventos vasculares e celulares que objetivam o reparo da lesão. Uma das principais etapas da inflamação é a liberação de leucócitos (neutrófilos) da corrente sanguínea para o local da lesão, migração conhecida como diapedese ou quimiotaxia (RANG *et al.*, 2004). Os leucócitos são essenciais para a resposta inflamatória primária contra organismos invasores, já que respondem a vários sinais quimiotáticos bem definidos, tais como peptídeos, leucotrienos, derivados do sistema complemento, componentes de matrizes extracelulares, fatores derivados de células não imunes, metabólitos do ácido araquidônico e produtos bacterianos, como por exemplo, os lipopolissacarídeos (LPS) (HUJANEN *et al.*, 1995).

Eventos inflamatórios estão envolvidos na gênese de diversas enfermidades. Na neuroinflamação, macrófagos e monócitos da microglia detectam o agente causador da lesão e respondem com a síntese de citocinas pró-inflamatórias, principalmente interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α), cuja produção excessiva contribui para a formação de lesões em doenças neurológicas e neurodegenerativas (MASILAMONI *et al.*, 2005). Este processo, conhecido como ativação microglial, está implicado na patogênese de doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, doenças de Parkinson e Alzheimer (MARCHETTI e ABBRACHIO, 2005). MASILAMONI *et al.* (2005) determinaram níveis significativamente aumentados de TNF- α e IL-1 β e NO em plasma, hipocampus e córtices de camundongos com processos inflamatórios induzidos por nitrato de prata. Na esclerose múltipla, doença auto-imune crônica, com etiologia ainda parcialmente conhecida, a ativação microglial, e o conseqüente aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, é a responsável pela perda da bainha de mielina dos axônios da glia (PERRY *et al.*, 2003; HENDRIKS *et al.*, 2005).

Estudos imuno-histoquímicos demonstram a presença de inflamação em regiões cerebrais afetadas pela doença de Parkinson (McGEER e McGEER, 2004), sendo que altos níveis de mediadores inflamatórios foram encontrados nos estriados destes pacientes (HALD e LOTHARIUS, 2005). A doença de Parkinson se

caracteriza pela perda de neurônios dopaminérgicos, que poderia estar associada com a atividade da microglia. Experimentos onde animais foram tratados com injeção intranigral de LPS apresentaram ativação microglial e degeneração dopaminérgica, confirmando esta hipótese (HALD e LOTHARIUS, 2005). Segundo McGEER e McGEER (2004), o uso crônico de agentes antiinflamatórios pode retardar o início da doença e reduzir a progressão da perda dopaminérgica.

CHEN *et al.* (2003) relatam que o uso de antiinflamatórios não esteróides pode retardar ou prevenir o início da doença de Parkinson. Em artigo de revisão, STÜVE *et al.* (2003) indicam que fármacos da família das estatinas podem inibir a migração de leucócitos e diminuir a expressão de mediadores inflamatórios, além de reduzir a secreção β -amilóide no sistema nervoso central. Estudos *in vitro* sugerem uma atividade antiinflamatória para estes fármacos, e modelos *in vivo* demonstram que seu uso pode ser benéfico no tratamento de diferentes distúrbios cerebrais envolvendo inflamação (STÜVE *et al.*, 2003). Muitas substâncias têm sido investigadas quanto a sua capacidade antiinflamatória, através da intervenção em diferentes estágios do processo. Neste contexto, o reino vegetal atua como uma importante fonte de recursos na busca por substâncias com esta atividade.

A única espécie do gênero *Psychotria* avaliada quanto à atividade antiinflamatória foi *P. insularum*, utilizada tradicionalmente em Samoa no tratamento de “inchaço”, febre, desconforto abdominal, incontinência, abscesso, catarata, queimadura, diarreia, dor em geral e reumatismo. Extratos de *P. insularum* foram submetidos a testes *in vitro* e *in vivo*, que resultaram na inibição significativa do edema induzido em orelha de ratos e da biossíntese de prostaglandinas catalisada pela enzima cicloxigenase 1 (DUNSTAN *et al.*, 1997).

II.1.2. Agentes Oxidantes

Os radicais livres são constituídos principalmente pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo que a disparidade entre sua produção e eliminação pelos mecanismos antioxidantes endógenos caracteriza o estresse oxidativo (AUDDY *et al.*, 2003; AZZI *et al.*, 2004). O aumento na produção de radicais pode causar danos nas membranas celulares, por peroxidação de lipídeos, ligações cruzadas das proteínas, inativação de enzimas e lesão do DNA, constituindo fatores causais relevantes em doenças neurodegenerativas (AUDDY *et al.*, 2003; EL-SHERBINY *et al.*, 2003). Além disso, patologias como isquemia e inflamação, por exemplo, podem induzir a formação de radicais livres (CUZZOCREA *et al.*, 2001).

Altas concentrações de radicais livres foram detectadas no cérebro de pacientes com Alzheimer, doença de Parkinson e demência (MONTINE *et al.*, 2004). A isquemia é caracterizada pela ativação de fosfolipases, que aumentam a liberação de ácido araquidônico, contribuindo para a geração de EROs e peroxidação de lipídeos, responsáveis pela lesão cerebral (ADIBHATLA e HATCHER, 2006). O estresse oxidativo parece estar envolvido na neurotoxicidade das placas β -amilóides, características da doença de Alzheimer (STACKMAN *et al.*, 2003). PARIHAR *et al.* (2004) demonstraram que hipocampo e córtex são regiões cerebrais altamente susceptíveis a lesões oxidativas, corroborando os déficits de memória e aprendizado apresentados por pacientes com Alzheimer, já que essas estruturas são as principais responsáveis por tais funções cognitivas, sendo intensamente afetadas pelas formações amilóides.

A doença de Parkinson é marcada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra. Esta perda neuronal pode ser causada pelo processo de auto-oxidação intracelular de dopamina (DA), pela enzima monoamino oxidase A (MAO-A), que gera H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio formado pode ser convertido em radicais hidroxila, contribuindo para o estresse oxidativo observado em pacientes com Parkinson (HALD e LOTHARIUS, 2005).

Os sistemas cerebrais endógenos de defesa contra radicais livres empregam diferentes vias de inativação, como a vitamina E ou α -tocoferol, que inibe a

peroxidação de lipídeos, e a quelação de metais. Entretanto, o uso de antioxidantes que se acumulam no tecido neuronal são candidatos em potencial para prevenção ou tratamento de desordens envolvendo lesão oxidativa (BALU *et al.*, 2005).

Grande número de plantas é utilizado para o tratamento de doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, além de perda de memória e outras desordens cerebrais. Dentre estas, *Sida cordifolia*, *Evolvulus alsinoides* e *Cynodon dactylon* apresentaram intensa atividade antioxidante em ensaios para inibição da formação de radicais livres e lipoperoxidação (AUDDY *et al.*, 2003). O extrato de sementes de uvas administrado em ratos, aumentou o desempenho em testes de memória, diminuiu a formação de EROs e a oxidação de proteínas nos córtices, estriados e hipocampos dos animais (BALU *et al.*, 2005). O extrato de *Hypericum perforatum* apresentou efeito antioxidante em ratos com distúrbios de memória e aprendizado induzidos pela administração de escopolamina. Um efeito antioxidante sobre o sistema nervoso central foi observado para o extrato das sementes de *Celastrus paniculatum*, empregado pela medicina chinesa contra distúrbios cognitivos (HOWES e HOUGHTON, 2003).

De acordo com SAHA *et al.* (2004), em *screening in vitro* com plantas medicinais da Malásia, os extratos metanólicos de folhas e caules de *Psychotria rostrata* demonstraram ação antioxidante mais alta que a dos padrões α -tocoferol e quercetina no teste com tiocianato férrico; resultados comparáveis aos do padrão butilidroxitolueno (BHT) no teste com ácido tiobarbitúrico e baixa atividade como seqüestrador de radicais livres, frente ao radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila ou (DPPH). Nenhum relato foi encontrado na literatura sobre a ação antioxidante de outras espécies do gênero, o que torna válida a investigação desta atividade, já que os alcalóides de *Psychotria* apresentam grande diversidade de efeitos farmacológicos.

II.1.3. Inibição da acetilcolinesterase

A enzima acetilcolinesterase é o principal componente das sinapses colinérgicas cerebrais. Possui a função biológica de bloquear a transmissão do impulso colinérgico através da hidrólise rápida da acetilcolina (AHMED *et al.*, 2006), neurotransmissor predominante no hipocampo e no córtex cerebral, áreas relacionadas à memória e aprendizado. A deficiência de acetilcolina, principalmente nas regiões corticais, constitui uma característica marcante da doença de Alzheimer, sugerindo que a privação colinérgica nessas áreas esteja implicada nos distúrbios cognitivos típicos dos estágios iniciais da doença (HOUGHTON *et al.*, 2004; GRÖN *et al.*, 2006).

Uma das estratégias utilizadas para compensar o déficit de acetilcolina é o uso de substâncias capazes de aumentar seletivamente a função colinérgica nas fendas sinápticas, através da inibição da enzima acetilcolinesterase (BARNES *et al.*, 2000; AHMED *et al.*, 2006). Os inibidores da colinesterase constituíram o primeiro tratamento farmacológico aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para Alzheimer e são, ainda hoje, os compostos mais efetivos empregados na terapêutica (OH *et al.*, 2004; STANDRIDGE, 2004). Estes agentes não impedem a progressão da doença, mas estabilizam a perda cognitiva e auxiliam a manutenção das funções globais (MICHAELIS, 2003). Neste contexto, o reino vegetal constitui uma importante fonte para a descoberta de novos inibidores da acetilcolinesterase.

Galantamina é a substância ativa do primeiro medicamento de origem vegetal (RAZADYNE[®]) utilizado para o tratamento da doença de Alzheimer. Este alcalóide foi isolado pela primeira vez em *Galantus* spp., sendo encontrado em muitas espécies da família AMARYLLIDACEAE (HEINRICH e TEOH, 2004). O uso de galantamina aumentou significativamente a concentração de acetilcolina no hipocampo e atenuou o prejuízo na memória espacial por indução nos receptores NMDA (MULDER *et al.*, 2005).

A partir da espécie *Huperzia serrata*, utilizada pela medicina chinesa em problemas de perda de memória, foi isolado o alcalóide huperzina A, um inibidor da colinesterase com índice terapêutico superior ao da tacrina e fisostigmina, capaz de atenuar os déficits cognitivos e promover a neuroproteção em pacientes com

Alzheimer (HOWES e HOUGHTON, 2003; ZANGARA, 2003; LIANG e TANG, 2004). O extrato de alcalóides dos bulbos das espécies *Crinum jagus* e *Crinum glaucum*, usadas na Nigéria na perda de memória, apresentaram atividade anticolinesterásica, sendo que o fracionamento bioguiado permitiu o isolamento de hamaina e licorina (HOUGHTON *et al.*, 2004).

Entre os alcalóides indólicos, coronaridina, voacangina, rupicolina, ibogamina, ibogaina, abogalina, voacalotina e afinisina, isolados de *Tabernaemontana australis*, apresentaram atividade inibidora da acetilcolinesterase no ensaio sobre CCD, sendo que os cinco primeiros foram ativos nas mesmas concentrações dos padrões de referência fisostigmina e galantamina (0,01 mM) (ANDRADE *et al.*, 2005). Apesar de a literatura científica apresentar grande número de publicações a respeito da atividade de plantas sobre a colinesterase, não foram encontrados relatos sobre a influência de extratos ou alcalóides isolados de espécies de *Psychotria* sobre esta enzima.

II.1.4. Doença de Alzheimer, inflamação e estresse oxidativo

A doença de Alzheimer é um distúrbio cerebral degenerativo e progressivo, complexo e multifatorial, caracterizado pela perda da memória e diminuição da capacidade cognitiva (ANEKONDA e REDDY, 2005). Suas principais características patológicas são: a deficiência colinérgica, a deposição de placas amilóides (placas senis) e a formação entrelaçamentos neurofibrilares (KUME *et al.*, 2005).

A presença de processos inflamatórios nas áreas cerebrais afetadas por deposições β -amilóides foi caracterizada pela identificação de um grande número de astrócitos e células da microglia ativadas nessas regiões, além de citocinas inflamatórias (McGEER e McGEER, 2003; ANEKONDA e REDDY, 2005; HOOZEMANS *et al.*, 2006). Considerando que a ativação glial está relacionada à lesão tecidual na inflamação, sua presença nas placas senis demonstra que o processo inflamatório contribui para a patologia da doença de Alzheimer (HOOZEMANS *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que pacientes que recebem tratamento antiinflamatório contra artrite ou artrite reumatóide apresentam considerável redução no risco de desenvolvimento de Alzheimer (McGEER e McGER, 2003). Dessa maneira, uma das estratégias para o tratamento da doença envolve o uso de antiinflamatórios não esteróides, com o objetivo de suprimir a atividade microglial, reduzindo a lesão cerebral por deposição amilóide (ANEKONDA e REDDY, 2005).

As citocinas podem apresentar um efeito sinérgico com outros mediadores inflamatórios, ativando a infiltração de leucócitos e conduzindo a uma superprodução de radicais livres no local da lesão. Leucotrienos como LTB₄, são mediadores importantes, pois ativam as células inflamatórias e estimulam a produção de citocinas, acentuando a geração de radicais livres, prolongando, conseqüentemente, a inflamação tecidual (AGHA e MANSOUR, 2000).

Pesquisas sugerem que o estresse oxidativo seja um dos principais fatores envolvidos no desenvolvimento e progressão do Alzheimer. Estudos indicam que a ação de radicais livres sobre os lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos é mais intensa em pacientes afetados por esta enfermidade (ANEKONDA e REDDY, 2005). A exposição à proteína amilóide aumentou a lipoperoxidação e oxidação protéica em culturas celulares, da mesma forma que é observado um aumento da peroxidação lipídica e da oxidação do DNA mitocondrial em cérebros de pacientes com Alzheimer (JHOO *et al.*, 2004). A injeção intracerebroventricular de proteína β -amilóide causou déficits de memória em ratos avaliados pelo teste *water maze*. Segundo JHOO *et al.* (2004), o tratamento com o antioxidante α -tocoferol melhorou o desempenho dos animais nos testes de memória e aumentou a atividade da enzima SOD em hipocampo e córtex. Através desses resultados, os autores verificaram que o estresse oxidativo contribui para a neurotoxicidade induzida pela proteína β -amilóide. O uso de α -tocoferol na suplementação da dieta tem demonstrado efeitos benéficos em estudos antioxidantes em pacientes com Alzheimer, indicando que a vitamina E pode exercer um efeito direto no tratamento da doença (ANEKONDA e REDDY, 2005).

Algumas espécies vegetais empregadas na medicina tradicional da China e Índia para o tratamento de distúrbios neurológicos e neurodegenerativos apresentaram atividade antiinflamatória e antioxidante como é o caso de *Celastrus*

paniculatus, *Centella asiática* e *Ginkgo biloba* (HOWES e HOUGHTON, 2003). Muitas misturas de plantas são utilizadas tradicionalmente no tratamento da doença de Alzheimer em países orientais como China, Coréia e Japão. Entre estas se destaca a combinação entre *Ginkgo biloba* e *Panax ginseng*, usada pela medicina chinesa, que aumentou os níveis de acetilcolina em cérebros de ratos submetidos à lesão induzida por proteína amilóide (ANEKONDA e REDDY, 2005).

O desenvolvimento de estratégias para o tratamento da doença de Alzheimer tem sido progressivo e inclui a avaliação de substâncias antiinflamatórias, antioxidantes, anti-amilóides e pró-colinérgicas. Contudo, o sucesso da aplicação dessas estratégias terapêuticas requer ainda investigações minuciosas quanto a seus efeitos benéficos e adversos.

II.2. MATERIAIS E MÉTODOS

II.2.1. Equipamentos e materiais

Placas de acrílico contendo poços de 500 μ L cada; filtros de membrana em nitrato de celulose Millipore (13 mm x 8 μ m poro), microscópio Nikon Alpha Phot-2 YS-2, câmara de Neubauer, cromatoplasmas de gel de sílica GF Merck, centrífuga Excelsa 206 BL Fanem.

II.2.2. Determinação da atividade antiinflamatória *in vitro*

A investigação da atividade antiinflamatória *in vitro* foi realizada segundo método padronizado nesta Faculdade por SUYENAGA (2002), empregando o ensaio da câmara de Boyden, modificada por ZIGMOND e HIRSCH (BOYDEN, 1962; ZIGMOND e HIRSCH, 1973; MELLO *et al.*, 1992), através da avaliação da inibição da migração de leucócitos polimorfonucleares, processo chamado quimiotaxia. A câmara de BOYDEN é composta por duas placas de acrílico, contendo poços com capacidade de 500 μ L cada, dispostas uma sobre a outra, sendo que os poços formam dois compartimentos separados por um filtro de nitrocelulose. Os compartimentos inferiores foram preenchidos com solução contendo o fator quimiotático, enquanto os superiores continham a amostra dispersa em suspensão de neutrófilos na concentração de 100 μ g/mL. A migração dos neutrófilos através do filtro, seguindo o gradiente quimiotático, foi avaliada e comparada ao controle, que foi obtido pela quimiotaxia da suspensão de leucócitos sem a amostra (fig. II.1). Para a obtenção do plasma e da suspensão de neutrófilos, foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 180 e 220 g.

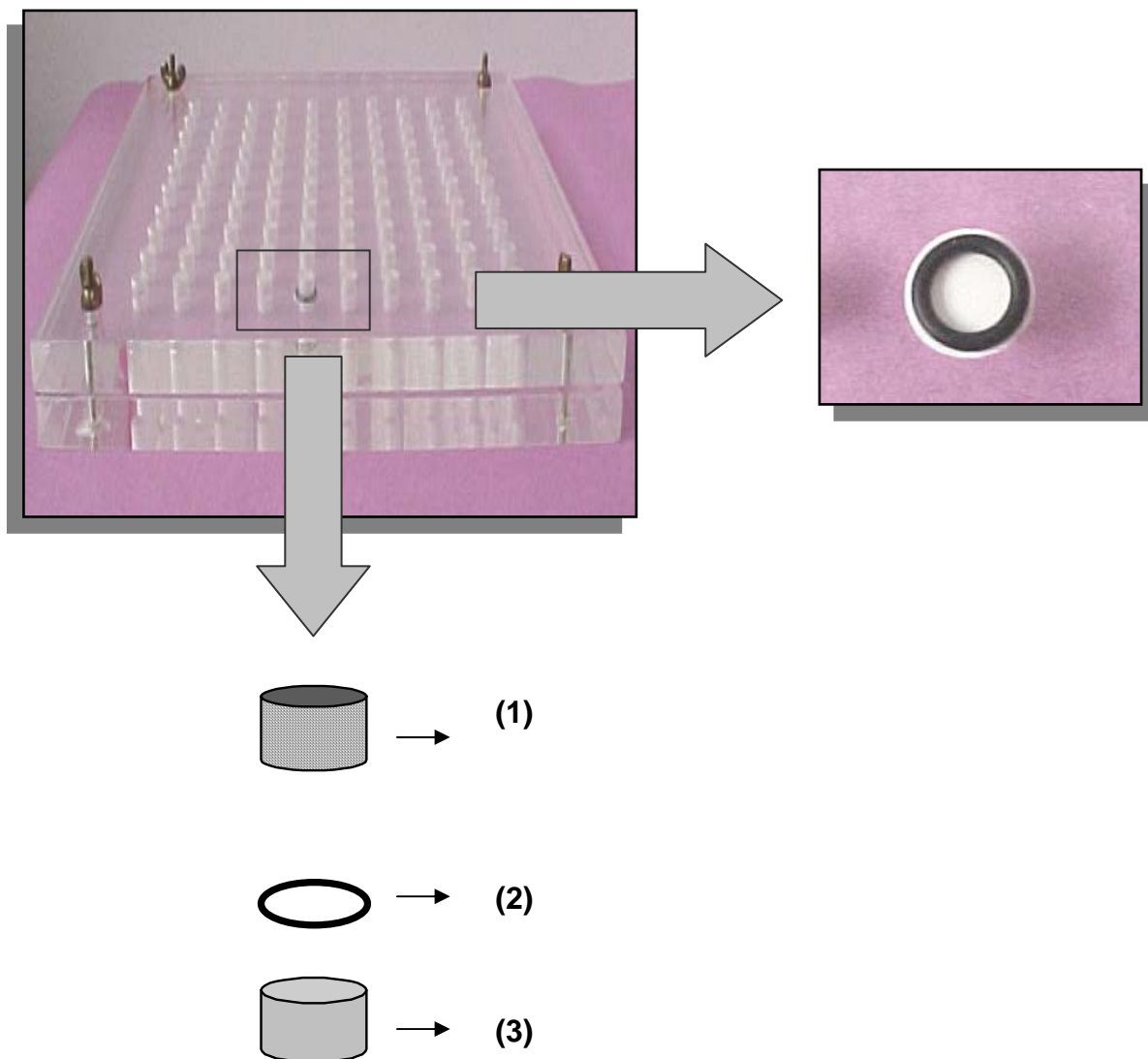


Figura II.1: Montagem da câmara de Boyden; (1) Compartimento superior: suspensão de neutrófilos + amostra; (2) filtro de nitrato de celulose; (3) compartimento inferior: plasma + fator quimiotático.

II.2.2.1. Obtenção do fator quimiotático

O fator quimiotático foi obtido pela incubação de uma solução de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), na concentração de 65 µg/mL, em plasma de ratos, por 30 minutos a 37 °C. A presença de antígenos como o LPS no plasma ativa a formação de quimiocinas, desencadeando os eventos envolvidos no processo inflamatório responsáveis pela atração dos leucócitos até o local da lesão. Após a incubação, o plasma foi diluído (V/V) em solução tampão de Hanks a 4%.

II.2.2.2. Suspensão de neutrófilos

Para a obtenção dos neutrófilos, uma solução de 20 mL de glicogênio 1% foi administrada na cavidade peritoneal de um rato. Após um período de quatro horas, o animal foi sacrificado e recebeu uma injeção intraperitoneal de 60 mL de solução de Hank's, contendo 1 UI/mL de heparina. O líquido da cavidade peritoneal foi recolhido e centrifugado, as células foram lavadas com tampão de Hanks e diluídas até uma contagem de $1,5 \times 10^6$ células em câmara de Neubauer. O extrato e os alcalóides isolados foram dissolvidos nessa solução de neutrófilos e 500 µL foram adicionados ao compartimento superior da câmara.

II.2.2.3. Determinação da atividade migratória dos leucócitos

As câmaras foram preparadas em duplicata para cada amostra e incubadas em atmosfera úmida por 1 hora, a 37 °C. Posteriormente, os filtros foram removidos, fixados, corados e diafanizados por 12 horas em xilol. Os filtros foram montados entre lâmina e lamínula, sendo que a leitura foi realizada sob microscopia óptica, com objetiva de 40 vezes. Com o foco no plano superior do filtro, o plano de

observação do microscópio foi aprofundado até a visualização de apenas duas células em foco. A distância medida em micrômetros permitiu avaliar a capacidade migratória dos neutrófilos (ZIGMOND e HIRSH, 1973). A leitura foi feita através da avaliação de cinco campos diferentes em cada filtro e os resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (epm). A análise estatística foi realizada empregando o teste “t” de Student. Foram analisados o extrato EBA e seus alcalóides isolados: ácido strictosidínico, miriantosina e strictosamida, além de uma amostra autêntica de vincosamida, isolada de *P. leiocarpa* e possivelmente presente no extrato, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

II.2.3. Determinação da atividade antioxidante

Uma amostra de vincosamida, isolada de folhas de *P. leiocarpa*, os extratos butanólico e diclorometano de folhas de *Psychotria myriantha*, além dos alcalóides ácido strictosidínico e miriantosina, foram avaliados quanto a atividade antioxidante frente ao radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

Soluções das amostras em metanol e da substância de referência boldina, na concentração de 1 mg/mL, foram aplicadas sobre as cromatoplacas quantidades correspondentes a 10, 25 e 50 μg . Após a secagem, as placas foram reveladas com solução metanólica de DPPH a 0,2%. A aspensão com DPPH confere à placa uma coloração púrpura, sendo que um resultado positivo é evidenciado pela formação de manchas amareladas, indicando a inibição do radical livre (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

II.2.4. Atividade inibidora da acetilcolinesterase

Vincosamida, EDA, EBA e os alcalóides isolados de *Psychotria myriantha* foram avaliados quanto a sua influência sobre a enzima acetilcolinesterase, empregando o método de bioautografia descrito por MARSTON *et al.* (2002). A solução estoque contendo a enzima foi preparada pela dissolução da acetilcolinesterase (1000 U) em tampão Tris com pH 7,8, acrescido de albumina bovina, para conferir estabilidade enzimática. As cromatoplasmas foram eluídas com acetona para a remoção de possíveis impurezas. As amostras foram dissolvidas em metanol e aplicadas sobre a sílica, sendo posteriormente, submetidas à secagem com ar frio para a remoção completa do solvente. A substância de referência para o teste foi galantamina, na dose de 10 µg por aplicação. A placa foi borrifada com a enzima e incubada em atmosfera úmida, por 20 minutos a 37 °C. Uma solução de acetato de naftila em etanol (2,5 mg/mL) e uma solução aquosa de Fast Blue B (2,5 mg/mL) foram preparadas imediatamente antes do uso. Após a incubação, a placa foi aspergida com uma mistura de 10 mL da solução de acetato de naftila e 40 mL de Fast Blue, adquirindo coloração púrpura (fig. II.2), à exceção das áreas onde a enzima foi inibida, que não desenvolveram coloração.

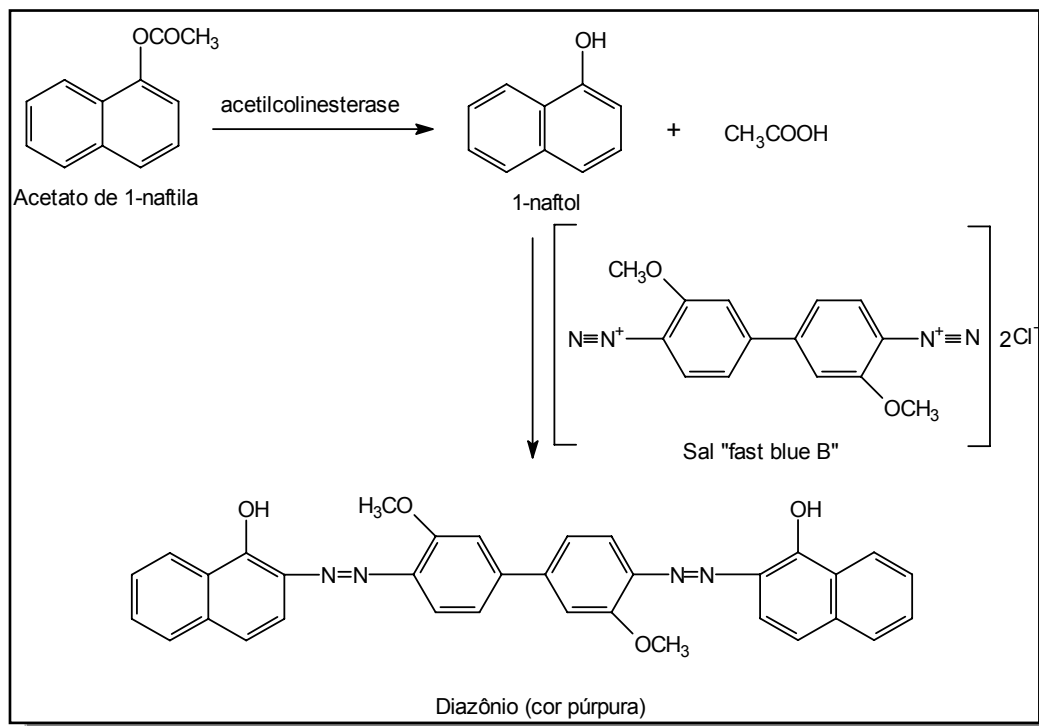


Figura II.2: Reação da acetilcolinesterase com acetato de naftila, formando um composto com coloração púrpura (MARSTON *et al.*, 2002).

II.2.5. Atividade analgésica

Os testes para a avaliação da atividade analgésica do extrato e do alcalóide isolado de *P. myriantha* foram desenvolvidos no laboratório de Farmacologia da UFRGS, com a colaboração da Profa. Dra. Mirna B. Leal.

II.2.5.1. Animais de Experimentação

Foram utilizados camundongos CF1 albinos, machos e adultos, com peso entre 35 – 40g, fornecidos pela Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Os animais foram mantidos com livre acesso a água e alimento em ciclos de claro/escuro de 12 horas, em ambiente com temperatura controlada (22 °C), sendo que sua manipulação foi realizada de acordo com os princípios éticos descritos por GOLDIM (1995). Quarenta e cinco minutos antes do início dos experimentos, os animais foram ambientados individualmente em caixas de acrílico (20 x 20 x 20 cm) para redução do comportamento exploratório e do fator novidade, capazes de promover a liberação de opióides endógenos (NETTO *et al.*, 1987).

II.2.5.2. Tratamento

Foram realizados experimentos utilizando administração intraperitoneal (i.p.) aguda de extrato EBA e de ácido estrictosidínico. Para o teste de dor induzida por capsaicina, EBA foi testado nas doses 200,0 e 500,0 mg/kg e MK 801 (0,3 mg/kg). No ensaio da retirada da cauda ao estímulo térmico (*Tail flick*) empregou-se, EBA (10,0; 100,0 e 500,0 mg/kg) e ácido estrictosidínico (4,0 e 20,0 mg/kg) , sendo que naloxona (15,0 mg/kg i.p.) foi empregada para reverter o efeito analgésico. Ambos os experimentos utilizaram grupos controle positivo, tratados com morfina (6,0 mg/kg), e controles negativos, onde os animais receberam solução salina ou DMSO 10%.

II.2.5.3. Ensaio de dor induzida por capsaicina

O método adotado foi adaptado de SAKURADA *et al.* (1992) e CORRÊA *et al.* (1996). Após o período de habituação, os animais foram divididos em grupos e receberam a administração de morfina (6,0 mg/kg) e MK 801 (15,0 mg/kg), solução

salina e EBA (200 e 500 mg/kg). Trinta minutos depois, os camundongos receberam injeção subcutânea de 20 µL de capsaicina (1,6 µg/pata solubilizado em solução salina) na superfície plantar da pata traseira direita, com o auxílio de uma seringa Hamilton com agulha de 26-gauge, sendo observados por 5 minutos. O tempo que os animais consumiram lambendo a pata (*licking*) foi cronometrado e considerado como indicativo de dor. Os resultados foram expressos como percentual de inibição de *licking* e avaliados através de ANOVA, seguida de Student Newman Kewus (SNK).

II.2.5.4. Tail flick (retirada da cauda ao estímulo térmico)

O método aplicado foi adaptado de NETTO *et al.* (1987) e RAMBADRAN *et al.* (1989). A cauda de camundongos foi disposta sobre um feixe de luz, com tempo máximo de permanência fixado em 10 segundos, para evitar lesões teciduais. O tempo necessário para a retirada da cauda, denominado tempo de reação ou linha de base de latência, foi obtido através da média de três medidas pré-tratamento. Animais que apresentaram duas medidas iguais ou acima de seis segundos foram descartados. Imediatamente após a última medida pré-tratamento, os animais foram divididos em grupos e receberam morfina (6,0 mg/kg), EBA (10, 100 e 500 mg/kg), naloxona + morfina (15,0 + 6,0 mg/kg), naloxona + EBA (15,0 + 500 mg/kg), ácido estrictosidínico (4,0 e 20,0 mg/kg) e naloxona + ácido estrictosidínico (15,0 + 20,0 mg/kg), por via i.p. após 30 minutos, foram realizadas três medidas, cuja média foi considerada como tempo de reação pós-tratamento. Os dados foram apresentados como % de Efeito Máximo Possível (%EMP), resultantes da seguinte fórmula: $\% \text{ EMP} = (T_1 - T_0 / T_2 - T_0) \times 100$, onde T_1 = média pós-tratamento, T_0 = média pré-tratamento e T_2 = teto máximo do experimento (10 s). Os resultados foram analisados através do teste estatístico de ANOVA, seguida de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney.

II.3. RESULTADOS

II.3.1. Determinação da atividade antiinflamatória *in vitro*

Os resultados da avaliação da atividade antiinflamatória *in vitro* sobre quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares são apresentados na tabela II.1. Tanto o extrato butanólico quanto os alcalóides isolados e a amostra autêntica de vincosamida demonstraram uma redução significativa ($p < 0,5$) da migração de leucócitos quando comparados ao controle, com cerca de 90% de inibição da quimiotaxia.

Tabela II.2: Resultados do teste da câmara de Boyden para extrato e alcalóides isolados de *P. myriantha* (100 $\mu\text{g/mL}$).

Amostra (100 $\mu\text{g/mL}$)	Migração (μm)	% de Inibição
controle	129,2 \pm 1,69	0
EBA	12,4 \pm 0,84*	90,4
ácido strictosidínico	12,6 \pm 0,97*	90,24
miriantosina	14,6 \pm 0,97*	88,7
strictosamida	13,4 \pm 0,96*	89,63
vincosamida	12,8 \pm 1,03*	90,1
* $p < 0,5$ Teste "t" de Student		

II.3.2. Determinação da atividade antioxidante

Os extratos EDA e EBA e os alcalóides estricotosamida, vincosamida, ácido strictosidínico e miriantosina não apresentaram resultado positivo no teste em cromatoplasmas para detecção de atividade antioxidante quando revelados com solução de DPPH 0,2% em metanol. A placa cromatográfica, após a revelação,

apresentou total coloração violácea, indicando que não houve seqüestro do radical livre DPPH nas regiões onde as amostras teste foram aplicadas, indicando que *Psychotria myriantha* não possui atividade antioxidante por captura de radicais livres.

II.3.3. Atividade inibidora da acetilcolinesterase

Na avaliação da atividade sobre a acetilcolinesterase foram testados EBA, EDA, ácido strictosidínico, miriantosina, strictosamida e vincosamida. Os extratos e alcalóides foram aplicados na placa teste nas seguintes quantidades de 10, 25, 50, 100 e 150 µg por ponto de aplicação. Nenhuma das amostras testadas em 10 ou 25 µg foi capaz de inibir a atividade enzimática. Com 50 µg, miriantosina demonstrou um descoramento sutil na região central do ponto de aplicação da amostra, sendo que o mesmo foi observado para o ácido strictosidínico com 100 µg. Uma fraca, mas detectável, inibição da acetilcolinesterase foi observada para EDA e EBA (300 µg), ácido strictosidínico e miriantosina com a aplicação de 150 µg em comparação com a substância de referência galantamina, 10 µg (fig. II.3).

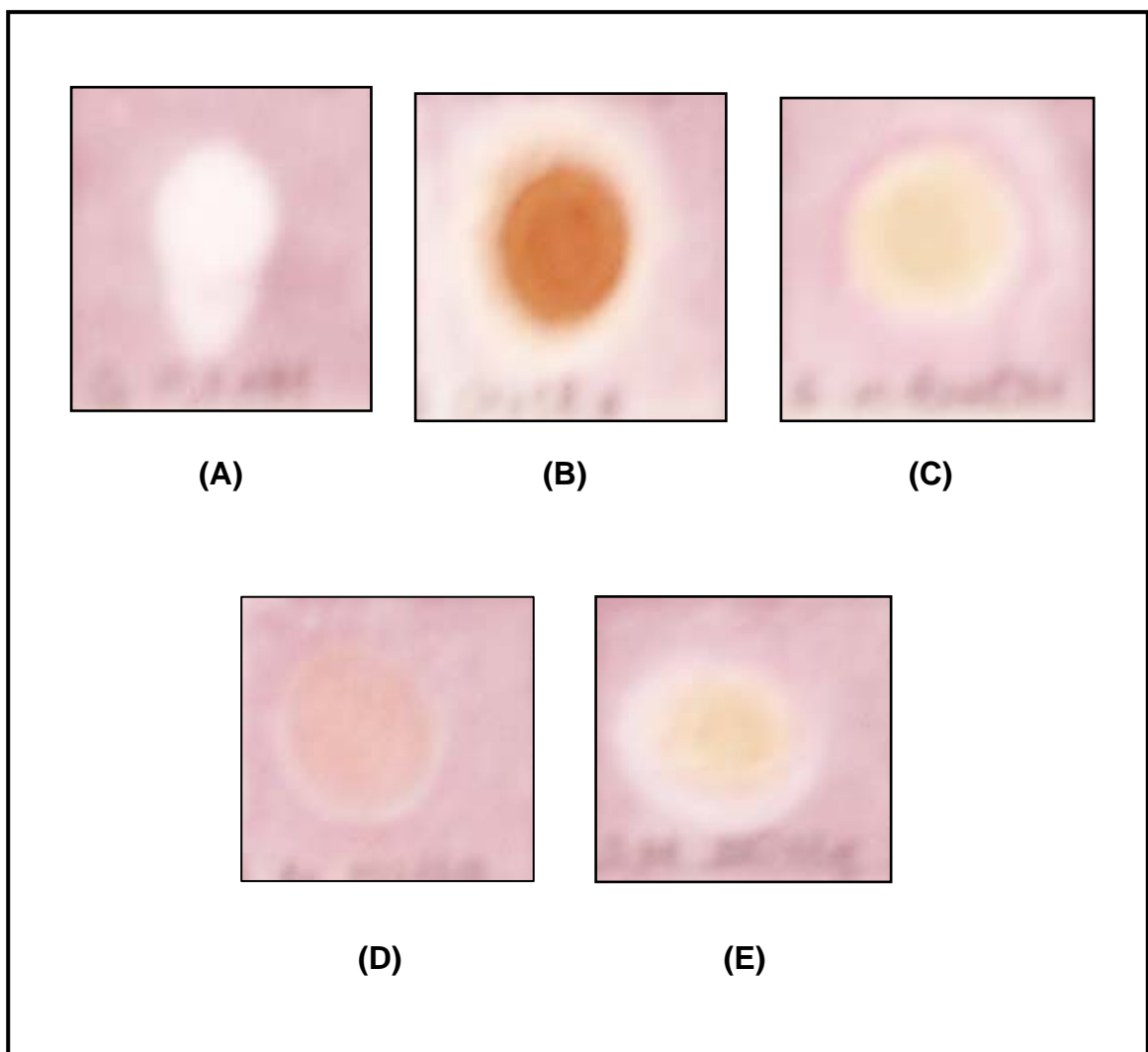


Figura II.3: Inibição da atividade da enzima acetilcolinesterse (A) galantamina; (B) EDA, 300 μg ; (C) EBA, 300 μg ; (D) ácido strictosidínico, 150 μg e (E) miriantosina, 150 μg .

II.3.4. Atividade analgésica

II.3.4.1. Ensaio de dor induzida por capsaicina

Os resultados da avaliação da atividade analgésica de EBA no teste da dor induzida por capsaicina são apresentados na tabela II.3.

Tabela II.3: Efeito do extrato EBA (200 e 500 mg/kg) isolado de *P. myriantha* no teste da dor induzida por capsaicina (morfina 6 mg/kg, MK-801 0,3 mg/kg). Dados expressos em % de inibição de *licking* ± E.P.M.

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	Licking	% Inibição
salina		6	74,9 ± 12,6	0
DMSO		6	66,2 ± 11,2	11,63
morfina	6,0	6	0 ± 0*	100
MK 801	15,0 / 6,0	6	5,6 ± 1,30*	92,5
EBA 200	200	6	32,8 ± 7,1*	56,20
EBA 500	500	6	30,6 ± 6,4*	59,10

* = p < 0,01 em relação ao veículo. ANOVA / SNK.

O ato de lambem as patas (*licking*) é uma resposta dos camundongos ao estímulo doloroso causado pela injeção de capsaicina. O tratamento com morfina foi considerado como controle positivo, por apresentar 100% de inibição do *licking*, indicando a ausência de dor; enquanto o grupo tratado com salina representou o controle negativo, onde os animais consumiram mais tempo lambendo as patas. Nos grupos tratados com EBA 200 e 500 mg/kg ocorreu uma redução de 56 e 59% no *licking*, respectivamente, indicando que a atividade analgésica não é dose-dependente.

II.3.4.2. Tail flick (retirada da cauda ao estímulo térmico)

No ensaio da retirada da cauda frente a um estímulo térmico (*tail flick*), utilizado para avaliar a atividade analgésica central, foram testados EBA (10, 100 e 500 mg/kg), ácido estrictosidínico (4 e 20 mg/kg), morfina como controle positivo e naloxona, para reverter o efeito opióide. Os resultados são apresentados na tabela II.4.

Os animais tratados com o extrato EBA ou ácido estrictosidínico, em todas as doses testadas, apresentaram aumento no tempo de reação, efeito que foi revertido pela naloxona, indicando uma atividade analgésica do tipo opióide.

Tabela II.4: Efeito do extrato EBA (200 e 500 mg/kg) e ácido estrictosidínico (4 e 20 mg/kg) no teste da retirada da cauda ao estímulo térmico (morfina 6 mg/kg, naloxona 15 mg/kg, morfina + naloxona 6/15 mg/kg). Dados expressos em % de efeito máximo possível \pm E.P.M.

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	Pré (s)	Pós (s)	% EMP
salina		10	3,8 \pm 0,3	3,7 \pm 0,3	0
DMSO		10	3,1 \pm 0,4	3,8 \pm 0,3	10,45
morfina	6,0	10	4,3 \pm 0,2	10,0 \pm 0,1	99,8^{*\$}
naloxona / morfina	15,0 / 6,0	10	4,0 \pm 0,3	4,7 \pm 0,5	11,02
EBA10	10,0	6	3,6 \pm 0,3	5,7 \pm 1,0	33,33
EBA100	100,0	7	4,2 \pm 0,4	7,3 \pm 0,6	53,4^{**}
EBA500	500,0	9	3,8 \pm 0,3	7,1 \pm 0,6	52,4^{**#}
naloxona / EBA 500	15,0 / 500,0	8	4,0 \pm 0,3	4,7 \pm 0,5	12,9
ác. estrictosidínico 4	4,0	6	4,2 \pm 0,3	7,4 \pm 0,9	55,9^{**}
ác. estrictosidínico 20	20,0	6	4,6 \pm 0,2	7,6 \pm 1,1	55,8^{*\$}
naloxona / ác. estric. 20	15,0 / 20,0	6	3,6 \pm 0,2	3,8 \pm 0,3	3,26

*=p<0,05; ** =p<0,01 em relação ao veículo; # = p<0,05 em relação ao mesmo grupo pré-tratado com naloxona; \$= p<0,01 em relação ao mesmo grupo pré-tratado com naloxona. Kruskal-Wallis/Mann-Witney

II.4. DISCUSSÃO

O gênero *Psychotria*, caracterizado pela presença de alcalóides indólicos, apresenta usos populares diversos e variadas atividades farmacológicas descritas na literatura, sendo que grande parte dos estudos refere-se às plantas do subgênero *Psychotria* e a seus alcalóides polindólicos. Entretanto, são limitadas as referências a respeito da farmacologia das espécies de *Heteropsychotria*, onde se destacam os compostos indol monoterpênicos. Neste contexto, os extratos e produtos isolados de *P. myriantha* foram submetidos a testes rápidos empregando ensaios *in vitro* e cromatografia em camada delgada, para investigação de suas possíveis atividades antiinflamatória, antioxidante e inibidora da acetilcolinesterase, além de ensaios *in vivo* para a detecção de atividade analgésica periférica e central.

Resultados positivos no teste com DPPH indicam uma ação antioxidante por seqüestro de radicais livres (SAHA *et al.*, 2004). Estas espécies reativas são altamente relevantes na isquemia, danos no sistema nervoso central e na patologia de inúmeras doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (EL-SHERBINY *et al.*, 2003; BALU *et al.*, 2005; HALD e LOTHARIUS, 2005; BLOMGREN e HAGBERG, 2006). Os extratos EDA, EBA e os alcalóides isolados apresentaram resultados negativos na avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH, empregando cromatografia em camada delgada.

Psychotria rostrata, única espécie estudada quanto à ação sobre processos oxidativos, apresentou atividade antioxidante nos testes do ácido tiobarbitúrico e tiocianato férrico, apresentando fraco efeito frente ao DPPH. Além disso, demonstrou inibição da produção de óxido nítrico induzida por LPS e INF- α em macrófagos (SAHA *et al.*, 2004). Em resumo, os resultados sugerem a inibição da lipoperoxidação como o mecanismo de ação antioxidante de *P. rostrata*, sendo ineficiente na captação de radicais livres. Da mesma forma, os resultados obtidos para os derivados de *P. myriantha* indicam que estes não atuam como seqüestradores de radicais livres, embora outras vias de ação antioxidante não tenham sido investigadas.

Os radicais livres e o estresse oxidativo gerado por estes estão intensamente relacionados à resposta inflamatória, já que a migração de leucócitos até o local da

lesão ativa o processo de fagocitose, que libera EROs (OKOLI e AKAH, 2004). A quimiotaxia de leucócitos é uma etapa fundamental no processo inflamatório, sendo diretamente proporcional à intensidade da resposta. Dessa forma, sua inibição indica um efeito antiinflamatório e uma redução na formação de radicais livres (OKOLI e AKAH, 2004).

Pouco se sabe sobre a influência de espécies de *Psychotria* sobre a inflamação, a não ser pela atividade de *P. insularum*, que demonstrou ação antiinflamatória por inibição da síntese de prostaglandinas e redução do edema induzido em orelha de rato (DUNSTAN *et al.*, 1997). Em contrapartida, *P. myriantha* apresentou uma inibição de cerca de 90% na migração de leucócitos induzida por LPS no ensaio da câmara de Boyden, sugerindo uma potente atividade antiinflamatória, embora este ensaio *in vitro* não reconstitua a distribuição fisiológica de quimiocinas endoteliais apresentadas pelas paredes dos vasos sanguíneos no tecido vivo (CINAMON e ALON, 2003). As quimiocinas constituem importantes sinalizadores para os leucócitos, sendo produzidas em diversos tecidos orgânicos, incluindo os tecidos cerebrais, onde são elementos essenciais na formação da neuroinflamação presente em doenças neurodegenerativas (BIBER *et al.*, 2002). Por essa razão, a realização de testes em modelos animais para a confirmação da atividade antiinflamatória de *P. myriantha* é necessária.

Além da ação antiinflamatória, *P. myriantha* foi capaz de inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase, responsável pela degradação da acetilcolina. Anticolinesterásicos são os principais agentes terapêuticos empregados no tratamento da doença de Alzheimer (OH *et al.*, 2004; STANDRIDGE, 2004; BARNES *et al.*, 2000; AHMED *et al.*, 2006). Galantamina e huperzina A constituem os principais inibidores da acetilcolinesterase de origem natural empregados em testes clínicos em pacientes com Alzheimer (HOWES e HOUGHTON, 2003; ZANGARA, 2003; HEINRICH e TEOH, 2004; LIANG e TANG, 2004). Os extratos e os alcalóides: ácido strictosidínico e miriantosina, testados por bioautografia, inibiram a enzima em doses acima de 50 µg, elevadas quando comparadas à substância de referência galantamina, com atividade de 0,0001 a 1 µg (MARSTON, *et al.*, 2002). Galantamina demonstrou ser um potente inibidor da acetilcolinesterase, enquanto *P. myriantha* apresentou uma fraca atividade.

O extrato de alcalóides totais de *Psychotria myriantha*, obtido por extração com diclorometano, foi avaliado quanto ao efeito analgésico no teste da placa quente em camundongos, apresentando atividade comparável à da morfina (6 mg/kg) na dose de 200 mg/kg, sendo dose-dependente e parcialmente revertido por naloxona (BOTH *et al.*, 2002a). Esse resultado pode indicar o envolvimento de receptores do tipo opióide em seu mecanismo de ação.

Para a verificação da possível ação analgésica, EBA foi submetido aos testes da dor induzida por capsaicina (200 e 500 mg/kg) e da retirada da cauda frente ao estímulo térmico (10, 100 e 500 mg/kg). As doses do extrato EBA utilizadas no teste da capsaicina foram determinadas de acordo com LEAL (1994), onde o extrato etanólico de *P. myriantha* apresentou atividade analgésica do tipo opióide na dose de 350 mg/kg, e BOTH *et al.* (2002), que verificaram a ação analgésica para o extrato diclorometano na dose de 200 mg/kg. A ausência de diferença significativa entre os resultados obtidos com 200 e 500 mg/kg no teste da capsaicina incentivou a investigação das doses de 10 e 100 mg/kg no teste do estímulo térmico, a fim de verificar a existência de uma resposta dose-dependente nesta faixa. A determinação das doses de ácido strictosidínico empregadas neste trabalho foi baseada nos experimentos de REANMONGKOL *et al.* (2000).

Os resultados aparentemente não dose-dependentes, que foram comparáveis à morfina e MK-801 e revertidos por naloxona, sugerindo atividade analgésica do tipo opióide. O modelo de dor induzida por capsaicina, costuma ser empregado para avaliação da atividade antinociceptiva periférica, através da observação do comportamento animal de lambe a pata após a injeção da capsaicina. Contudo, este ensaio pode também ser usado na avaliação da atividade antiinflamatória, visto que mediadores da inflamação podem induzir este comportamento (BURNS *et al.*, 2006; SAWYNOK *et al.*, 2006). Assim, a ação antinociceptiva de EBA no modelo da capsaicina pode estar relacionada com a atividade antiinflamatória apresentada pelo extrato, o que deve ser avaliado pela realização do experimento empregando maiores tempos de observação.

O extrato EBA é constituído por duas substâncias majoritárias: ácido strictosidínico e miriantosina. Segundo REANMONGKOL *et al.* (2000), o alcalóide ácido strictosidínico (5 – 20 mg/kg) possui atividade analgésica periférica, visto que

não aumentou a latência da dor no ensaio térmico da placa quente. Essas informações permitiram a formulação da hipótese de que a atividade analgésica central sugerida para o extrato butanólico de *P. myriantha* poderia estar relacionada com a presença da miriantosina neste extrato. Para a confirmação desta proposta, foi delineado um experimento onde camundongos tratados com ácido strictosidínico (4 e 20 mg/kg) e EBA (10, 100 e 500 mg/kg) foram submetidos ao teste da retirada da cauda ao estímulo térmico, com o objetivo de confirmar os resultados de REANMONGKOL *et al.* (2000). Contudo, neste experimento, ácido strictosidínico demonstrou atividade analgésica central, reversível por naloxona e não-dose dependente, com resultados muito similares aos de EBA.

Ensaio de dor derivados de estimulação térmica são seletivos para a ação analgésica central, mas não periférica (REANMONGKOL *et al.*, 2000). As doses de ácido strictosidínico de 4 e 20 mg/kg foram selecionadas por representarem, respectivamente, o conteúdo de alcalóide em EBA e o tratamento utilizado no experimento de REANMONGKOL *et al.* (2000). Como os resultados para o alcalóide isolado foram similares àqueles obtidos para o extrato no teste de retirada da cauda, foi possível atribuir a atividade de EBA ao ácido strictosidínico. A divergência entre as atividades do alcalóide nos testes para ação analgésica central, envolvendo estímulo térmico, pode decorrer do fato de que o tratamento animal no presente trabalho foi realizado por via intraperitoneal, enquanto REANMONGKOL *et al.* (2000) utilizaram administração oral do alcalóide, sugerindo que a ação do metabolismo de primeira passagem reduza a disponibilidade do ácido strictosidínico.

O alcalóide indol monoterpênico psicolatina, isolado de *P. umbellata*, demonstrou atividade analgésica central, envolvendo receptores do tipo opióide e glutamatérgico, por ação sinérgica com MK-801, um antagonista NMDA (BOTH, 2001; BOTH *et al.*, 2002; BOTH *et al.*, 2006), além de ação ansiolítica e antidepressiva através de atuação sobre receptores do tipo 5-HT_{2A/C} (BOTH *et al.*, 2005). A atividade analgésica central de *P. myriantha* permite sugerir que espécies do subgênero *Heteropsychotria* constituem uma fonte potencial de substâncias com atividade sobre o sistema nervoso central.

Psychotria myriantha apresentou atividades antiinflamatória e inibidora da acetilcolinesterase, efeitos que podem atuar de forma sinérgica no tratamento de

doenças neurodegenerativas que envolvam catecolaminas e neuroinflamação, como é o caso de Alzheimer e Parkinson. Estudos indicam que a estimulação colinérgica pode reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias no sistema nervoso central e que receptores colinérgicos estão presentes em linfócitos e células auto-imunes (NIZRI *et al.*, 2005). YOON *et al.* (2005) indicam que uma injeção intratecal de neostigmina, um inibidor da acetilcolinesterase, ativa os receptores muscarínicos, liberando catecolaminas que contribuem para o efeito antiinflamatório, além de diminuir ou até suprimir a migração de leucócitos induzida em camundongos. O aumento nos níveis de acetilcolina induzido por neostigmina pode produzir pronunciados efeitos antiinflamatórios periféricos (YOON *et al.*, 2005). NIZRI *et al.* (2005) demonstram que compostos bi-funcionais, contendo uma porção com atividade antiinflamatória e outra colinérgica, constituem substâncias potenciais para o tratamento de desordens neuroinflamatórias. Segundo os pesquisadores, a ativação dos receptores nicotínicos colinérgicos em macrófagos de camundongos pode regular as reações inflamatórias, diminuindo a produção de óxido nítrico e prostaglandinas em culturas de astrócitos. Estes compostos foram capazes de reduzir os sintomas neurológicos em ratos com encefalomielite induzida. Segundo NIZRI *et al.* (2005), a combinação de antiinflamatórios não esteróides e agentes colinérgicos pode atuar nos sistemas imunológico central e periférico.

A combinação das atividades analgésica, antiinflamatória, através da inibição da quimiotaxia, e inibidora da acetilcolinesterase, apesar de pouco pronunciada, conduz à investigação da influência de *P. myriantha* sobre diferentes sistemas e funções cerebrais, como por exemplo, os níveis de aminas biogênicas em estruturas cerebrais de ratos.

CAPÍTULO III

**ATIVIDADE DO ÁCIDO ESTRICTOSIDÍNICO SOBRE OS
NÍVEIS DE AMINAS BIOGÊNICAS EM ESTRUTURAS
CEREBRIAS DE RATOS**

III. INTRODUÇÃO

Os impulsos nervosos são transmitidos aos músculos, glândulas e aos neurônios pós-sinápticos através de mediadores químicos específicos, os neurotransmissores. Entre as substâncias capazes de atuar como neurotransmissores centrais destacam-se os aminoácidos, acetilcolina, catecolaminas, serotonina, histamina, peptídeos e outras substâncias reguladoras como purinas e citocinas (BLOOM, 2001; BEAR *et al.*, 2002). As catecolaminas noradrenalina (NA), adrenalina (AD) e dopamina (DA), juntamente com a indolamina serotonina (5-HT) são conhecidas como aminas biogênicas (fig. III.1).

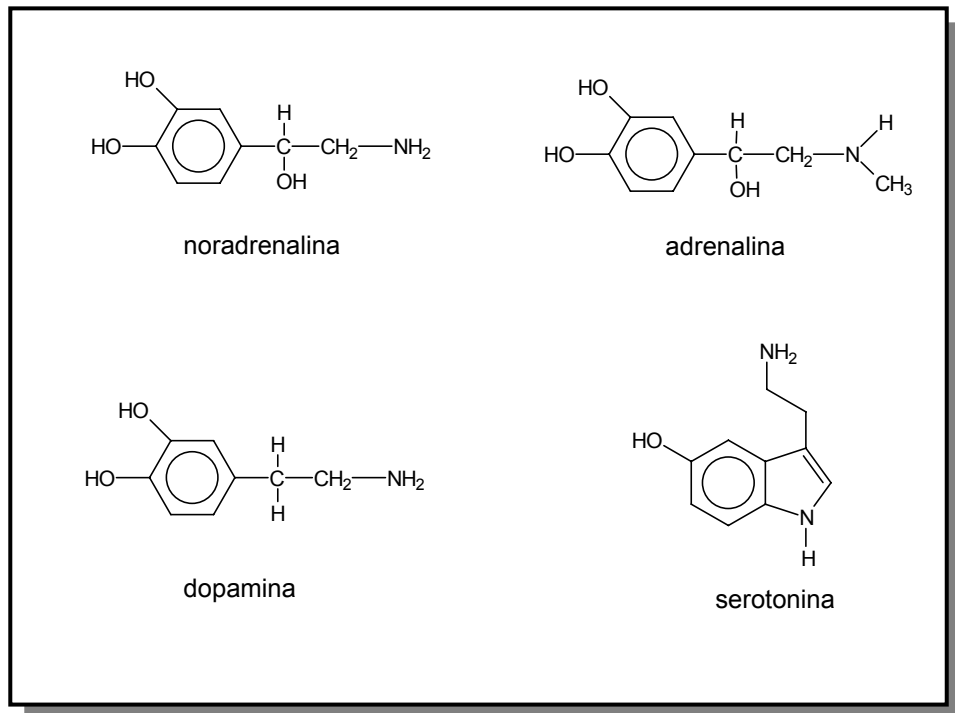


Figura III.1: Estrutura das aminas biogênicas.

As aminas biogênicas são moléculas de importância crucial no reino animal, estando presentes no sistema nervoso central da maioria das espécies. São implicadas na regulação de um grande número de sistemas fisiológicos e comportamentais (AUGER *et al.*, 2000). Entre os invertebrados, como baratas e

grilos, as catecolaminas regulam os movimentos e a locomoção; modulam interações sociais em crustáceos e formigas; e participam do processo de aprendizado em abelhas. Nos vertebrados superiores, estão envolvidas na regulação do sono, humor e emoções (AUGER, 2000), além dos processos de memória e aprendizado (NALINI *et al.*, 1995).

Alterações na síntese ou no metabolismo de aminas biogênicas constituem um fator importante na fisiopatologia de inúmeras doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (GREENFIELD e VAUX, 2002). As enfermidades degenerativas do sistema nervoso mostram, freqüentemente, predileção por um tipo específico de neurônios. Na doença de Parkinson, por exemplo, que é caracterizada por distúrbios motores, são atingidos principalmente os neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal, havendo diminuição dos níveis normais de dopamina nos centros cerebrais envolvidos (STEFFEN, 1994). Esta catecolamina desempenha importante papel no controle da função motora e sensitiva (NAGATSU, 2002). Os números normais de sinapses mantidas pelas aminas biogênicas são cruciais para a aquisição do aprendizado e memória. Decréscimos nos níveis de aminas biogênicas, causados por desordens no desenvolvimento do SNC, estão associadas com retardo mental e dificuldades de desenvolvimento como a síndrome de Rett, autismo e síndrome de Down (OKADO *et al.*, 2001).

Devido a sua importante função em processos fisiológicos, comportamentais e cognitivos, como memória e aprendizado, as aminas biogênicas têm sido extensivamente estudadas. Assim, na literatura científica, são encontrados estudos avaliando a influência da administração de drogas de abuso e fármacos sobre as concentrações das catecolaminas e indolaminas em animais de laboratório, permitindo observar seus efeitos e sugerir seus possíveis mecanismos de ação sobre o sistema nervoso central, além de permitir a verificação da interação entre os diversos sistemas neurais (JOHNSON e KNOWLES, 1983; NAGATSU *et al.*, 1986; PRABHU *et al.*, 1994; ZHU *et al.*, 1995; NALINI *et al.*, 1995; STEFFEN *et al.*, 1995; De La Cruz *et al.*, 1996; SUDHA *et al.*, 1996; HERRERA-MARSCHITZ *et al.*, 1997; SPECTOR *et al.*, 1998; VICENTE-TORRES *et al.*, 2002; MACÊDO *et al.*, 2004). Os níveis de aminas biogênicas podem ser quantificados por técnicas como fluorimetria (WOOD e HALL, 2000), voltametria (BAUR *et al.*, 1988; MICHAEL e WIGHTMAN, 1999), eletroforese capilar (WALLINGFORD e EWING, 1987), quimioluminescência

(PRABHU *et al.*, 1994) e espectrometria de massas (BERGQUIST *et al.*, 2002). Apesar de ser sensível e seletiva, a detecção fluorimétrica exige a prévia derivatização das amostras, o que constitui uma desvantagem no seu emprego (NIKOLAJSEN e HANSEN, 2001). Segundo dados da literatura, o método de escolha para o doseamento de aminas biogênicas em fluidos biológicos é a cromatografia líquida de alta eficiência combinada com detecção eletroquímica (CLAE/DEQ) (BERGQUIST *et al.*, 2002), em decorrência de sua alta sensibilidade, que permite a separação e análise de componentes dentro de uma matriz complexa (PATEL *et al.*, 2005).

Apesar do limitado número de artigos relacionando o uso de plantas ou seus produtos isolados com a bioquímica cerebral, a quantificação das aminas biogênicas torna-se uma ferramenta útil na busca por substâncias com atividade sobre o sistema nervoso central, principalmente no que diz respeito às doenças neurológicas, neurodegenerativas e a cognição. Com base no importante papel desempenhado pelas aminas biogênicas como mediadoras das funções comportamentais e cognitivas normais do sistema nervoso central, como memória e aprendizado, e seu envolvimento em processos cerebrais patológicos, os objetivos deste trabalho são:

- Avaliar o efeito do ácido strictosidínico, isolado das folhas de *Psychotria myriantha*, sobre o sistema nervoso central de animais tratados, através da quantificação dos níveis das aminas biogênicas por CLAE/DEQ.
 - Otimizar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico (CLAE/DEQ) para a quantificação das aminas biogênicas em homogeneizados de hipocampos, córtices e estriados de ratos;
 - Validar o método desenvolvido quanto aos parâmetros de linearidade, precisão, limites de quantificação e detecção;

- Quantificar, por CLAE/DEQ, os níveis de DA e seus metabólitos 3-metoxitiramina (3-MT), ácido diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), e de 5-HT e seu metabólito majoritário ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), em hipocampo e córtex de ratos tratados com injeção intra-hipocampal bilateral de ácido estrictosidínico;
- Quantificar, por CLAE/DEQ, os níveis de DA, 3-MT, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA em hipocampo e estriado de ratos com tratamento agudo de ácido estrictosidínico por via intraperitoneal.

III.1. Neurotransmissores DA e 5-HT

III.1.1. Dopamina (DA)

Dopamina (3,4-diidroxifenietilamina), originada a partir da hidroxilação da tirosina, é o precursor metabólico da noradrenalina e adrenalina (fig. III.2). Contudo, os neurônios dopaminérgicos não possuem a enzima dopamina- β -hidroxilase, responsável pela formação destas monoaminas (RANG *et al.*, 2004). DA constitui cerca de 80% do conteúdo cerebral de catecolaminas (VALLONE *et al.*, 2000), sendo encontrada em grandes quantidades em regiões como corpo estriado, núcleo caudado, núcleo acumbens e tubérculo olfatório (BLOOM, 2001).

Após sua liberação, DA é recapturada pelas terminações nervosas e metabolizada pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol-*O*-metil transferase (COMT), originando o ácido diidroxifenilacético (DOPAC), 3-metóxi-tiramina (3-MT) e o ácido homovanílico (HVA), de acordo com a figura III.3 (RANG *et al.*, 2004).

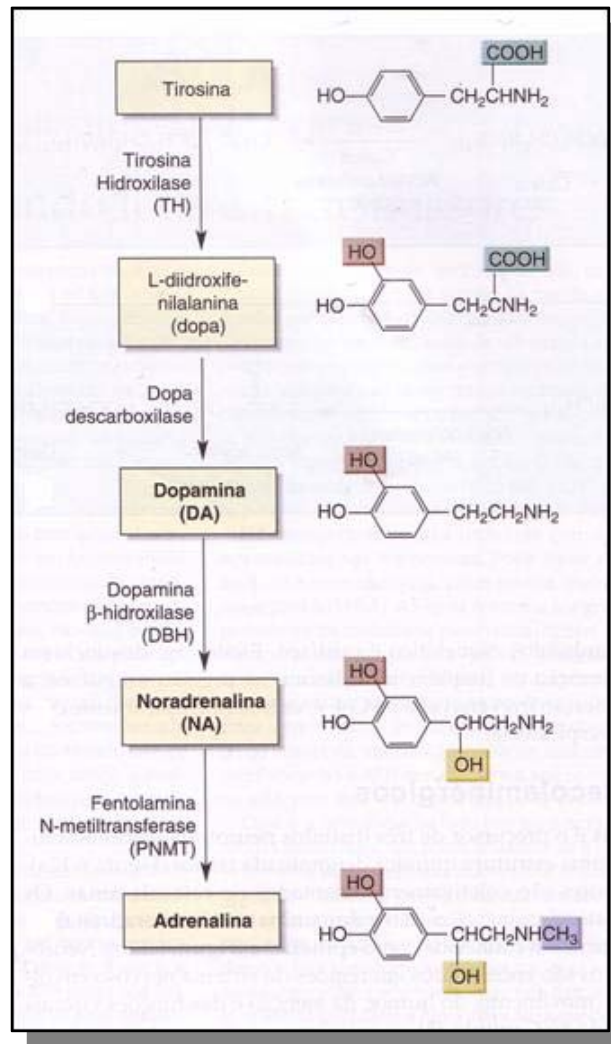


Figura III.2: Etapas da síntese enzimática de dopamina, noradrenalina e adrenalina (BEAR *et al.*, 2004).

Os neurônios dopaminérgicos podem ser classificados em quatro vias de axônios: nigro-estriatal, mesolímbica, mesocortical e tuberoinfundibular (VALLONE *et al.*, 2000). A via mesocortical parte da área tegumentar ventral e inerva diferentes regiões do córtex frontal, parecendo estar envolvida com o controle motor, atenção e memória de trabalho (PAPAZIAN *et al.* 2006). A via mesolímbica se origina na área tegumentar mediana e se projeta para o estriado ventral (núcleo acumbens), bulbo olfatório e partes do sistema límbico, estando implicada na influência do comportamento motivado (VALLONE *et al.*, 2000; PAPAZIAN *et al.* 2006). Neurônios dopaminérgicos mesolímbicos desempenham um importante papel no sistema de recompensa cerebral (FRANKEN *et al.*, 2005). Os corpos celulares de neurônios da via tuberoinfundibular partem de áreas do hipotálamo e seus axônios alcançam a

eminência média, onde liberam DA para os espaços perivasculares do plexo capilar do sistema hipotalâmico-hipofisário. As projeções que compõem a via nigro-estriatal partem da substância negra e inervam o corpo estriado. Esta via está relacionada ao controle dos movimentos e sua degeneração causa a doença de Parkinson (VALLONE *et al.*, 2000; GLICKSTEIN e SCHMAUSS, 2001).

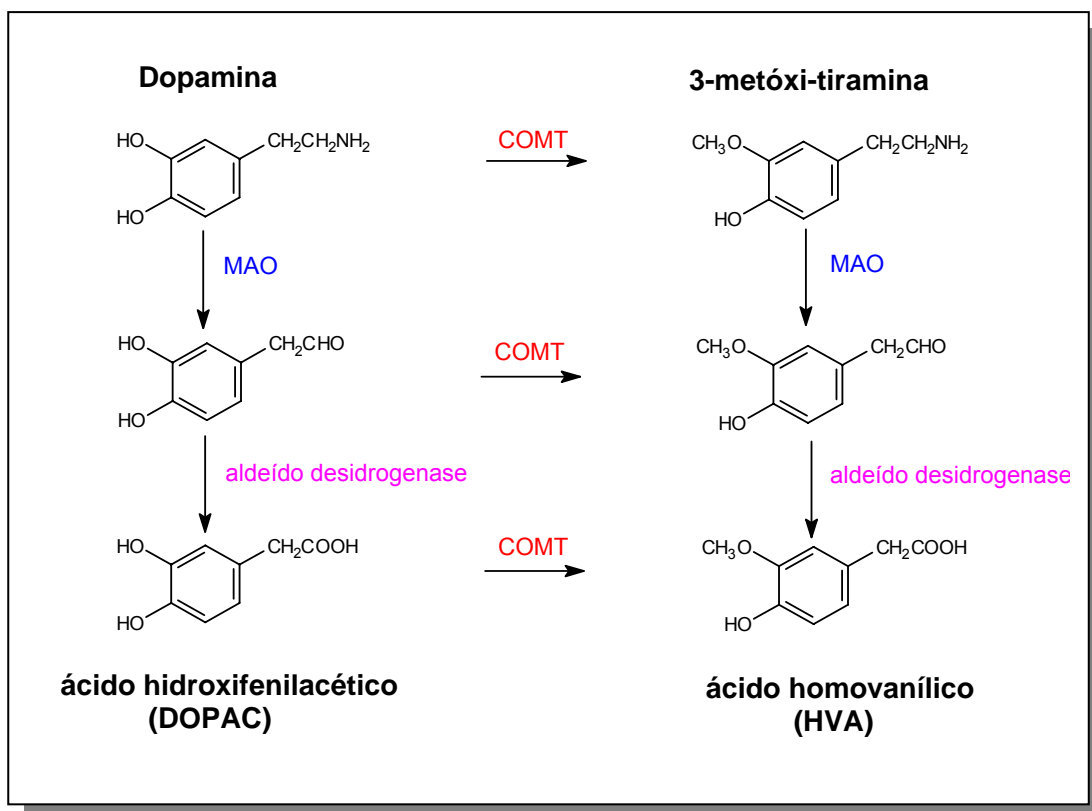


Figura III.3: Metabolismo da dopamina (RANG *et al.*, 2004).

As ações da dopamina são exercidas através da ligação a receptores específicos de membrana (BLOOM, 2001), podendo atuar igualmente em receptores adrenérgicos (EMILIEN *et al.*, 1999). A atividade glutamatérgica, através dos receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) podem modular a transmissão dopaminérgica, sendo que antagonistas NMDA, como MK-801, estimulam a liberação e o metabolismo de DA (COOK *et al.*, 2004). São relatados cinco tipos

distintos de genes que codificam receptores de DA, divididos em duas subfamílias: D_{1-like}, constituída pelos receptores D₁ e D₅, e a subfamília D_{2-like}, formada pelos receptores D₂, D₃ e D₄. Os receptores D_{1-like} ativam a adenilato ciclase, que converte ATP em AMP cíclico, enquanto a subfamília D_{2-like} inibe essa atividade (VALLONE *et al.*, 2000; BLOOM, 2001; HIROI *et al.*, 2002).

Níveis alterados de DA no sistema nervoso central parecem estar envolvidos em muitas doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, esquizofrenia, enxaqueca e distúrbios cognitivos (EMILIEN *et al.*, 1999; NYBERG *et al.*, 2002; CROPLEY *et al.*, 2006). A doença de Parkinson caracteriza-se por uma forte redução dos níveis de DA, devido à degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra (VALLONE *et al.*, 2000). A liberação dopaminérgica excessiva está relacionada com a patogênese da esquizofrenia, doença caracterizada por alterações cognitivas e emocionais, dentre os quais se destacam os surtos psicóticos (WILSON *et al.*, 1998). Os fármacos colinérgicos empregados no tratamento de Alzheimer parecem ainda realçar a liberação de dopamina (ZHANG *et al.*, 2004).

Dopamina e os receptores D₁ são essenciais para o desempenho das funções do córtex pré-frontal, responsável pelo gerenciamento da atenção e intensamente envolvido no défict de atenção e distúrbio de hiperatividade (*attention-deficit hyperactivity disorder* – ADHD) (ARNSTEN e Li, 2005; PLISZKA, 2005). Polimorfismos nos receptores D₄ e no transportador dopaminérgico DAT-1 também estão relacionados com ADHD, cujo tratamento envolve o uso de psicoestimulantes capazes de bloquear a recaptção do transportador e aumentar a liberação de DA a partir das vesículas de armazenamento (VALLONE *et al.*, 2000).

As vias dopaminérgicas, juntamente com a noradrenérgica e serotoninérgica, constituem a segunda linha de moduladores da memória, agindo em receptores do tipo D₁, principalmente no córtex pré-frontal (BEAR, 2002; GONZÁLEZ-BURGOS *et al.*, 2002; YAMASHITA e TANAKA, 2005). A ativação dos receptores por agonistas dopaminérgicos facilita os processos de memória, enquanto antagonistas os prejudicam (RAMAEKERS *et al.*, 1999; KIMBERG e D'ESPOSITO, 2003). Além de possuir uma função importante no controle motor, através da via nigro-estriatal, DA também está relacionada à memória de procedimentos, o que pode ser verificado

pela participação do estriado, rico em neurônios dopaminérgicos, na formação deste tipo de memória (YAMASHITA e TANAKA, 2005). O sistema serotoninérgico pode modular a transmissão dopaminérgica central, o que pode ser observado pelo fato de inibidores seletivos da recaptção da serotonina sensibilizarem os receptores mesolímbicos de dopamina, resultando nos efeitos extrapiramidais apresentados por estes fármacos (MILLAN *et al.*, 2000).

A neurotransmissão dopaminérgica é importante nas doenças neurodegenerativas, agindo de forma direta ou ainda através de sua ligação com os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico e glutamatérgico, tornando-se assim, uma importante ferramenta de estudo na busca por substâncias para o tratamento de distúrbios cognitivos.

III.1.2. Serotonina (5-HT)

Serotonina (5-HT; 5-hidroxitriptamina) encontra-se amplamente distribuída no reino animal, sendo que apenas 1% do conteúdo corporal de 5-HT é encontrado no cérebro; entretanto, este neurotransmissor desempenha um papel central na hegemonia neuroquímica (RANG *et al.*, 2004).

O precursor de 5-HT é o aminoácido essencial triptofano, que é convertido em 5-hidroxitriptofano pela triptofano hidroxilase (SANDERS-BUSH e MAYER, 2001; RANG *et al.*, 2004). O 5-hidroxitriptofano formado é descarboxilado em 5-HT por uma enzima aminoácido descarboxilase inespecífica. Após a liberação, 5-HT é recaptada e degradada pela MAO, formando 5-hidroindolacetaldeído, que é convertido em seu metabólito majoritário, ácido 5-hidroindolacético (5-HIAA), pela enzima aldeído desidrogenase (SANDERS-BUSH e MAYER, 2001; BEAR *et al.*, 2002; RANG *et al.*, 2004), de acordo com a figura III.4.

Os neurônios que contêm 5-HT ocorrem na parte superior do bulbo, áreas conhecidas como núcleos da rafe (RANG *et al.*, 2004). Os núcleos da rafe ventrais inervam as regiões do cérebro anterior, os caudais projetam-se com o tronco e a

medula espinhal, enquanto o núcleo mediano inerva o sistema límbico (BLOOM, 2001).

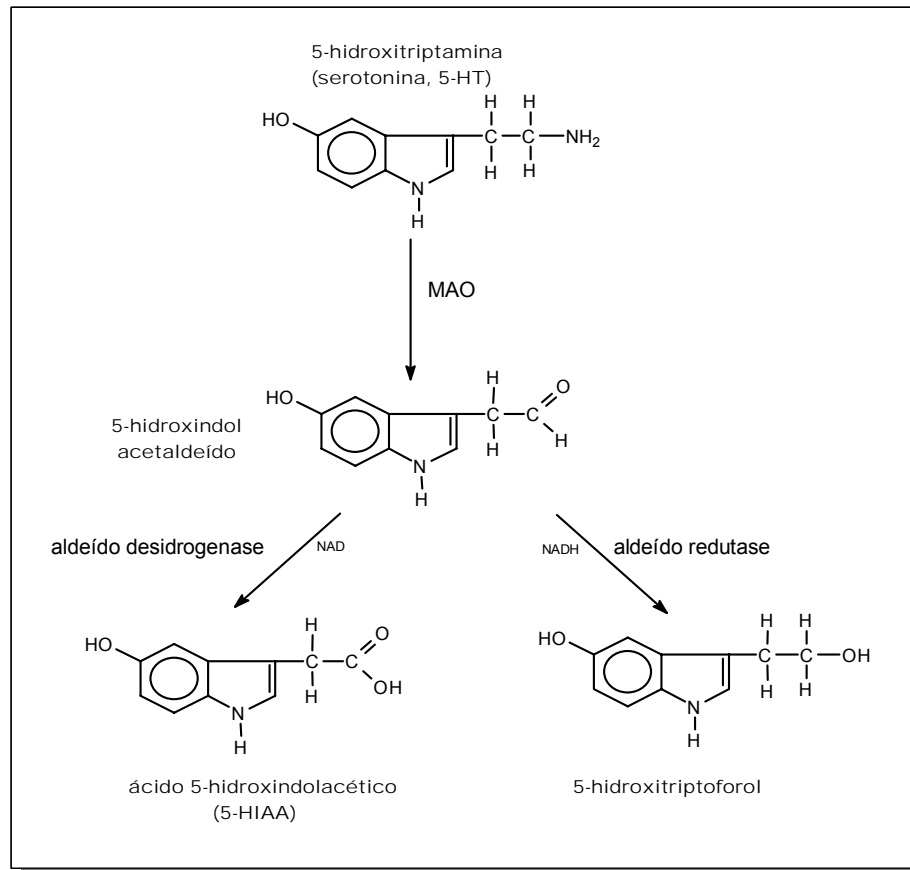


Figura III.4: Metabolismo da serotonina (RANG *et al.*, 2004).

O neurotransmissor 5-HT está envolvido em muitos processos fisiológicos, influenciando numerosas funções cerebrais, como controle de emoções, sono, percepção sensorial, atividade motora, regulação de temperatura, nocicepção, apetite, comportamento sexual, secreção hormonal e humor (BUOHT *et al.*, 2000; SANDERS-BUSH e MAYER, 2001).

Serotonina está intimamente relacionada à ansiedade e depressão, visto que os antidepressivos empregados na terapêutica objetivam o aumento da disponibilidade do neurotransmissor na fenda sináptica. Distúrbios do sono,

sintomas freqüentes em pacientes ansiosos e deprimidos, estão associados à baixo níveis de 5-HT, sendo que a terapia com inibidores da recaptção da serotonina restabelece o equilíbrio entre 5-HT e acetilcolina, reorganizando a arquitetura do sono nestes pacientes (LAM, 2006).

Foram identificados 14 subtipos distintos de receptores de 5-HT, agrupados em múltiplas classes. Os subtipos 5-HT_{1A} são encontrados em regiões como o sistema límbico, hipotálamo, hipocampo e amígdala, estando associados ao humor, emoções e ansiedade (DANIELS *et al.*, 2000). O tipo 5-HT_{1D} ocorre no córtex e estriado, sendo relacionado com a função motora. A classe 5-HT₂ está presente no neocórtex, sistema límbico e bulbo olfatório, áreas implicadas no controle de humor e emoções, comportamento estereotipado e alucinações. O subgrupo 5-HT₃ é expresso na área postrema e no sistema límbico e relaciona-se com ansiedade, êmese e ações antinociceptivas (BLOOM, 2001; RANG *et al.*, 2004).

Receptores 5HT possuem a capacidade exercer efeitos modulatórios sobre a transmissão dopaminérgica, afetando o controle motor, humor e cognição (BARNES e SHARP, 1999). 5-HT_{1A} ocorrem no estriado e núcleo acumbens, estando em maior quantidade após a degeneração nigro-estriatal (BLACKBURN, 2004). Receptores 5HT₆ são altamente expressos no estriado e córtex, sugerindo uma ligação com a função dopaminérgica, através de um mecanismo ainda não estabelecido, embora seja possível que esses receptores afetem os níveis de DA por modulação da acetilcolina (MITCHELL e NEUMAIER, 2005).

Um extensivo déficit serotoninérgico está associado à doença de Alzheimer, caracterizada pela perda de memória, sendo também responsável por sintomas como hostilidade, impulsividade e agressividade (LANCTÔT *et al.*, 2002). O comportamento agressivo e ansiedade, associados à doença, podem estar relacionados à diminuição na densidade dos receptores 5HT₆ expressos no córtex frontal e temporal (MITCHELL e NEUMAIER, 2005).

Muitos artigos científicos demonstram a ligação entre a neurotransmissão serotoninérgica e memória. MATSUKAWA *et al.* (1997) sugerem que serotonina e acetilcolina desempenham papel central na manutenção das sinapses hipocampais e aquisição de memória em ratos. Segundo OKADO *et al.* (2001), 5-HT facilita a

formação e manutenção das sinapses, representando um ponto fundamental na aquisição de aprendizado e memória.

Serotonina e seus receptores representam alvos potenciais para o desenvolvimento de fármacos que possam atuar de forma favorável no tratamento de déficits de memória e cognição, além de depressão, ansiedade e doenças como Alzheimer, Parkinson e esquizofrenia.

III.2. Aminas biogênicas nas doenças neurodegenerativas e processos de memória

III.2.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma enfermidade neurodegenerativa que se caracteriza pela formação de placas senis e emaranhados neurofilbrilares, particularmente no neocórtex e no hipocampo (FRANCIS *et al.*, 1999; MACCIONI *et al.*, 2001; ACKL *et al.*, 2005), produzindo um comprometimento gradual e progressivo da capacidade cognitiva, que afeta inicialmente a memória recente (VIANA, 1999; STANDAERT e YOUNG, 2001). Com a progressão do distúrbio, são atingidas as habilidades visioespaciais, a capacidade de fazer cálculos, o manuseio de objetos e ferramentas comuns, ocorrendo alterações de comportamento e personalidade. Os sintomas típicos do estágio severo da doença são: incontinência, dificuldade de deglutição, alterações no humor, agressividade e demência (VIANA, 1999; STANDAERT e YOUNG, 2001).

STORGA *et al.* (1996) sugerem que, além do déficit colinérgico, Alzheimer apresente uma deficiência nos demais sistemas neurotransmissores, principalmente o dopaminérgico. De acordo com DRINGENBERG (2000), a interação entre os sistemas colinérgicos e monoaminérgicos é responsável pelas alterações cognitivas e corticais típicas da doença.

Mudanças na neurotransmissão serotoninérgica podem estar ligadas aos distúrbios comportamentais descritos para Alzheimer, tais como depressão, agressividade e disfunção cognitiva (FRANCIS *et al.*, 1999; LANCTÔT *et al.*, 2002). Analisando áreas corticais de 22 pacientes, GARCIA-ALLOZA *et al.* (2005) demonstraram que o desequilíbrio entre os sistemas colinérgico e serotoninérgico contribuía para os sintomas da doença e que o alto conteúdo de serotonina está diretamente relacionado à hiperatividade e psicose.

Os dados apresentados evidenciam a importância das catecolaminas e indolaminas neurotransmissoras na patologia da doença de Alzheimer, demonstrando que o estudo destes sistemas neuronais representa uma ferramenta indispensável para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento desta enfermidade.

III.2.2. Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico crônico caracterizado por delírios, alucinações, agitação psicomotora e quadros psicóticos (GRAEFF *et al.*, 2001). A patogênese da doença está relacionada com a “hipótese dopaminérgica”, segundo a qual o aumento na transmissão central de DA resulta na psicose esquizofrênica (STIP *et al.*, 2005). Dessa forma, a maioria dos fármacos empregados no tratamento desta desordem neuropsiquiátrica atua sobre os receptores de dopamina (WERKMAN *et al.*, 2006). Segundo revisão publicada por WILSON *et al.* (1998), a redução dos sintomas por agentes antipsicóticos é mediada pelo bloqueio dos receptores D₂. Pacientes esquizofrênicos apresentam deficiências na memória de trabalho, que conduzem a uma falha na condução de comportamentos e formação de idéias (MANOACH, 2003).

A investigação sobre os efeitos da administração crônica de antipsicóticos atípicos sugere a existência de uma ligação entre a transmissão serotoninérgica e esquizofrenia, uma vez que fármacos utilizados no tratamento da doença demonstram afinidade por receptores 5-HT (WERKMAN *et al.*, 2006), como é o caso

da clozapina, que atua como um antagonista 5-HT₆ (MITCHELL e NEUMAIER, 2005). O mecanismo da patofisiologia da esquizofrenia baseou-se, por muitos anos, na “hipótese dopaminérgica”. Contudo, o conhecimento atual aponta para o fato de que, além da transmissão dopaminérgica, outros neurotransmissores podem ser responsáveis pelos distúrbios comportamentais típicos da doença.

III.2.3. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é uma condição neurodegenerativa caracterizada pela intensa redução dos níveis de DA nigro-estriatal, devido à degeneração neurônios dopaminérgicos (VALLONE *et al.*, 2000). Os sintomas típicos são: rigidez muscular, tremores, bradicinesia e distonia (CALNE *et al.*, 1994). O tratamento da doença consiste principalmente na administração de L-DOPA (L-diidroxifenilalanina), o precursor metabólico de DA. Agonistas dopaminérgicos também tem sido empregados para aumentar a atividade motora e reduzir a progressão dos sintomas associados com a doença (TRUONG *et al.*, 2003).

Os distúrbios de ansiedade frequentemente ocorrem junto com a doença de Parkinson, podendo atuar como importantes causas de morbidade entre indivíduos acometidos por esta enfermidade. Pacientes com Parkinson têm demonstrado alta prevalência de sintomas como fobia social e transtorno do pânico, estreitamente relacionados com a ansiedade e os níveis cerebrais de serotonina (STEIN *et al.*, 1990; RICHARD, 2005). Fármacos inibidores seletivos da recaptação da serotonina, utilizados no tratamento da ansiedade e depressão, podem reduzir os efeitos extrapiramidais da doença de Parkinson, já que o sistema serotoninérgico central atua como um modulador da transmissão dopaminérgica nigro-estriatal, indicando a interação entre os sistemas neurotransmissores (PIRES *et al.*, 2005). Além dos distúrbios motores, Parkinson têm sido associada à déficits de memória e aprendizado, principalmente no que diz respeito ao aprendizado de habilidades motoras (VINGERHOEST *et al.*, 2005).

III.2.4. Memória e aprendizado

Memória pode ser conceituada como a retenção e evocação de informações adquiridas (BEAR *et al.*, 2002; IZQUIERDO e IZQUIERDO, 2004), podendo ser dividida em dois grandes grupos: declarativa ou explícita, que depende da evocação consciente de um dado, fato ou evento, e não declarativa (implícita, de procedimentos ou procedurais), que independe da ação da consciência (SQUIRE, 1987; TULVING e MARKOWITSCH, 1998; BEAR *et al.*, 2002).

As memórias declarativas referem-se a fatos e eventos, ou a episódios vividos (BEAR *et al.*, 2002), sendo processadas no lobo temporal medial, que contém o hipocampo e áreas corticais adjacentes: córtex entorrinal, perirrinal e parahipocampal (SQUIRE e ZOLA, 1991). As memórias de procedimentos constituem as memórias para o desempenho de tarefas motoras, aprendizado de habilidades, formação de hábitos e comportamentos (BEAR *et al.*, 2002), e envolvem principalmente o estriado e o cerebelo (BEAR *et al.*, 2002; IZQUIERDO e IZQUIERDO, 2004).

As vias dopaminérgicas, juntamente com a noradrenérgica e serotoninérgica, constituem a segunda linha de moduladores da memória, agindo predominantemente em receptores do tipo D₁ no córtex pré-frontal (BEAR, 2002; GONZÁLEZ-BURGOS *et al.*, 2002; YAMASHITA e TANAKA, 2005). A ativação dos receptores por agonistas dopaminérgicos facilita os processos de memória, enquanto antagonistas os prejudicam (RAMAEKERS *et al.*, 1999; KIMBERG e D'ESPOSITO, 2003).

Os neurônios do mesotencéfalo e da substância negra são bastante relevantes na retenção de memórias declarativas de curta e longa duração, (HEFCO *et al.*, 2003). Segundo SHOHAMY *et al.* (2005), o déficit dopaminérgico no mesencéfalo pode ocasionar os distúrbios de memória e aprendizado observado em pacientes com doença de Parkinson.

III.3. Plantas medicinais e distúrbios do sistema nervoso central

A medicina tradicional tem sido empregada por séculos no tratamento das mais diversas doenças, tornando-se uma importante fonte para a descoberta de novos compostos bioativos. Assim, o estudo etnofarmacológico permitiu a publicação de muitos artigos referentes à utilização de plantas no tratamento de distúrbios cognitivos e doenças neurodegenerativas (tab. III.1) como Alzheimer, que apresenta a perda de memória como sintoma primário (GRAFMAN *et al.*, 1990; FÖRSTL *et al.*, 1995; DESGRANGES *et al.*, 1998).

Tabela III.1: Espécies utilizadas pela medicina tradicional para o tratamento de doenças neurológicas e degenerativas e suas atividades farmacológicas sobre o sistema nervoso central.

Espécie	Uso tradicional	Local	Atividade farmacológica
<i>Nardostachys jatamansi</i>	tratamento de epilepsia, histeria, síncope e fragilidades mentais (PRABHU <i>et al.</i> , 1994)	Índia	Tratamento agudo - aumento nos níveis de 5-HT e 5-HIAA em cérebros de ratos (PRABHU <i>et al.</i> , 1994) Tratamento crônico - aumento nos níveis de NA, DA, 5-HT e 5-HIAA (PRABHU <i>et al.</i> , 1994)
<i>Celastrus paniculatus</i>	estimulante do intelecto e fortalecedor da memória (HOWES e HOUGHTON, 2003)	Índia	Melhora nos processos de memória e aprendizado (NALINI <i>et al.</i> , 1995) Aumento no Q.I. em crianças com deficiências mentais (NALINI <i>et al.</i> , 1995) Reversão do déficit cognitivo induzido por escopolamina (GATTU <i>et al.</i> , 1997)
<i>Centella asiatica</i>	antioxidante	China	Intensificação da cognição, através de seu mecanismo antioxidante no sistema nervoso central (KUMAR e GUPTA, 2002) Atividades tranquilizante, sedativa, antidepressiva e colinomimética <i>in vivo</i> (HOWES e HOUGHTON, 2003)
<i>Evolvulus alsinoides</i>	antiepilética e intensificadora da memória (SIRIPURAPU <i>et al.</i> , 2005)	Índia	Propriedades adaptogênicas e antiamnésicas em modelos de estresse (SIRIPURAPU <i>et al.</i> , 2005)
<i>Crinum sp.</i>	perda de memória (HEINRICH e TEOH, 2004 HOUGHTON <i>et al.</i> , 2004)	Nigéria	atividade inibidora da acetilcolinesterase (HOUGHTON <i>et al.</i> , 2004)

Na revisão bibliográfica publicada por HOWES e HOUGHTON (2003), são citadas várias plantas utilizadas nas medicinas tradicionais da Índia e China para melhorar a memória e funções cognitivas, tais como *Clitoria ternatea*, *Ginkgo biloba*, *Polygala tenuifolia*, *Salvia miltiorrhiza*, *Magnolia officinalis*, *Lycoris radiata* e *Huperzia serrata*.

Entre os alcalóides, destaca-se huperzina A, isolado de *Huperzia serrata*, constitui um dos mais promissores agentes para o tratamento da doença de Alzheimer, devido a sua capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase de forma seletiva, reversível e potente (TANG e HAN, 1999). Em ensaios com roedores, este alcalóide atenuou o déficit cognitivo e o dano neuronal no hipocampo, após isquemia global transitória (ZHOU *et al.*, 2001). Huperzina A elevou os níveis corticais de acetilcolina e a atividade da acetilcolinesterase em ratos, sendo mais potente que donepezil e rivastigmina, dois fármacos empregados no tratamento clínico da doença de Alzheimer (LIANG e TANG, 2004), e apresentou menor toxicidade que donepezil e tacrina (SHU, 1998). Este composto afeta os sistemas neurotransmissores, favorecendo o processo de memória, principalmente memória de trabalho (OU *et al.*, 2001), além de melhorar o déficit cognitivo causado pela hipoperfusão cerebral em ratos (WANG *et al.*, 2000). Este alcalóide tem sido submetido ao teste clínico duplo cego controlado por placebo em pacientes com Alzheimer, com significativo aumento na função cognitiva e qualidade de vida (ZANGARA, 2003).

Psicolatina, alcalóide indol monoterpênico isolado das folhas de *Psychotria umbellata*, apresentou efeito ansiolítico nas doses de 7,5 e 15 mg/kg, sem afetar a atividade locomotora ou potencializar o sono barbitúrico. Na dose de 100 mg/kg, psicolatina prejudicou a aquisição do aprendizado e consolidação da memória, sem interferir no processo de evocação. Os resultados obtidos para este alcalóide indicam um mecanismo de ação modulado por receptores do tipo 5HT_{2A/C} (BOTH *et al.*, 2005).

III.4. MATERIAIS E MÉTODOS

III.4.1. Equipamentos

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, composto por bomba Waters 510, injetor manual Rheodyne (loop de 20 μ l), detector eletroquímico Waters 464. A análise dos dados foi realizada com auxílio de Empower Softwear, homogeneizador *Ultra Turrax*, Phmetro Noxtron.

III.4.2. Metodologia para determinação de amins biogênicas

III.4.2.1. Animais de experimentação

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 200 – 250g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul ou pela Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e pelo Biotério da Fundação Universidade Federal de Rio Grande (FURG). Antes do início dos experimentos, os animais foram adaptados por 72 horas no biotério de passagem da Faculdade de Farmácia – UFRGS, mantidos em caixas plásticas com no máximo cinco animais, com livre acesso a água e alimento em ciclos de claro/escuro de 12 horas (7:00 – 19:00 h), em ambiente com temperatura controlada (23 ± 2 °C) e umidade monitorada. A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos para a experimentação animal relatados por GOLDIM (1995).

Após receberem o tratamento com ácido strictosidínico, os animais foram decapitados por guilhotina isoladamente dos demais e seus cérebros foram dissecados, sendo o equipamento limpo antes da decapitação de cada animal. O material biológico restante foi acondicionado em sacos plásticos e colocado sob

refrigeração, utilizando *freezer* específico p/ este fim, até o momento do recolhimento, realizado por empresa especializada no descarte deste material.

III.4.2.2.Tratamento

O tratamento intracerebral foi realizado de acordo com o método descrito por IZQUIERDO *et al.* (2000), com a colaboração da Profa. Dra. Daniela Martí Barros do Departamento de Ciências Fisiológicas da Fundação Universidade Federal de Rio Grande e as estruturas cerebrais congeladas foram enviadas para a Faculdade de Farmácia (UFRGS), para análise.

A administração intracerebral foi realizada pela infusão de solução contendo ácido estrictosidínico através de cânulas implantadas nos hipocampos dos ratos efixadas ao crânio com material acrílico dentário. Os animais foram anestesiados com tiopentato de sódio (40 mg/kg) e as cânulas foram implantadas bilateralmente, 1 mm abaixo da camada de células piramidais da subregião CA1 do hipocampo dorsal, com o auxílio de equipamento estereotáxico, sendo que as coordenadas (A: -4,2; L: \pm 3,0; V: +1,3) foram obtidas de acordo com atlas de anatomia de PAXIMOS e WATSON (1986). Os ratos foram sacrificados 15 minutos após a injeção, tendo seus hipocampos e córtices retirados.

Inicialmente, foi realizado um experimento piloto, onde os animais foram divididos em um grupo controle (n = 4) e quatro grupos tratados. Os grupos tratados receberam injeções intra-hipocampais bilaterais de 1 μ L de ácido estrictosidínico dissolvido em solução salina nas concentrações de 5 (n = 3), 10 (n = 4), 20 (n = 4) e 50 μ g/ μ L (n = 6), enquanto os controles receberam apenas solução salina. Após a verificação dos dados obtidos com as doses testadas, o tratamento que apresentou o melhor resultado foi repetido.

O experimento utilizando administração intraperitoneal (i.p.) aguda do alcalóide isolado foi realizado com doses iniciais de 100, 50, 25 e 10 mg/Kg de ácido estrictosidínico em solução salina, sendo esta última a dose de escolha para a

realização do experimento. Depois de transcorridos 60 minutos da administração do alcalóide, os ratos foram decapitados para a remoção dos hipocampus, córtices e estriados. Os animais controle receberam administração i.p. de solução salina, sendo que todas as estruturas cerebrais isoladas foram congeladas até o momento do processamento.

III.4.2.3. Preparação das amostras a partir das estruturas cerebrais

Os animais controle e tratados foram decapitados, as calotas cranianas foram abertas, os cérebros expostos e rapidamente dissecados sobre gelo. As estruturas cerebrais de interesse foram congeladas em gelo seco e armazenadas a -70°C até a sua utilização.

As diferentes estruturas cerebrais estudadas foram homogeneizadas com ácido perclórico 0,1M em homogeneizador *Ultra Turrax*. As amostras foram centrifugadas 1400 x g por 40 minutos a 4°C e os sobrenadantes filtrado através de filtros de 0,2 μm de poro. Os filtrados resultantes foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a detector eletroquímico (CLAE/DEQ).

III.4.2.4. Estabelecimento dos parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos de partida foram descritos por STEFFEN (1994) e sofreram algumas modificações. A fase móvel foi feita de acordo com DiBUSSOLO *et al.* (1983), modificada por STEFFEN (1994) e consiste em 100 mM de ácido fórmico, 1 mM ácido cítrico; 0,36 mM de 1-heptanosulfonato de sódio; 0,1 mM de EDTA e 2,5% de dietilamina. Esta fase móvel tem o pH ajustado a 4,2 – 4,5 e é adicionada de acetonitrila na proporção de 98:8 V/V. A eluição cromatográfica foi realizada em modo isocrático com fluxo de 0,8 mL/min, utilizando uma coluna

Spherisorb ODS1 C₁₈ (3,9 x 250 mm). O detector foi ajustado com potencial (E) de 800 mV e sensibilidade de 100 µA.

III.4.3. Validação do método analítico para quantificação de aminas biogênicas

O método foi validado para os padrões de linearidade, limites de detecção e quantificação e precisão. Os parâmetros analíticos avaliados foram determinados segundo códigos oficiais como a Farmacopéia Americana (USP, 1999), International Conference on Harmonization (ICH, 1996) e a Resolução da Agência de Vigilância Sanitária RE - Nº 899 (ANVISA, 2003). Foram preparados e analisados os homogeneizados de hipocampo e estriado de ratos controle, para a verificação dos perfis cromatográficos das estruturas cerebrais, bem como a identificação das aminas biogênicas presentes. As áreas dos picos dos cromatogramas obtidos foram comparadas às resultantes da injeção de uma mistura de padrões com concentração de 500 ng/mL de cada amina e seus metabólitos, para que fosse possível estimar as concentrações basais desses compostos nos tecidos cerebrais. A partir dos resultados, foram preparadas as soluções para a realização das curvas de linearidade destas substâncias. Os resultados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico de análise de variância (ANOVA).

III.4.3.1. Linearidade

A faixa de linearidade para cada substância foi determinada a partir de curvas de calibração com pelo menos cinco níveis de concentrações diferentes. As curvas foram obtidas em três dias consecutivos, sendo que foram realizadas três injeções (20 µl cada) para cada concentração, a partir de soluções distintas. Para cada curva, foram determinados a inclinação (a), a intersecção (b) e o coeficiente de correlação

(r). Para a aceitação das curvas de calibração, os coeficientes de correlação linear foram iguais ou superiores a 0.98 (ICH, 1996; USP, 2000, ANVISA, 2003).

III.4.3.2. Limites de detecção (LD)

O limite de detecção (LD), considerado como a menor concentração da substância capaz de ser detectada nas condições experimentais, foi estimado a partir das curvas de calibração através da fórmula: $LD = DP_{\alpha} \times 3 / IC$, onde:

- DP_{α} é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y (b) de, no mínimo, três curvas de calibração;
- IC é a inclinação (a) da curva de calibração (ICH, 1996; USP, 2000, ANVISA, 2003).

III.4.3.3. Limites de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LQ), menor concentração da substância capaz de ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, foi estimado a partir das curvas de calibração através da fórmula: $LD = DP_{\alpha} \times 10 / IC$, onde:

- DP_{α} é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y (b) de, no mínimo, três curvas de calibração;
- IC é a inclinação (a) da curva de calibração (ICH, 1996; USP, 2000, ANVISA, 2003).

III.4.3.4. Repetibilidade e Precisão Intermediária

A precisão de um método analítico é geralmente avaliada através da repetibilidade, que avalia a variabilidade do método dentro de um mesmo dia, e da precisão intermediária, que verifica a variação da metodologia em diferentes dias de análise.

Para a determinação da precisão do método, foram determinadas as médias das áreas dos picos de seis injeções consecutivas dos homogeneizados de hipocampo e estriado dentro de um mesmo dia (repetibilidade ou precisão intradia) e em três dias consecutivos (precisão intermediária ou interdia) e foram calculados os desvios padrão relativos (DPR) ou coeficientes de variação (CV%), conforme preconizado pela ANVISA (2003).

III.4.4. Quantificação de aminas biogênicas e seus metabólitos

As concentrações de aminas biogênicas nas estruturas cerebrais foram calculadas com o uso de curvas de calibração obtidas mediante a injeção de padrões puros. A verificação das alterações nos níveis de aminas biogênicas nos animais resultou da comparação das áreas dos picos de cromatogramas obtidos de animais tratados e controles, através do método estatístico “t” Student.

Foram preparadas soluções padrão de dopamina (DA) e seus metabólitos 3-metoxitiramina (3-MT), ácido 3,4-dihydroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA); 5-hidroxitriptamina (5-HT) e o derivado de metabolização ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) e o padrão interno 3,4-dihydroxibenzilamina (DHBA), na concentração de 1 mg/mL de cada substância em HClO₄ 0,1 N (soluções estoque), sendo que alíquotas destas foram diluídas e utilizadas para a otimização dos parâmetros cromatográficos e validação do método analítico.

III.5. RESULTADOS

III.5.1. Estabelecimento dos parâmetros cromatográficos

A quantificação das aminas biogênicas utilizando os parâmetros descritos resultou no cromatograma apresentado na figura III.5, onde é possível verificar a presença de sete picos, referentes às aminas e seus metabólitos.

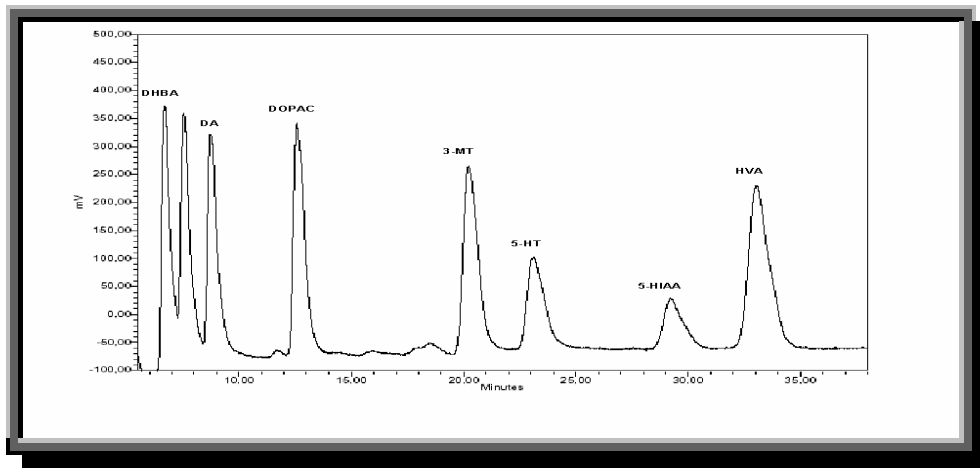


Figura III.5: Cromatograma da mistura de aminas biogênicas e seus metabólitos, pH 4,2; fluxo 0.8 mL/min.

Após a otimização dos parâmetros analíticos, foram preparados e analisados os homogeneizados de hipocampo e estriado de ratos controles, para identificar as substâncias presentes nestas estruturas cerebrais.

III.5.2. Validação do método analítico para quantificação de aminas biogênicas

As áreas dos picos dos cromatogramas obtidos a partir da injeção de 20 µl dos homogeneizados foram comparadas às obtidas com uma mistura de substâncias padrão com concentração de 500 ng/ml. Dessa forma, foi possível estimar as faixas de concentração a serem utilizadas para a construção das curvas de linearidade de cada composto. As concentrações basais dos neurotransmissores e seus produtos de metabolização variaram de acordo com a estrutura cerebral.

III.5.2.1. Linearidade

A amina biogênica DA apresentou faixa de linearidade de 1500 - 2700 ng/mL, enquanto 3-MT, um de seus produtos de metabolização, foi linear entre 500 e 1000 ng/mL. A indolamina 5-HT foi linear entre 50 e 500 ng/mL. Os metabólitos DOPAC, HVA e 5HIAA mostraram-se lineares na faixa de 50 - 250 ng/mL. Para todas as curvas os valores obtidos para r^2 foram superiores a 0,99 (tab. III.2) e a análise de variância apresentou diferenças significativas ($p < 0.01$) entre as concentrações e para a regressão linear, enquanto o desvio da linearidade não foi significativo. Os coeficientes de variação (CV%) ou desvios padrão relativos entre as curvas dessas substâncias não foram superiores a 5%, de acordo com os limites estipulados pela ANVISA (2003). Os valores de CV% para os neurotransmissores avaliados são apresentados na tabela III.3.

Tabela III.2: Resultados das curvas de calibração para a quantificação de monoaminas em estriado e hipocampo de ratos.

Monoamina	Equação da curva de calibração ^a	Valor ^b de r^2	Linearidade (ng/mL)
DA	$y = 9394,2x - 5820960$	0,9998	1500-2700
DOPAC	$y = 6175,6x + 95084$	0,9995	50-250
3-MT	$y = 6785,9x - 461299$	0,999	500-1000
HVA	$y = 6577,2x + 116318$	1	50-250
5-HT	$y = 6878,8x + 252832$	0,9999	50-500
5-HIAA	$y = 3472x + 40463$	0,9996	50-250

^ay = área do pico; x = concentração da monoamina e/ou metabólito

^bCoefficiente de correlação da curva de calibração

Tabela III.3: Desvios padrão relativos entre as curvas de calibração construídas a partir das soluções padrão para a análise de linearidade.

Concentração (ng/ml)	Desvio Padrão Relativo (%)					
	DA	3-MT	5-HT	5-HIAA	DOPAC	HVA
50			2,11	3,82	1,6	5,33
75				2,42	2,8	2,55
100			1,34	3,14	2,35	3,02
150				2,37	1,12	0,15
200			0,85			
250				1,36	2,84	0,85
300			0,52			
400			0,74			
500		0,97	0,15			
600		0,29				
700		0,5				
800						
900		0,12				
1000		0,55				
1500	0,09					
1800	0,55					
2100	0,44					
2400	0,44					
2700	0,29					

III.5.2.2. Limites de detecção (LD)

Os limites de detecção calculados são apresentados na tabela III.4.

Tabela III.4: Limites de detecção de dopamina, serotonina e metabólitos.

Composto	Limite de Detecção (ng/mL)
DA	11,97
3-MT	17,57
DOPAC	10,22
HVA	1,6
5-HT	0,23
5-HIAA	7,62

III.5.2.3. Limites de quantificação (LQ)

Os valores dos limites de quantificação para as aminas e seus metabólitos estão descritos na tabela III.5.

Tabela III.5: Limites de quantificação de dopamina, serotonina e metabólitos.

Composto	Limite de Quantificação (ng/mL)
DA	36,26
3-MT	52,28
DOPAC	30,96
HVA	4,86
5-HT	0,7
5-HIAA	23,1

III.5.2.4. Repetibilidade e Precisão Intermediária

A precisão de um método analítico é o grau de concordância entre os resultados de testes individuais quando o método é aplicado repetidamente a diferentes amostragens (ICH, 1996; USP, 2000, ANVISA, 2003). Repetibilidade é a concordância entre resultados obtidos em um curto período de tempo, empregando o mesmo analista e instrumento, ao contrário da reprodutibilidade, que se refere a conformidade entre os resultados obtidos com a mesma amostra em diferentes laboratórios e diferentes analistas (ICH, 1996; USP, 2000, ANVISA, 2003, MELO *et al.*, 2004). Para este trabalho, foram determinados os parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária. Repetibilidade foi expressa como o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%). Os neurotransmissores e seus metabólitos apresentaram CV% inferiores a 5% para a repetibilidade e 15% para precisão intermediária, de acordo com o preconizado pela ANVISA (2003), indicando baixa variabilidade dos valores obtidos para cada concentração (tab. III.6).

Tabela III.6: Valores de CV% de repetibilidade e precisão intermediária para homogeneizados de hipocampo e estriado de ratos.

Monoamina	Coeficientes de variação (%)			
	Estriado		Hipocampo	
	Repetibilidade	Precisão intermediária	Repetibilidade	Precisão intermediária
DA	0,18	1,25	1,52	3,09
DOPAC	1,08	1,6	1,34	2,26
3-MT	0,73	3,98	0,79	0,88
HVA	2,94	5,02		
5-HT	1,67	7,5	3,79	3,33
5-HIAA	3,39	3,4	3,23	3,5

III.5.3. Quantificação de aminas biogênicas e seus metabólitos

Ácido estricitosidínico, alcalóide isolado das folhas de *Psychotria myriantha*, foi administrado em ratos para a verificação de sua atividade sobre as aminas biogênicas no sistema nervoso central desses animais. Foi realizado um experimento piloto, com injeção intra-hipocampal bilateral aguda do alcalóide nas doses de 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para investigar as possíveis alterações nos níveis de DA, DOPAC, 3-MT, HVA, 5-HT e 5-HIAA nos hipocampus e córtices destes animais. Não foram observadas diferenças nos níveis das catecolaminas e indolaminas dos grupos que receberam injeção intracerebral de 5, 10 ou 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, quando comparados a um grupo controle. O grupo tratado com uma dose aguda de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentou redução nos níveis de 5-HT.

Os dados obtidos no experimento inicial conduziram à realização de um experimento agudo com injeção intra-hipocampal de ácido estricitosidínico na dose de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Foram analisados os hipocampus e córtices dos animais tratados e controles e os resultados são apresentados na tabela III.7.

Como observado no ensaio preliminar, houve uma redução de 83,48% nos níveis de serotonina dos hipocampus em comparação com o grupo controle. A quantificação dos neurotransmissores nos córtices demonstrou uma redução estatisticamente significativa nos níveis de DOPAC (35,9%), 3-MT (24,7%) e 5-HIAA (9%), embora os níveis de DA e 5-HT tenham permanecido inalterados.

Tabela III.7: Resultados do tratamento intra-hipocampal bilateral com ácido estricitosidínico sobre hipocampo e córtex de ratos, apresentando os níveis de aminas biogênicas (ng/g tecido), expressos como média \pm desvio padrão da média.

Tratamento intra-hipocampal agudo (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				
	hipocampo (ng/g)		córtex (ng/g)	
	controle (n = 5)	tratado (n = 8)	controle (n = 5)	tratado (n = 6)
DA	3125,3 \pm 145,8	3070 \pm 128,8	2328,2 \pm 125,6	2245 \pm 191,5
DOPAC			330,5 \pm 16,8	211,6 \pm 21,3**
3-MT	1630,3 \pm 207,2	1648,8 \pm 207	2276,5 \pm 185,7	1713,6 \pm 183,6*
5-HT	237,5 \pm 20,1	39,2 \pm 8,4**	268,1 \pm 7,7	255,2 \pm 31,3
5-HIAA	624,5 \pm 45,2	593,9 \pm 55,8	457,3 \pm 35,9	416,1 \pm 20,7*

* p < 5%

** p < 1%

Para o tratamento intraperitoneal agudo, foram testadas as doses iniciais de ácido estrictosidínico de 100, 50, 25 e 10 mg/kg. O animal que recebeu a dose de 100 mg/g apresentou sinais intensos de sofrimento e foi sacrificado imediatamente. Nas doses de 50 e 25 mg/kg foram observadas fortes contorções abdominais e, embora esses animais tenham sido decapitados antes de completarem 60 minutos de tratamento, as estruturas cerebrais de interesse foram dissecadas e analisadas. Dessa maneira, o grupo restante recebeu o tratamento i.p. com a dose de 10 mg/kg.

Foram isolados os hipocampus, córtices e estriados dos animais tratados e controles. Os córtices apresentaram resultados bastante heterogêneos, sendo por essa razão descartados. De acordo com o verificado no tratamento intra-hipocampal, houve redução de 63,4% nos níveis de 5-HT nos hipocampus, contudo também foi observada uma alteração estatisticamente significativa ($p < 0,01$) nos níveis de DOPAC, representando uma redução de 67,4% nos níveis observados no grupo controle (tabela III.8).

A análise dos cromatogramas obtidos para os estriados permitiu verificar alterações em DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos (tab. III.8). Houve modificação no sistema serotoninérgico, com redução nos níveis de 5-HT (28,7%), como nos demais experimentos, mas com um aumento semelhante em 5-HIAA (29,4%). No sistema dopaminérgico, apenas o metabólito 3-MT permaneceu inalterado. Foi observada uma diminuição nos níveis de DA (8%) e aumento de DOPAC (21,5%) e HVA (52,5%).

Tabela III.8: Resultados do tratamento intraperitoneal agudo com ácido estrictosidínico (10 mg/Kg) sobre hipocampo e estriado de ratos, apresentando os níveis de aminas biogênicas (ng/g tecido), expressos como média \pm desvio padrão da média.

Tratamento intraperitoneal agudo (10 mg/kg)				
	hipocampo		estriado	
	controle (n = 4)	tratado (n = 5)	controle (n = 6)	tratado (n = 5)
DA	1427,9 \pm 144,01	1209,1 \pm 56,9	4955,9 \pm 321	4557 \pm 82,6*
DOPAC	288,6 \pm 14,7	94,2 \pm 14,6**	644,6 \pm 42,3	783,4 \pm 31,2**
3-MT	1423,8 \pm 136,5	1203,1 \pm 161,6	2018,2 \pm 68	2121,4 \pm 127,4
HVA			249 \pm 24,7	379,7 \pm 22,7**
5-HT	252,9 \pm 21,1	92,5 \pm 6,4**	484,3 \pm 32,5	345,4 \pm 24,4**
5-HIAA	108 \pm 19,3	134,7 \pm 12,8	422,2 \pm 22,3	546,6 \pm 41,4**

* $p < 5\%$

** $p < 1\%$

III.6. DISCUSSÃO

As aminas biogênicas são moléculas de fundamental importância para a manutenção das funções cerebrais normais, estando envolvidas em diversas doenças que acometem o sistema nervoso central. Dessa forma, os níveis de aminas biogênicas e seus metabólitos, em tecidos e fluidos biológicos, têm sido largamente investigados para uma variedade de estados fisiológicos e patológicos. Cromatografia líquida acoplada a detector eletroquímico (CLAE/DEQ) tem sido amplamente empregada para a detecção simultânea de monoaminas neurotransmissoras e seus metabólitos em fluidos e tecidos cerebrais (KNOWLES e JOHNSON, 1983; CASSONE *et al.*, 1993; GAMACHE *et al.*, 1993; VIZUETE *et al.*, 1993; PRABHU *et al.*, 1994; STEFFEN *et al.*, 1995, QU *et al.*, 1997; PAGEL *et al.*, 2000; PATEL *et al.*, 2005).

O uso da CLAE/DEQ foi introduzido por KISSINGER *et al.*, nos anos 70, apresentando relativa simplicidade, especificidade, versatilidade e sensibilidade (CHENG e KUO, 1995; NIKOLAJSSEN e HANSEN, 2001). Por ser muito sensível, torna-se uma excelente técnica para a análise e separação de componentes em matrizes complexas, permitindo a injeção direta de homogêneos em uma coluna analítica, sem a necessidade de exaustivos processos de purificação (QU *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 2005). A detecção fluorimétrica, por exemplo, apresenta o inconveniente de exigir a derivatização prévia da amostra (SOMÉ *et al.*, 2004), em decorrência da baixa sensibilidade da fluorescência natural dos compostos (NIKOLAJSSEN e HANSEN, 2001), o que envolve maior tempo de preparação da amostra antes da análise cromatográfica. Segundo SOMÉ *et al.* (2004), a comparação de resultados entre a detecção fluorimétrica e eletroquímica indica que esta última é mais sensível, embora ambos os métodos possam ser precisos e exatos. Pelas vantagens apresentadas, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector eletroquímico foi o método escolhido para a quantificação de DA, 5-HT e metabólitos respectivos neste trabalho.

As quantificações das catecolaminas e indolaminas em tecidos cerebrais foram baseadas nos parâmetros cromatográficos descritos por STEFFEN (1994) com modificações na composição da fase móvel, pH e sensibilidade do detector, que facultaram a obtenção de um cromatograma com boa resolução e separação para

os picos referentes ao padrão interno e aos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico, permitindo a correta identificação dos mesmos.

A etapa seguinte à otimização das condições cromatográficas foi a validação do método analítico, cujos parâmetros avaliados foram selecionados de acordo com a Resolução 899 da ANVISA (2003) e códigos oficiais como ICH (1996) e USP (2000). O procedimento analítico foi validado quanto à linearidade, precisão e limites de detecção e quantificação, apresentando resultados satisfatórios para todos os parâmetros.

Com relação à linearidade, de acordo com as recomendações estabelecidas pelos códigos oficiais (ICH, 1996; USP, 2000; ANVISA, 2003), as soluções utilizadas na construção das curvas de linearidade devem ser preparadas separadamente, partindo de pesagens distintas da substância padrão ou de referência. Considerando o alto custo dos padrões de aminas biogênicas, na validação do presente método, foram preparadas soluções padrão de cada monoamina ou metabólito (solução estoque), na concentração de 1 mg/mL, baseadas nas quais foram realizadas as curvas de linearidade. As curvas de calibração foram realizadas em triplicata, a partir de distintas diluições dos estoques.

A estabilidade das aminas biogênicas foi avaliada de forma preliminar. Primeiramente, foram utilizados homogeneizados de hipocampus armazenados por mais de um ano em *freezer*, sendo que, nos cromatogramas resultantes da análise por CLAE/DEQ, foi possível a identificação dos picos referentes à DA e 3-MT. Análises cromatográficas realizadas com homogeneizados de hipocampus obtidos imediatamente após a decapitação dos animais, ou conservados sob temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de dois meses, permitiram a identificação de DA e seus metabólitos, 5-HT e 5-HIAA. As informações preliminares indicam que o tempo de armazenamento das estruturas cerebrais constitui um fator relevante para química das aminas biogênicas.

Foram realizadas injeções alternadas de homogeneizados de animais tratados e o respectivo controle, garantindo as mesmas condições da análise para ambos os grupos, permitindo a comparação entre os mesmos através do teste estatístico “t” de Student.

A quantificação dos níveis de aminas biogênicas, utilizando a metodologia validada, permitiu a verificação da influência do ácido strictosidínico sobre os níveis de DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos em hipocampus e córtices de ratos tratados por via intra-hipocampal, e hipocampus e estriados de animais tratados por via intraperitoneal.

Serotonina atua em diversas funções cerebrais, entre as quais se destacam memória e aprendizado, humor, ansiedade e depressão. Baixos níveis de serotonina ou alterações no seu metabolismo têm sido associados a condições neuropsíquicas bastante sérias, tais como as doenças de Parkinson e Huntington, distonia neuromuscular, distúrbios do sono, depressão, ansiedade, agressividade, comportamento compulsivo problemas afetivos (Van PRAAG, 2004; De BOER e KOOLHAAS, 2005; HOU *et al.*, 2006).

O papel da serotonina no aprendizado e memória não está completamente esclarecido. Contudo, estudos têm evidenciado a facilitação da memória com o uso de antagonistas 5-HT e a debilitação deste processo cognitivo pelos agonistas. (FARR *et al.*, 2000; NAGHDI e HAROONI, 2005). SHIMIZU *et al.* (1999) verificaram um aumento no consumo de 5-HT em homogeneizados de hipocampo, córtex e estriado de ratos, sugerindo a facilitação da atividade serotoninérgica nestas estruturas, o que foi relacionado com o déficit de aprendizado apresentado pelos animais no teste da esQUIVA inibitória. SEMBA *et al.* (2005) relacionam a intensificação do metabolismo serotoninérgico estriatal em ratos com a amnésia retrógrada provocada pelo tratamento com midazolam ou propofol.

O óleo das sementes de *Celastrus paniculatus*, utilizado na Índia como um fortalecedor da memória e promotor da inteligência, promoveu o decréscimo dos níveis de 5-HT e 5-HIAA em homogeneizados de cérebros de ratos, atribuído aos efeitos favoráveis sobre a memória (NALINI *et al.*, 1995). BOTH *et al.* (2005) avaliaram a atividade do alcalóide psicolatina, isolado de folhas de *P. umbellata*, sobre a memória de camundongos submetidos ao teste de esQUIVA inibitória. Psicolatina na dose de 100 mg/kg prejudicou a aquisição do aprendizado e a consolidação da memória, atuando sobre receptores 5-HT_{2A/C}. Psicolatina e ácido strictosidínico pertencem à classe dos alcalóides indol monoterpênicos e possuem

similaridade estrutural, sendo ambos isolados de espécies do subgênero *Heteropsychotria*, coletados no sul do Brasil.

A razão 5-HIAA / 5-HT é freqüentemente empregada como um indicador do metabolismo serotoninérgico, por estabelecer a relação entre o consumo de 5-HT e a formação de seu produto de metabolização (Van PRAAG, 2004). Os resultados obtidos nas análises com homogeneizados de hipocampos de animais tratados por injeção intra-hipocampal bilateral (20 µg/µL) ou intraperitoneal (10 mg/kg) com ácido estrictosidínico resultaram na diminuição dos níveis teciduais de 5-HT, sem o conseqüente aumento nos níveis 5-HIAA, indicando que não houve intensificação do metabolismo da serotonina nessa estrutura. Uma hipótese possível é que o resultado obtido pode ter sido uma decorrência do bloqueio de sua síntese, o que está em concordância com os resultados demonstrados por SANTUCCI *et al.* (1996) e BANIK e LAHIRI (2005), que realizaram experimentos onde a inibição da síntese de 5-HT, induzida por *p*-cloroanfetamina, ocasionou a redução nos níveis desta indolamina nas estruturas cerebrais avaliadas.

O triptofano é o precursor da biossíntese de 5-HT (5-hidroxitriptamina), através da ação da triptofano hidroxilase. A disponibilidade deste aminoácido essencial e a atividade da enzima são os principais processos reguladores da formação de 5-HT (SANDERS-BUSH e MAYER, 2001; RANG *et al.*, 2004). Assim, a carência de triptofano pode levar a uma deficiência de 5-HT no cérebro (Van PRAAG, 2004). Os alcalóides indol monoterpênicos são biossintetizados a partir da descarboxilação do triptofano, demonstrando a existência de um precursor comum entre 5-HT e ácido estrictosidínico. Dessa forma, torna-se possível conjecturar sobre uma ação do ácido estrictosidínico sobre as enzimas precursoras de 5-HT, o que poderia justificar a redução dos seus níveis nos hipocampos dos ratos submetidos ao tratamento intra-hipocampal com ácido estrictosidínico.

Nos hipocampos de animais tratados ácido estrictosidínico intraperitoneal (10 mg/kg) apresentaram, associada à redução nos níveis de 5-HT, uma diminuição das concentrações de DOPAC. Além disso, foi observada uma tendência à redução nos níveis de DA, apesar da não ter havido diferença significativa. Nos córtices de animais tratados com ácido estrictosidínico intra-hipocampal (20 µg/µL) não houve alterações significativas nos níveis de DA e 5HT.

Entre as inúmeras funções de DA, destaca-se o controle dos movimentos, que resulta da ativação da via nigro-estriatal, caracterizada pela predominância de neurônios dopaminérgicos e receptores dos subtipos D₁ e D₂ (EMILIEN *et al.*, 1999). O estriado situa-se numa localização chave para o circuito motor, recebendo aferentes do córtex frontal e parietal e enviando eferentes aos núcleos talâmicos e áreas corticais envolvidas no movimento (BEAR, 2002). Os níveis de DA nesta região cerebral foram mais elevados que aqueles observados em hipocampo e córtex, tornando possível a detecção e quantificação de todos os seus metabólitos.

O estriado constitui uma estrutura importante para a formação da memória de procedimentos, envolvida na formação de hábitos comportamentais (BEAR, 2002), onde é responsável pela coordenação e execução de programas motores complexos (GENGLER *et al.*, 2005). Pacientes afetados pela doença de Huntington apresentaram dificuldade no aprendizado de tarefas em que uma resposta motora está associada a um estímulo (SALMON e BUTTERS, 1995; BEAR, 2002). De acordo com SHOHAMY *et al.* (2005), pacientes com Parkinson apresentam dificuldades na aquisição de habilidades motoras, sugerindo que a perda de DA pode levar a déficits de aprendizado, que são amenizados pelo tratamento com L-DOPA, seu precursor biossintético.

O tratamento intraperitoneal agudo com ácido strictosidínico demonstrou diminuição nos níveis de DA, com elevação dos níveis de DOPAC e HVA, e um aumento do metabolismo serotoninérgico, evidenciado pela diminuição dos níveis de 5-HT com conseqüente elevação de 5-HIAA.

FREITAS *et al.* (2003a) observaram aumento nos níveis de HVA e redução em DA, 5-HT, DOPAC e 5-HIAA de estriados de ratos jovens após estado epiléptico induzido por pilocarpina. A indução da epilepsia em animais adultos resultou na redução nos níveis de DA, 5-HT e DOPAC, aumento na concentração de 5-HIAA e níveis inalterados de HVA (FREITAS *et al.*, 2003b). Foram observadas reduções nos níveis de DA e 5-HT em estriados de animais tratados com ácido strictosidínico, assim como nos resultados de FREITAS *et al.* (2003a e 2003b). Contudo, ácido strictosidínico causou aumento nos níveis de 5-HIAA, DOPAC e HVA, sem alterar as concentrações de 3-MT. Psicolatina, alcalóide indol monoterpênico isolado de *P. umbellata* (subg. *Hetropsychotria*), apresentou atividade ansiolítica e antidepressiva,

atuando em receptores 5HT_{2A/C} (BOTH *et al.*, 2005) e NMDA (BOTH *et al.*, 2006). Os resultados indicam que este alcalóide indol monterpênico atua em diferentes sistemas de neurotransmissão.

As aminas biogênicas estão envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos do sistema nervoso central (BERGQUIST *et al.*, 2002), sendo que muitos destes envolvem a interação entre diferentes sistemas neurotransmissores, como por exemplo, ansiedade, atividade locomotora e memória (AMADIO *et al.*, 2004; COSTA-CAMPOS *et al.*, 2004; ARNSTEN e LI, 2005), além das doenças de Parkinson, Alzheimer e esquizofrenia (PIRES *et al.*, 2005; CROPLEY *et al.*, 2006).

Regiões cerebrais como córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da rafe demonstram a conexão entre os sistemas glutamatérgico, serotoninérgico e dopaminérgico, já que o antagonismo de receptores NMDA nessas regiões estimula a liberação e o metabolismo da serotonina e a modulação da atividade dopaminérgica (CARLSSON *et al.*, 1999, BREESE, *et al.*, 2002). Pesquisas recentes indicam que a interação funcional entre os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico pode explicar a ação antidepressiva dos inibidores da recaptção de serotonina e antagonistas 5-HT₂ (ESPOSITO, 2006). A modulação da função de receptores 5-HT₂ por fármacos que influenciam a função dopaminérgica na substância negra parece atuar sobre a ativação motora, motivação e recompensa (ESPOSITO, 2006). O fato de a doença de Parkinson, caracterizada por redução nos níveis de DA e pela presença de distúrbios motores, comumente apresentar a depressão como uma condição associada e que agentes antidepressivos, como sertralina e outros inibidores seletivos da recaptção da serotonina, são utilizados frequentemente no tratamento deste sintoma nestes pacientes, corroboram a hipótese da interação entre os sistemas monoaminérgicos (PIRES *et al.*, 2005).

Segundo FREITAS *et al.* (2003b) os níveis de neurotransmissores podem ser alterados de diferentes formas em resposta a uma estimulação colinérgica. Considerando que ácido strictosidínico apresentou atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, embora pouco pronunciada (capítulo II), é possível que as modificações nas concentrações das monoaminas nas estruturas cerebrais avaliadas constituam um rearranjo de neurotransmissores decorrente do aumento nos níveis de acetilcolina nos tecidos estudados.

De uma forma geral, o alcalóide indol monoterpênico ácido strictosidínico parece atuar sobre a síntese de 5-HT, demonstrado pela redução em seus níveis hipocâmpais, sem alterações em 5-HIAA, e sobre o sistema dopaminérgico em córtices e estriados dos animais tratados, além de aumentar o metabolismo da serotonina nesta estrutura. Considerando a importância destes neurotransmissores para o desempenho das funções centrais e seu envolvimento nas doenças neurodegenerativas, os resultados apresentados neste trabalho indicam que ácido strictosidínico apresenta grande potencial farmacológico, podendo ser investigado quanto a diferentes atividades cerebrais que envolvam os sistemas dopaminérgico e/ou serotoninérgico, como por exemplo: ação antidepressiva, ansiolítica e efeitos sobre os processos de locomoção e memória.

DISCUSSÃO GERAL

O gênero *Psychotria* possui taxonomia complexa, sendo que a delimitação de suas fronteiras ainda gera polêmica entre os pesquisadores (NEPOKROEFF *et al.*, 1999). A divisão de *Psychotria* entre os subgêneros *Tetramerae*, *Psychotria* e *Heteropsychotria* constituiu uma tentativa de facilitar a classificação das espécies através de análises de sua morfologia e distribuição geográfica (PETTIT, 1964 E 1966; STEYERMARK, 1972). Neste contexto a avaliação de sua quimiotaxonomia torna-se uma ferramenta altamente relevante.

Espécies do subgênero *Psychotria*, pantropical, parecem estar envolvidas com a produção de alcalóides indólicos poliméricos, o que é evidenciado pelo isolamento de isopsicotridina C, psicotridinae e quadrigeminas A e B (ROTH *et al.*, 1985 e 1986), calicantina, isocalicantina e mesoquimonantina em *P. forsteriana* (ABJIBADÉ *et al.*, 1992); psicoleína e quadrigemina C (GUERITTE-VOEGELEIN, 1992), hodgkinsina, isopsicotridinas A e B, psicotridina, quadrigemina I, oleoidina e caledonina em *P. oleoides* (JANNIC *et al.*, 1999); quadrigemina B, calicantina, hodgkinsina, calicosidina e quimonantina em *P. rostrata* (LAJIS *et al.*, 1993); e glomerulatinas A, B e C em folhas de *P. glomerulata* (SOLIS *et al.*, 1997).

Em contrapartida, alcalóides polindólicos não têm sido encontrados em espécies pertencentes ao subgênero neotropical *Heteropsychotria*, com exceção de *P. colorata*, que permitiu o isolamento de calicantina e isocalicantina, além de quadrigemina C (CARVALHO, 1993). A avaliação dos alcalóides presentes em 15 espécies de *Heteropsychotria* (LOPES *et al.*, 2004), bem como o isolamento de psicolatina (psicolatina) a partir de folhas de *P. umbellata* (KERBER, 1999); braquicerina, de *P. brachyceras* (KERBER *et al.*, 2001 e 2003); lialosídeo e strictosamida, de *P. suterella* (De SANTOS *et al.*, 2001) e *N*-β-*D*-glicopiranosil-vincosamida, de *P. leiocarpa* (HENRIQUES *et al.*, 2004), sugerem que este subgênero produza alcalóides indol monoterpênicos.

O isolamento de strictosamida, ácido strictosidínico e miriantosina, além da provável presença de vincosamida, em *P. myriantha* permitiu o conhecimento da composição química da espécie, corroborando a hipótese de produção de alcalóides indol monoterpênicos e incluindo formalmente a espécie no subgênero *Heteropsychotria*.

A análise dos extratos de *P. myriantha* e seus alcalóides isolados possibilitaram a avaliação do perfil farmacológico da espécie. Os alcalóides strictosamida, isolado previamente em *Cephaelis dichroa* (SOLIS *et al.*, 1993), *Rhazia stricta* (RAHMAN *et al.*, 1991), espécies de *Nauclea* (ERDELMEIER *et al.*, 1991) e raízes de *Ophiorrhiza pumila* (KITAJIMA *et al.*, 2002), em *P. suterella* e *P. bahiensis*, e ácido strictosidínico, isolado de *Rhazya orientalis* (SMITH *et al.*, 1968), *Hunteria zeylanica* (SUBHADHIRASAKUL *et al.*, 1994) e *Ophiorrhiza filistipula* (ARBAIN *et al.*, 1993) já possuíam atividades descritas na literatura. Strictosamida apresentou atividades moluscicida, antibacteriana e antifúngica (ERDELMEIER *et al.*, 1991), enquanto ácido strictosidínico apresentou efeito analgésico periférico (REANMONGKIOL *et al.*, 2000).

O presente trabalho demonstrou que o extrato butanólico de alcalóides de *P. myriantha*, strictosamida, ácido strictosidínico e miriantosina apresentaram atividade inibidora da migração de leucócitos, sugerindo potente atividade antiinflamatória e efeito anticolinesterásico, sendo que substâncias que apresentam a combinação dessas duas ações podem ser ferramentas importantes no tratamento de doenças neurodegenerativas (NIZRI *et al.*, 2005; YOON *et al.*, 2005). EBA e ácido strictosidínico apresentaram atividade analgésica opióide, contrariando os dados descritos na literatura (REANMONGKOL *et al.*, 2000). Por essa razão, o alcalóide ácido strictosidínico, isolado em maior quantidade, foi avaliado quanto a seus efeitos sobre os níveis de aminas biogênicas em estruturas cerebrais de ratos. Ácido strictosidínico demonstrou, predominantemente, uma redução nos níveis de serotonina em hipocampus, córtices e estriados de animais tratados, sugerindo atuar por bloqueio da síntese de 5-HT (SANTUCCI *et al.*, 1996; BANIK e LAHIRI, 2005). O alcalóide isolado também promoveu alterações no sistema dopaminérgico no córtex e estriado, sendo que o mecanismo pelo qual ácido strictosidínico causa tais alterações ainda não foi esclarecido. Contudo, a literatura descreve a conexão entre os sistemas glutamatérgico, serotoninérgico e dopaminérgico, sendo que o antagonismo de receptores NMDA em regiões como córtex, hipocampo e núcleos da rafe pode estimular a liberação e metabolismo da serotonina e a modulação da atividade dopaminérgica (CARLSSON *et al.*, 1999, BREESE, *et al.*, 2002).

Este trabalho demonstra a importância dos alcalóides como substâncias bioativas, apontando os indol monoterpênicos, em especial, como uma fonte para a descoberta de compostos com atividade sobre o sistema nervoso central.

CONCLUSÕES E PERPECTIVAS

O gênero *Psychotria* é marcado pela ausência de similaridades morfológicas e anatômicas que permitam a delimitação de suas fronteiras. Dessa forma, a busca por características que possam estabelecer padrões comuns entre as espécies fundamenta e impulsiona a investigação química do gênero. Neste contexto, o isolamento dos alcalóides indol monoterpênicos strictosamida, ácido strictosidínico e miriantosina em *Psychotria myriantha* representa um importante resultado, que parece evidenciar uma tendência de produção de alcalóides indol monoterpênicos pelo subgênero *Heteropsychotria*, através de rotas biossintéticas diferenciadas, sugerindo a existência de um critério quimiotaxonômico para a classificação do gênero.

A potente inibição da migração de leucócitos descrita para *P. myriantha*, associada à diminuição da dor observada no teste da capsaicina, podem indicar uma ação antiinflamatória, ainda não relatada para espécies do subgênero *Heteropsychotria*.

A avaliação de espécies do subgênero *Heteropsychotria* em testes de nocicepção tem demonstrado efeitos analgésicos centrais. O alcalóide ácido strictosidínico, isolado de *P. myriantha*, apresentou atividade analgésica do tipo opióide, da mesma forma que psicolatina, de *P. umbellata*, para a qual é relatado também o envolvimento de receptores NMDA e ação antidepressiva e ansiolítica. Contudo, ácido strictosidínico apresentou efeito analgésico em doses muito menores, quando comparado à psicolatina. Embora as doses letais para o ácido strictosidínico ainda não tenham sido estabelecidas, a presença de atividade em baixas concentrações se torna uma vantagem.

O alcalóide ácido strictosidínico foi capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase e promover alterações nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico de ratos tratados pela vias intracerebral e intraperitoneal, demonstrando potencial atividade central. Considerando que substâncias que aumentam a disponibilidade de acetilcolina são importantes para o tratamento da doença Alzheimer e que os neurotransmissores dopamina e serotonina estão envolvidos em distúrbios neurológicos e neurodegenerativos como: depressão, esquizofrenia e Parkinson, entre outras, os resultados obtidos para *P. myriantha*, juntamente com a atividade ansiolítica e antidepressiva e efeito analgésico central

de *P. umbellata*, podem sugerir que estas duas espécies do subgênero atuem predominantemente sobre o sistema nervoso central. Estes aspectos indicam que o gênero *Psychotria* apresenta perspectivas positivas para a identificação de novos produtos com importantes atividades biológicas.

De forma geral, apesar de ainda ser possível o isolamento e elucidação estrutural de outros alcalóides e investigação de diferentes atividades farmacológicas em *P. myriantha*, o presente trabalho viabilizou a realização de estudo envolvendo aspectos fitoquímicos, quimiotaxonômicos e farmacológicos contribuindo para a disponibilização de dados referentes ao subgênero *Heteropsychotria*. Os resultados obtidos indicam novas perspectivas para continuidade do trabalho, em especial a determinação das vias biossintéticas de formação da miriantosina, um aspecto relevante a ser investigado, contribuindo para a taxonomia deste grupo vegetal. Adicionalmente, a da toxicidade do ácido strictosidínico e investigação de possíveis atividades ansiolíticas, antidepressivas, ações sobre a memória e outras atividades relacionadas a receptores NMDA podem contribuir com novas informações relevantes sobre sua ação e potencial farmacológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; LOTTES, M.; WAIBEL, R.; KARIKAS, G. A.; CORREA, M. D.; GUPTA, M. P. Alkaloids and Other Compounds from *Psychotria correae*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1537-1545, 1995.

ACKL, N.; ISING, M.; SCHREIBER, Y. A.; ATIYA, M.; SONNTAG, A.; AUER, D. P. Hippocampal metabolic abnormalities in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 384, p. 23-28, 2005.

ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Phospholipase A₂, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 376-387, 2006.

ADJIBADÉ, Y. **Pharmacognosie du *Psychotria forsteriana* A. Gray (RUBIACEAE). Aspects Botanique, Chimique et Essais Pharmacologiques Preliminaires**. Paris: Universite Louis Pasteur de Strasbourg I, 1989 (Tese de Doutorado).

ADJIBADÉ, Y.; KUBALLA, B.; CABALION, P.; JUNG, M. L.; ANTON, R. Cytotoxicity on Human Leukemic and Rat Hepatoma Cell Lines of Alkaloids Extracts of *Psychotria forsteriana*. **Planta Medica**, v. 55, p. 567-568, 1989.

ADJIBADÉ, Y.; SAAD, H.; KUBALLA, B.; BECK, J. P.; SÉVENET, T.; CABALION, P.; ANTON, R. *In vitro* Cytotoxicity of Polyindolenine Alkaloids on Rat Hepatoma Cell Lines. Structure Activity Relationships. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 127-136, 1990.

ADJIBADE, Y.; HUE, B.; PELHATE, M.; ANTON, R. Action of Calycanthine on Nervous Transmission in Cockroach Central Nervous System. **Planta Medica**, v. 57, p. 99-101, 1991.

ADJIBADE, Y.; WENIGER, B.; QUIRION, J. C.; KUBALLA, B.; CABALION, P.; ANTON, R. Dimeric Alkaloids from *Psychotria forsteriana*. **Phytochemistry**, v. 31 (1), p. 317-319, 1992.

AGHA, A. M.; MANSOUR, M. Effects of captopril on interleukin-6, leukotriene B₄, and oxidative stress markers in serum and inflammatory exudate of arthritic rats: evidence of antiinflammatory activity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 168, p. 123-130, 2000.

AHMED, E.; NAWAZ, S. A.; MALIK, A.; CHOUDHARY, M. I. Isolation and cholinesterase-inhibition studies of sterols from *Haloxylon recurvum*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 573-580, 2006.

AMADIO, M.; GOVONI, S.; ALKON, D. L.; PASCALE, A. Emerging targets for the pharmacology of learning and memory. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 111-122, 2004.

ANDRADE, M. T.; LIMA, J. A.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M.; CARVALHO, M. P.; EPIFANIO, R. A. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Müell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4092-4095, 2005.

ANECKONDA, T. S.; REDDY, P. H. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? **Brain Research Reviews**, v. 50, p. 361-376, 2005.

ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Resolução *RE nº 899*, de 29 de maio de 2003.

ARBAIN, D.; PUTRA, D. P.; SARGENT, M. V. The alkaloids of *Ophiorrhiza filistipula*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 46, p. 977-985, 1993.

ARNSTEN, A. F. T.; LI, B. M. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1377-1384, 2005.

AUDDY, B.; FERREIRA, M.; BLASINA, F.; LAFON, L.; ARREDONDO, F.; DAJAS, F.; TRIPATHI, P. C.; SEAL, T.; MUKHERJEE, B. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 131-138, 2003.

AUGER, J.; BOULAY, R.; JAILLAIS, B.; DELION-VANCASSEL, S. Analysis of biogenic amines by solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p. 395-403, 2000.

AZZI, A.; DAVIES, K. J. A.; KELLY, F. Free radical biology – terminology and critical thinking. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 558, p. 3-6, 2004.

BAILLY, C. Homocamptothecins: potent topoisomerase I inhibitors and promising anticancer drugs. **Critical Reviews in Oncology and Hematology**, v. 45, p. 91-108, 2003.

BALU, M.; SANGEETHA, P.; MURALI, G.; PANNEERSELVAM, C. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, p. 501-5507, 2005.

BANIK, S.; LAHIRI, T. Decrease in brain serotonin level and short term memory loss in mice: a preliminary study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 367-370, 2005.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, p. 1083-1152, 1999.

BARNES, C. A.; MELTZER, J.; HOUSTON, F.; ORR, G.; MCGANN, K.; WENK, G. L. Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. **Neuroscience**, v. 99, p. 17-23, 2000.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

BARROSO, G. M. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. vol 3. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa Imprensa, 1991.

BAUR, J. E.; KRISTENSEN, E. W.; MAY, L. J.; WIEDEMANN, D. J.; WIGHTMAN, R. M. Fast-scan voltammetry of biogenic amines. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 1267-1272, 1988.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências, Desvendando o Sistema Nervoso**, 2 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002.

BERETZ, A.; ROTH-GEORGER, A.; CORRE, G.; KUBALLA, B.; ANTON, R.; CAZENAVE, J. P. Polyindolinic Alkaloids from *Psychotria forsteriana*. Potent Inhibitors of the Aggregation of Human Platelets. **Planta Medica**, v. 4, p. 300-303, 1985.

BERGQUIST, J.; SCIUBISZ, A.; KACZOR, A.; SILBERRING, J. Catecholamines and methods for their identification and quantification in biological tissues and fluids. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 113, p. 1-13, 2002.

BIBER, K.; ZUURMAN, M. W.; DIJKSTRA, I. M.; BODDEKE, H. W. G. M. Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 63-68, 2002.

BLACKBURN, T. P. Serotonergic agents and Parkinson's disease. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, p. 35-41, 2004.

BLOMGREN, K.; HAGBERG, H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 388-397, 2006.

BLOOM, F. Neurotransmissão e o sistema nervoso central. In: HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2001.

BOTH, F. L. **Avaliação da atividade analgésica do alcalóide psicolatina isolado de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae)**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001 (Dissertação de Mestrado).

BOTH, F. L.; FARIAS, F. M.; NICOLÁO, L. L.; MISTURINI, J.; HENRIQUES, A.; ELISABETSKY, E. Avaliação da atividade analgésica de extratos alcaloídicos de espécies de *Psychotria*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 5, p. 41-45, 2002.

BOTH, F. L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 336-341, 2002b.

BOTH, F. L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT_{2A/C} serotonin modulator. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 374-380, 2005.

BOTH, F. L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. Role of glutamate and dopamine receptors in the psychopharmacological profile of the indole alkaloid psychollatine. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 342-345, 2006.

BOYDEN, S. The chemotatic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 15, p. 453-466, 1962.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BREESE, G. R.; KANPP, D. J.; MOY, S. S. Integrative role for serotonergic and glutamatergic receptor mechanisms in the action of NMDA antagonists: potential relationships to antipsychotic drug actions on NMDA antagonist responsiveness. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 26, p. 441-455, 2002.

BRUNETON, J. **Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie**, Technique et Documentation: Paris, p. 779, 1993.

BUOHT, M. C.; MARTIN, S.; SEGU, L. Role of serotonin in memory impairment. **Annals of Medicine**, v. 32, p. 210-221, 2000.

BURNS, D.; HILL, L.; ESSANDOH, M.; JARZEMBOWSKI, T. M.; SCHULER, H. G.; JANICKI, P. K. Effect of valecoxib pretreatment on pain and secondary hyperalgesia: a randomized controlled trial in healthy volunteers. **Biomed Central Anesthesiology**, v. 6, p. 1-7, 2006.

CABALLERO-GEORGE, C.; VANDERHEYDEN, P. M. L.; SOLIS, P. N.; PIETERS, L.; SHAHAT, A. A.; GUPTA, M. P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A. J. Biological screening of selected medicinal Panamanian plants by radioligand-binding techniques. **Phytomedicine**, v. 8, p. 59-70, 2001.

CALNE, D. B.; CHU, N. S.; HUANG, C. C. ; LU, C. S. ; OLANOW, W. Manganism and idiopathic parkinsonism : similarities and difference. **Neurology**, v. 44, p. 1583-1586, 1994.

CARLSSOM, A.; WATERS, N.; CARLSSOM, M. L. Neurotransmitter interactions in schizophrenia—therapeutic implications. **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 1388-1395, 1999.

CARVALHO, A. C. T. **Estudo Fitoquímico de *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) M. Arg. Utilizando a Metodologia Etnofarmacológica**. Belém: Universidade Federal do Pará, 1993.

CASSONE, M. C.; LOMBARD, A.; ROSSETTI, V.; URCIUOLI, R.; ROLFO, P. M. Effect of *in vivo* He-Ne laser irradiation on biogenic amine levels in rat brain. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 18, p. 291-294, 1993.

CHEN, H.; ZHANG, S. M.; HERMAN, M. A.; SCHWARZCHILD, M. A.; WILLETT, W. C.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; ACHERIO, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. **Archives of Neurology**, v. 60, p. 1059-1064, 2003.

CHENG, F. C.; KUO, J. S. High-performance liquid chromatographic analysis with electrochemical detection of biogenic amines using microbore columns. **Journal of Chromatography B**, v. 665, p. 1-13, 1995.

CINAMON, G.; ALON, R. Areal time *in vitro* assay for studying leukocyte transendothelial migration under physiological flow conditions. **Journal of Immunological Methods**, v. 273, p. 53-62, 2003.

COOK, C. D.; NEWMAN, J. L.; WINFREE, J. C. Modulation of the locomotor activating effects of the noncompetitive NMDA receptor antagonist MK801 by dopamine D2/3 receptor agonists in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 309-318, 2004

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

CORRÊA, C. R.; KYLE, D. J.; CHAKRAVARTY, S.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p. 552-558, 1996.

COSTA-CAMPOS, L.; DASSOLER, S. C.; RIGO, A. P.; IWU, M.; ELISABETSKY, E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. **Pharmacology, Biochemistry and behavior**, v. 77, p. 484-489, 2004.

CROPLEY, V. L.; FUJITA, M.; INNIS, R. B.; NATHAN, P. J. Molecular imaging of the dopaminergic system and its association with human cognitive function. **Biological Psychiatry**, v. 59, p. 989-907, 2006.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 72-82, 2005.

DANIELS, W. M. U.; PIETERSEN, C. Y.; CARSTENS, M. E.; DAYA, S.; STEIN, D. Overcrowding induces anxiety and causes loss of serotonin 5HT-1a receptors in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 15, p. 287-295, 2000.

DAVIS, A. P.; BRIDSON, D.; JARVIS, C.; GOVAERTS, R. The typification and characterization of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 138, p. 35-42, 2001.

De BOER, S. F.; KOOLHAAS, J. M. 5HT1A and 5HT1B receptor agonists and aggression: A pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. **European Journal of Pharmacology**, v. 526, p. 125-139, 2005.

De La CRUZ, c.; REVILLA, E.; STEFFEN, V.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, J. A.; CANO, J.; MACHADO, A. Protection of the aged substantia nigra of the rat against oxidative damage by (-)-deprenyl. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p. 1756-1760, 1996.

De SANTOS, L. V. ***Psychotria suterella* Müll. Arg.: Caracterização dos Alcalóides, Análise Farmacológica e Cultivo *In vitro* de Calos e Raízes.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1999 (Dissertação de Mestrado).

De SANTOS, L. V.; FETT-NETO, A. G.; KERBER, V. A.; ELISABETSKY, E.; QUIRION, J. -C.; HENRIQUES, A. T. indole monopterpene alkaloid s from leaves of *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 1185-1187, 2001.

DESGRANGES, B; BARON, J. -C.; De la SAYETTE, V.; PETIT-TABOUÉ, M. C.; BENALI, K.; LANDEAU, B.; The neural substrates of memory systems impairment in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 121, p. 611-631, 1998.

DiBUSSOLO, J. M.; GANT, J. R.; KERBER, J. D. Instrumental considerations in catecholamine analysis using liquid chromatography with electro-chemical detection. **Chromatography Newsletters**, v. 11, p. 27-29, 1983.

DILLENBURG, C. R.; PORTO, M. L. Rubiaceae - Tribo *Psychotriae*. **Boletim do Instituto de Biociências**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 39, p. 1-76, 1985.

DRINGENBERG, H. C. Alzheimer's disease: more than a "cholinergic disorder" – evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. **Behavioral Brain Research**, v. 115, p. 235-249, 2000.

DUNSTAN, C. A.; NOREEN, Y.; SERRANO, G.; COX, P. A.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assay. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, p. 35-56, 1997.

EL-ETRI, M. M, ENIIS, M.; JIANG, M.; SHIPLEY, M. T. Pilocarpine-induced convulsions in rats: evidence for muscarinic receptor-mediated activation of locus coeruleus and norepinephrine release in cholinolytic seizure development. **Experimental Neurology**, v. 121, p. 24-39, 1993.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; ALBUQUERQUE, R. R.; NUNES, D. S.; CARVALHO, A. Analgesic Activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Müll. Arg. Alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, p. 77-83, 1995.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; LEAL, M. B.; NUNES, D. S.; CARVALHO, A.; VEROFFA, L. Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: An approach to unveil bioactive natural products. The case of *Psychotria* alkaloids as potential analgesics. **Ciência e Cultura**, v. 49, p. 378-385, 1997.

EL-SHERBINY, D. A.; KHALIFA, A. E.; ATTIA, A. S.; ELDESHARY, E. E. S. *Hypericum perforatum* extract demstrates antioxidant properties agianst elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 76, p. 525-533, 2003.

EMILIEN, G.; MALOTEAUX, J. M.; GEURTS, M.; HOOGENBERG, K.; CRAGG, S. Dopamine receptors – physiological understanding to therapeutic intervention potential. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 84, p. 133-156, 1999.

ERDELMEIER, C.A. A.; WRIGHT, A. D.; ORJALA, J.; BAUMGARTNER, B.; RALI, T.; STICHER, O. New indole alkaloid glycosides from *Nauclea orientalis*. **Planta Medica**, v. 57, p. 149-152, 1991.

ESPOSITO, E. Serotonin-dopamine interaction as a focus of a novel antidepressant drugs. **Current Drug Targets**, v. 7, p. 177-185, 2006.

FABBRI, M.; DELP, G.; SCHMIDT, O.; THEOPOLD, U. Animal and plant members of a gene family with similarity to alkaloid – synthesizing enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 271, p. 191-196, 2000.

FARR, S. A.; FLOOD, J. F.; MORLEY, J. E. The effect of cholinergic, GABAergic, serotonergic, and glutamatergic receptor modulation on posttrial memory processing in the hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 73, p. 150-167, 2000.

FÖRSTL, H.; HENTSCHEL, F.; SATTEL, H.; GEIGER-KABISH, C.; BESTHORN, C.; CZEC, C. Age-associated memory impairment and early Alzheimer's disease. **Drug Research**, v. 45, p. 394-397, 1995.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. The alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurosurg. Psychiatry**, v.66, p. 137-147, 1999.

FRANKEN, I. H. A.; BOOIJ, J.; Van den BRINK, W. The role of dopamine in human addiction: from reward to motivated attention. **European Journal of Pharmacology**, v. 526, p. 199-206, 2005.

FREEDLAND, C. S.; MANSBACH, R. S. Behavioral Profile of Constituents in a Ayahuasca, an Amazonian Psychoactive Plant Mixture. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 54, p. 183-194, 1999.

FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Alterações agudas dos níveis de neurotransmissores em corpo estriado de ratos jovens após estado epiléptico induzido por pilocarpina. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, p. 430-433, 2003a.

FREITAS, R. M.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Níveis de neurotransmissores estriatais durante o estado epiléptico. **Revista e Psiquiatria Clínica**, v. 30, p. 76-79, 2003b.

GAMACHE, P.; RYAN, E.; SVENDSEN, C.; MURAYAMA, K.; ACWORTH, I. N. Simultaneous measurement of monoamines, metabolites and amino acids in brain tissue and microdialysis perfusates. **Journal of Chromatography**, v. 614, p.213-220, 1993.

GARCIA-ALLOZA, M.; GIL-BEA, F. J.; DIEZ-ARIZA, M.; CHEN, C. P. L. –H.; FRANCIS, P.T.; LAHERAS, B.; RAMÍREZ, M. J. Cholinergic-serotonergic imbalance contributes to cognitive and behavioral symptoms in Alzheimer's disease. **Neuropsychologia**, v. 43, p. 442-449, 2005.

GATTU, M.; BOSS, K. L.; TERRY Jr, A. V.; BUCCAFUSCO, J. J. Reversal of scopolamine-induced deficits in navigational memory performance by the seed oil of *Celastrus paniculatus*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 57, p. 793-799, 1997.

GENGLER, S.; MALLOT, H. A.; HÖLSCHER, C. Inactivation of the rat dorsal striatum impairs performance in spatial tasks and alters hippocampal theta in the freely moving rat. **Behavioral Brain Research**, v. 164, p. 73-82, 2005.

GILANI, A. H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, 2005.

GLICKSTEIN, S.; SCHMAUSS, C. Dopamine receptor functions: lesions from knockout mice. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 91, p. 63-83, 2001.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em Saúde e Direitos dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995.

GONZÁLEZ-BURGOS, G.; CORNER, S.; KRIMER, L. S.; SEAMANS, J. K.; URBAN, N. N.; HENZE, D. A.; BARRIONUEVO, G. Dopamine modulation of neuronal function in the monkey prefrontal cortex. **Physiology and Behavior**, v. 77, p. 537-543, 2002.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; ZUARDI, A. W. Medicamentos Antipsicóticos. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001

GRAFMAN, J.; WEINGARTNER, H.; LAWLOR, B.; MELLOW, A. M.; THOMPSEN-PUTNAM, K.; SUNDERLAND, T. Automatic memory processes in patients with dementia – Alzheimer's type (DAT). **Cortex**, v. 26, p. 361-371, 1990.

GREENFIELD, S.; VAUX, D. J. Parkinson's disease, Alzheimer disease and motor neurone disease: identifying a common mechanism. **Neuroscience**, v. 113, n. 3, p. 485-492, 2002.

GRÖN, G.; BRANDENBURG, I.; WUNDERLICH, A. P.; RIEPE, M. W. Inhibition of hippocampal function in mild cognitive impairment: targeting the cholinergic hypothesis. **Neurobiology of Aging**, v. 27, p. 78-87, 2006.

GUÉRITTE-VOEGELEIN, F.; SÉVENET, T.; PUSSET, J.; ADELIN, M. T.; GILLET, B.; BELOEIL, J. C.; GUÉNARD, D.; POTIER, P. Alkaloids from *Psychotria oleoides* With Activity on Growth Hormone Release. **Journal of Natural Products**, v. 55 (7), p. 93-930, 1992.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a casual link? **Experimental Neurology**, v. 193, p. 279-290, 2005.

HEFCO, V.; YAMADA, K.; HEFCO, A.; HRITCU, L.; TIRON, A.; NABESHIMA, T. Role of the mesotelencephalic dopamine system in learning and memory processes in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 475, p. 55-60, 2003.

HEINRICH, M.; TEOH, H. L. Galantamina from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 147-162, 2004.

HENDRIKS, J. J. A.; TUNISSEN, C. E.; VRIES, H. E.; DIJKSTRA, C. D. Macrophages and neurodegeneration. **Brain Research Reviews**, v. 48, p. 185-195, 2005.

HENRIQUES, A. T.; LOPES, S. O.; PARANHOS, J. T.; GREGIANINI, T. S.; von POSER, G. L.; FETT-NETO, A. G.; SCHRISPSEMA, J. *N-b-D-Glucopyranosyl vincosamide*, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 449-454, 2004.

HERNANDEZ, C. M.; GEARHART, D. A.; PARIKH, V.; HOHNADDEL, E. J.; DAVIS, L. W.; MIDDLEMORE, M. L.; WARSI, S. P.; WALLER, J. L.; TERRY Jr, A. V. Comparison of galantamine and donepezil for effects on nerve growth factor, cholinergic markers, and memory performance in aged rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, p. 679-694, 2006.

HERRERA-MARSCHITZ, M.; GOINY, M.; YOU, Z. B.; MEANA, J. J.; PETTERSSON, E.; RODRÍGUEZ-PUERTAS, R.; XU, Z. -Q.; TERENIUS, L.; HÖKFELT, T.; UNGERSTEDT, U. On the release of glutamate and aspartate in the basal ganglia of the rat: interactions with monoamines and neuropeptides. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 21, p. 489-495, 1997.

HIROI, N.; MARTIN, A. B.; GRANDE, C.; ALBERTI, I.; RIVERA, A.; MORATALLA, R. Molecular dissection of dopamine receptor signaling. **Journal of chemical Neuroanatomy**, v. 23, p. 237-242, 2002.

HOOZEMANS, J. J. M.; VEERHUIS, R.; ROZEMULLER, J. M.; EIKELENBOOM, P. Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. **International Journal of Developmental Neuroscience**, *in press*, 2006.

HOU, C.; FUJUN, J.; LIU, Y.; LINGJIANG, L. CSF serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid and neuropeptide Y levels in severe major depressive disorder. **Brain Research**, v. 1095, p. 154-158, 2006.

HOUGHTON, P. J.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEGBULUGBE, A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2893-2896, 2004.

HOWES, M. J. R.; HOUGHTON, P. J. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 513-527, 2003.

HUJANEN, E. S.; SEPPÄ, S. T.; VIRTANEN, K. Polymorphonuclear leucocyte chemotaxis induced by zinc, copper and nickel in vitro. **Biochimica et Biophysica**, v. 1245, p. 145-152, 1995.

INOUE, H.; TAKEDA, Y.; NISHIMURA, H.; KANOMI, A.; OKUDA, T.; PUFF, C. Chemotaxonomic Studies of Rubiaceae Plants Containing Iridoid Glycosides. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2591-2598, 1988.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) Q2b. **Text on Validation of Analytical Procedures: Methodology**. US FDA Federal Register, v. 62, p. 1-9, 1996.

ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N. Neoipecoside and 7-methylneoipecoside, New Unusually-Cyclised Tetrahydroisoquinoline-Monoterpene Glucosides from *Cephaelis ipecacuanha*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 4, p. 1137-1139, 1989.

ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N. Six Tetrahydroisoquinoline-Monoterpene Glucosides from *Cephaelis ipecacuanha*. **Phytochemistry**, v.30, p.3117-3123, 1991.

ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N.; NISHI, T. Two chromone-secoiridoid glycosides and three indole alkaloid glycosides from *Neonauclea sessilifolia*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 359-369, 2003.

IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Novelty enhances retrieval of one-trail avoidance learning in rats 1 or 31 days after training unless the hippocampus is inactivated by different receptor antagonists and enzyme inhibitors. **Behavioral Brain Research**, v. 117, p. 215-220, 2000.

IZQUIERDO, I.; IZQUIERDO, L. A. **Neurobiología da memória**. In: KAPCZINSKI, F. P.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos**, 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

JANNIC, V.; GUÉRITTE, F.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; MARTIN, M. T.; SÉVENET, T.; POTIER, P. Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria oleoides* and *Psychotria lyciiflora*. **Journal Natural Products**, v. 62, p. 838-843, 1999.

JAYASINGHE, U. L. B.; JAYASOORIYA, C. P.; BANDARA, B. M. R.; EKANAYAKE, S. P.; MERLINI, L. ASSANTE, G. Antimicrobial activity of some Sri Lankan Rubiaceae and Meliaceae. **Fitoterapia**, v. 73, p. 424-427, 2002.

JHOO, J. H.; KIM, H. C.; NABESHIMA, T.; YAMADA, K.; SHIN, E. J.; JHOO, W. K.; KIM, W.; KANG, K. S.; JO, A. S.; WOO, J. I. β -amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. **Behavioral Brain Research**, v. 155, p. 185-196, 2004.

JOHNSON, T.; KNOWLES, C. O. Influence of formamides in biogenic amine levels in rat brain and plasma. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 14, p. 591-596, 1983.

KERBER, V. A. **Análise dos Alcalóides de *Psychotria brachyceras* Müll. Arg. e *Psychotria umbellata* Vell., e o Estabelecimento e Caracterização de Cultura de Células de *P. umbellata* Vell.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1999 (Tese de Doutorado).

KERBER, V. A.; GREGIANINI, T. S.; PARANHOS, J. T.; SCHWAMBACH, J.; FARIAS, F.; FETT, J. P.; FETT-NETO, A. G.; ZUANAZZI, J. A. S.; QUIRION, J. C.; ELISABETSKY, E.; HENRIQUES, A. T. Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 677-679, 2001.

KERBER, V. A.; GREGIANINI, T. S.; PARANHOS, J. T.; SCHWAMBACH, J.; FARIAS, F.; FETT, J. P.; FETT-NETO, A. G.; ZUANAZZI, J. A. S.; QUIRION, J. C.; ELISABETSKY, E.; HENRIQUES, A. T. Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1038-1040, 2003.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Psychotria microlabastra*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 818-821, 2001.

KIMBERG, D. Y.; D'ESPOSITO, M. Cognitive effects of the dopamine receptor agonist pergolide. **Neuropsychologia**, v. 41, p. 1020-1027, 2003.

KITAJIMA, M.; YOSHIDA, S.; YAMAGATA, K.; NAKAMURA, M.; TAKAYAMA, H.; SAITO, K.; SEKI, H.; AIMI, N. Camptothecin-related alkaloids from hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*. **Tetrahedron**, v. 58, p. 9169-9178, 2002.

KUME, T.; SUGIMOTO, M.; TAKADA, Y.; YAMAGUCHI, T.; YAONEZAWA, A.; KATSUKI, H.; SUGIMOTO, H.; AKAIKE, A. Up-regulation of nicotinic acetylcholine receptors by central-type acetylcholinesterase inhibitors in rat cortical neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 527, p. 77-85, 2005.

KUO, Y. C.; CHIEN, C. C.; TSAI, W. J.; HO, Y. H. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene

expression, DNA replication, and protein synthesis. **Antiviral Research**, v. 51, p. 95-109, 2001.

LAJIS, N. H.; MAHMUD, Z.; TOIA, R. F. The Alkaloids of *Psychotria rostrata*. **Planta Medica**. v. 59, p. 383-84, 1993.

LAM, R. W. Sleep disturbances and depression: a challenge for antidepressants. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 21, p. S25-S29, 2006.

LANCTÔT, K. L.; HERRMAN, N.; ERYAVEC, G.; Van REEKUM, R.; REED, K.; NARANJO, C. A. Central serotonergic activity is related to the aggressive behaviors of Alzheimer's disease. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, p. 646-654, 2002.

LEAL, M. B. **Estudo Psicofarmacológico de Espécies de *Psychotria* (RUBIACEAE) do Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1994 (Dissertação de Mestrado).

LEAL, M. B.; ELISABETSKY, E. Absence of Alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.54, p. 37-40, 1996.

LEVESQUE, J.; JACQUESY, R.; MERIENNE, C. Un gluco-alcaloïde de configuration inhabituelle isole de *Pauriantha lyallii*: l'isopauridianthoside. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 619-625, 1983.

LIANG, Y. Q.; TANG, X. C. Comparative effects of huperzine A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholine level and acetylcholinesterase activity in rats. **Neuroscience Letters**, v.361, p. 56-596, 2004.

LIBOT, F.; MIET, C.; KUNESCH, N.; POISSON, J. E. Rubiaceés D'océanie: Alcaloïdes de *Psychotria oleoides* de Nouvelle-Calédonie et de *Calycodendron milnei* du Vanatu (Nouvelles-Hébrides). **Journal of Natural Products**, v.50 (3), p. 468-473, 1987.

LIWSZYC, G. E.; VUORI, E.; RASANEN, I.; ISSAKAINEN, J. Daime – a ritual herbal potion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 91-92, 1992.

LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; Van POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selectes Hawaian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 23-32, 1995.

LOPES, S. O. **Análise Química e Cultivo *in vitro* de *Psychotria leiocarpa* Cham. et Schltl. e *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae)**. Porto Alegre:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1998 (Dissertação de Mestrado).

LOPES, S.; von POSER, G. L.; KERBER, V. A.; FARIAS, F. M.; KONRATH, E. L.; MORENO, P.; SOBRAL, M. E.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 1187-1195, 2004.

LORENCE, A.; NESSLER, C. Camptothecin, over four decades of surprising findings. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2735, 2749, 2004.

MACCIONI, R. B.; MUNÔZ, J. P.; BARBEITO, L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. **Archives of Medical Research**, v. 32, p. 367-381, 2001.

MACÊDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; BELCHIOR, L. D.; SANTOS, R. S.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Alterations in monoamine levels after cocaine-induced status epilepticus and death in striatum and prefrontal cortex of mice. **Neuroscience Letters**, v. 362, p. 185-188, 2004.

MAHMUD, Z.; MUSA, M.; ISMAIL, N.; LAJIS, N. H. Citotoxicity and Bactericidal Activity of *Psychotria rostrata*. **International Journal of Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 142-146, 1993.

MANOACH, D. S. Prefrontal cortex dysfunction during working memory performance in schizophrenia: reconciling discrepant findings. **Schizophrenia Research**, v. 60, p. 285-298, 2003.

MARCHETTI, B.; ABBRACCHIO, M. P. To be or not to be (inflamed) – is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, p. 517-525, 2005.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MASILAMONI, J. G.; VIGNESH, S.; KIRUBAGARN, R.; JESUDASON, E. P.; JAYAKUMAR, R. The neuroprotective efficacy of α -crystallin against acute inflammation in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 67, p. 235-241, 2005.

MATSUKAWA, M.; OGAWA, M.; NAKADATE, K.; MACSHIMA, T.; ICHITANI, Y.; KAWAI, N.; OKADO, N. Serotonin and acetylcholine are crucial to maintain hippocampal synapses and memory acquisition in rats. **Neuroscience Letters**, v. 230, p. 13-16, 1997.

McGAW, L. J.; JÄGER, A. K.; van STADEN, J. Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 247-263, 2000.

McGEER, E. G.; McGEER, P. L. Inflammatory process in Alzheimer's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, p. 741-749, 2003.

McGEER, P. L.; McGEER, E. G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 10, p. S3-S7, 2004.

McKENNA, D. J. TOWERS, G. H. N.; ABBOTT, F. Monoamine oxidase inhibitors in south American hallucinogenic plants: tryptamine and β -carboline constituents of Ayahuasca. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, p. 195-223, 1984.

MELLO, S.B.V.; FARSKY, S.H.P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of neutrophil chemotaxis and chemokinesis associated with plasma protein in aging rats: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 51, p. 46-52, 1992.

MELO, L. F. C.; BOTTONI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F.; RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

MICHAEL, D. J.; WIGHTMAN, R. M. Electrochemical monitoring of biogenic amine neurotransmission in real time. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 33-46, 1999.

MICHAELIS, M. L. Drugs targeting Alzheimer's disease: some things old and some things new. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, p. 897-904. 2003.

MILLAN, M. J.; LEJEUNE, F.; GOBERT, A. Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor control of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic transmission in the frontal cortex: relevance to the actions of antidepressant agents. **Journal of Psychopharmacology**, v. 14, p. 114-138, 2000.

MITCHELL, E. S.; NEUMAIER, J. F. 5-HT₆ receptors: a novel target for cognitive enhancement. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 108, p. 320-333, 2005.

MONTINE, K. S.; QUINN, J. F.; ZHANG, J.; FESSEL, J. P.; ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D.; MONTINET, J. Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 128, p. 117-124, 2004.

MUHAMMAD, I.; DUNHAR, D. C.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; BEDIR, E.; TAKAMATSU, S.; FERREIRA, D.; WALKER, L. A. Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 962-967, 2003.

MULDER, J.; HARKANY, T.; CZOLLNER, K.; CREMERS, T. I. F. H.; KEIJSER, J.; NYAKAS, C.; LUITEN, P. G. M. Galantamine-induced behavioral recovery after sublethal excitotoxic lesions to the rat medial septum. **Behavioral Brain Research**, v. 163, p. 33-41, 2005.

NAGATSU, T.; ASANO, M.; KANEDA, N. Simple method for the simultaneous determination of acetylcholine, choline, noradrenaline, dopamine and serotonin in brain tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography**, v. 360, p. 211-218, 1986.

NAGATSU, T. Amine-related neurotoxins in Parkinson's disease. Past, present and future. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, p. 565-569, 2002.

NAGHDI, N.; HAROONI, H. E. The effect of intrahippocampal injections of ritanseri (5HT_{2A/2C} antagonist) and granisetron (5HT₃ antagonist) on learning as assessed in the spatial version of the water maze. **Behavioral Brain Research**, v. 157, p. 205-210, 2005.

NALINI, K.; KARANTH, K. S.; RAO, A.; AROOR, A. R. Effects of *Celastrus paniculatus* on passive performance and biogenic amine turnover in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 101-108, 1995.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, K. Reorganization of the Genus *Psychotria* and the Tribe Psychotreae (RUBIACEAE) Inferred from ITS and *rbcl* Sequence Data. **Systematic Botany**. V. 24, n. i, p. 5-27, 1999.

NETTO, C. A.; SIEGRIED, B.; IZQUIERDO, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect if concurrent and post-training stressful stimulation. **Behavioral and Neural Biology**, v. 48, p. 304-309, 1987.

NIKOLAJSEN, R. P. H.; HANSEN, A. M. Analytical methods for determining urinary catecholamines in healthy subjects. **Analítica Chimica Acta**, v. 449, p. 1-15, 2001.

NIZRI, E.; ADANI, R.; MESHULAN, H.; AMITAI, G.; BRENNER, T. Bifunctional compounds eliciting both anti-inflammatory and cholinergic activity as potential drugs for neuroinflammatory impairments. **Neuroscience Letters**, v. 176, p. 46-50, 2005.

NOZAKI, O.; IWAEDA, T.; KATO, Y. Amines for detection of dopamine by generation of hydrogen peroxide and peroxyoxalate chemiluminescence. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**, v. 11, p. 309-313, 1996.

NYBERG, L.; PERSSON, J.; NILSSON, L.G. Individual differences in memory enhancement by encoding enactment: relationships to adult age and biological factors. **Neuroscience and Behavioural Reviews**, v. 26, p. 835-839, 2002.

OH, M. H.; HOUGHTON, P. J.; WHANG, W. K.; CHO, J. H. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. **Phytomedicine**, v. 11, p. 544-551, 2004.

OKADO, N.; NARITA, M.; NARITA, N. A biogenic amine-synapse mechanism for mental retardation and developmental disabilities. **Brain and Development**, v. 23, p. S11-S15, 2001.

OKOLI, C. O.; AKAH, P. A. Mechanisms of the anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Culcasia scandens* P. Beauv (Araceae). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 79, p. 493-481, 2004.

OU, K. Y.; TANG, X. C.; CAI, J. X. Effect of huperzine A on working memory in reserpine- or yohimbine-treated monkeys. **European Journal of Pharmacology**, v. 433, p. 151-156, 2001.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 233-241, 2000.

PAGEL, P.; BLOME, J.; WOLF, H. U. High-performance liquid chromatography separation and measurement of various biogenic compounds possibly involved in the pathomechanism of Parkinson's disease. **Journal of Chromatography B**, v. 746, p. 297-304, 2000.

PAPAZIAN, O.; ALFONSO, I.; LUZONDO, R. J. Trastornos de las funciones ejecutivas. **Revista de Neurologia**, v. 42, p. S45-S50, 2006.

PARIHAR, M. S.; CHAUDHARY, M.; SHETTY, R.; HEMNANI, T. Susceptibility of hippocampus and cerebral cortex to oxidative damage in streptozotocin treated mice: prevention by extracts of *Withania somnifera* and *Aloe vera*. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, p. 397-402, 2004.

PATEL, B. A.; ARUNDELL, M.; PARKER, K. H.; YEOMAN, M. S.; O'HARE, D. Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography. B**, v. 818, p. 269-276, 2005.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 50-52, 2005.

PAUL, J. H. A.; MAXWELL, A. R.; REYNOLDS, W. F. Novel bis (monoterpenoid) indole alkaloids from *Psychotria bahiensis*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 752-754, 2003.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1986.

PERRY, V. H.; NEWMAN, T. A.; CUNNINGHAM, C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. **Nature Reviews**, v. 4, p. 103-112, 2003.

PETTIT, E., Les espèces africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae). **Bulletin du Jardin Botanique de Bruxelles**, 34, 1-229, 1964.

PETTIT, E., Les espèces africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae). II. **Bulletin du Jardin Botanique de Bruxelles**, 36, 65-189, 1966.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and Medicinal Plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PIRES, J. G. P.; BONIKOVSKI, V.; FUTURO-NETO, H. A. Acute effects of selective serotonin reuptake inhibitors on neuroleptic-induced catalepsy in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1867-1872, 2005.

PLISZKA, S. T. The neuropsychopharmacology of attention-deficit / hiperactive disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1385-1390, 2005.

PRABHU, V.; KARANTH, K. S.; RAO, A. Effects of *Nardostachys jatamansi* on biogenic amines and inhibitory amino acids in the rat brain. **Planta Medica**, v. 60, n. 2, p. 114-117, 1994.

QU, Y.; MOONS, L.; VANDESANDE, F. Determination of serotonin, catecholamines and their metabolites by direct injection of supernatates from chicken brain tissue homogenate using liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 704, p. 353-358, 1997.

RAHMAN, A. U.; ZAMAN, K.; PERVEEN, S.; REHMAN, H. U.; MUZAFFAR, A.; CHOUDHARY, M. I.; PERVIN, A. Alkaloids from *Rhazya stricta*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1285-1293, 1991.

RAMAEKERS, J. G.; LAWRENCE, J. W.; MUNTJEWERFF, N. D.; MILIUS, H.; de BIE, A.; ROSENZWEIG, P.; PALAT, A.; O'HANLON, J. F. Psychomotor, cognitive, extrapyramidal and affective functions of healthy volunteers during treatment with an atypical (amisulpiride) and a classic (haloperidol) antipsychotic. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 19, p. 209-221, 1999.

RAMBADRAN, K.; BANSINATH, M.; TURDORF, H.; PUIG, M. Tail immersion test for the evaluation of a nociceptive reaction in mice: methodological considerations. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 21, p. 21-23, 1989.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RASOLONJANAHARY, R.; SÉVENET, T.; VOEGELEIN, G. F.; KORDON, C. Psycholeine, a Natural Alkaloid Extracted from *Psychotria oleoides*, Acts as a Weak Antagonist of Somatostatin. **European Journal of Pharmacology**, v. 285, p. 19-23, 1995.

REANMONGKOL, W.; SUDHADHIRASAKUL, S.; KONGSANG, J.; TANCHONG, M.; KITTI, J. Analgesic and antipyretic activities of N-butanol alkaloids extracted from the stem bark *Hunteria zeilanica* and its major constituent, strictosidinic acid, in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 68-73, 2000.

REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, 2006, Águas de Lindóia. **Programa e Resumos**. Disponível em <<https://sec.s bq.org.br/cd29ra/index2.htm>>. Acesso em 02.06.2006.

RICHARD, I. H. Anxiety disorders in Parkinson's disease. **Advanced Neurology**, v. 96, p. 42-55, 2005.

RIVIER, L. LINDGREEN, J. E. "Ayahuasca", The South America Hallucinogenic Drink: An Ethnobotanical and Chemical Investigation. **Economic Botanic**, v. 26, p.101-129, 1972.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1996.

ROBBRECHT, E. Tropical Wood Rubiaceae. **Opera Botanica**. v. 1, 1988.

ROBBRECHT, E. National Botanic Garden of Belgium. **Monographic and systematic studies in Rubiaceae**. Bélgica. Disponível em <http://www.br.fgov.be/RESEARCH/PROJECTS/rubiaceae.html>. Acesso em 14.11.2005.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural Products in Anticancer Therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1 (4), p. 364-369, 2001.

ROTH, A; CABALLION, P.; ANTON, R. Preliminary studyof the alkaloids of *Psychotria forsteriana*. **Planta Medica**, v. 3, p. 289, 1985.

ROTH, A.; KUBALLA, B.; BONTANH, C.; CABALLION, P.; SÉVENET, T.; BECK, J. P.; ANTON, R. Cytotoxic Activity of Polyindoline Alkaloids of *Psychotria forsteriana* (Rubiaceae) (1). **Planta Medica**, v. 5, p. 450-453, 1986.

SAHA, K.; LAJIS, N. H.; ISRAF, D. A.; HAMZAH, A. S.; KHOZIRAH, S.; KHAMIS, S.; SYAHIDA, A. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malasyan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 263-267, 2004.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tchykini antagonists in spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 1279-1285, 1992.

SALMON, D. P.; BUTTERS, N. Neurobiology of skill and habit learning. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, p. 184-190, 1995.

SANDERS-BUSH, E.; MAYER, S. E. Agonistas e antagosnistas dos receptors da 5-hidroxitriptamina (serotonina). In: HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2001.

SANTUCCI, A. C.; KNOTT, P. J.; HAROUTUNIAN, V. Excessive serotonin release, not depletion, leads to memory impairments in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 295, p. 7-17, 1996.

SAWYNOK, J.; REID, A.; MEISNER, J. Pain Behaviors produced by capasaicin: influence of inflammatory mediators and nerve injury. **The Journal of Pain**, v. 7, p. 134-141, 2006.

SEMBA, K.; ADACHI, N.; ARAI, T. Facilitation of serotonergic activity and amnésia in rats caused by intravenous anesthetics. **Anesthesiology**, v. 102, p. 616-623, 2005.

SHIMIZU, I.; ADACHI, N.; LIU, K.; NAGARO, T.; ARAI, T. Sepsis facilitates brain serotonin activity and impairs learning ability in rats. **Brain Research**, v. 830, p. 94-100, 1999.

SHOHAMY, D.; MYERS, C. E.; GROSSMAN, S.; SAGE, J.; GLUCK, M. A. The role of dopamine in cognitive sequence learning: evidence from Parkinson's disease. **Behavioral Brain Research**, v. 156, p. 191-199, 2005.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, 1053-1071, 1998.

SIRIPURAPU, K. B.; GUPTA, P.; BHATIA, G.; MAURYA, R.; NATH, C.; PALIT, G. Adaptogenic and anti-amnesic properties of *Evolvulus alsinoides* in rodents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 81, p. 424-432, 2005.

SMITH, G. N. Strictosidine: a key intermediate in biogenesis of indole alkaloids. **Chemical Communications**, v. 15, p. 912-914, 1968.

SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; GUPTA, M. P.; PHILLIPSON, J. D. Alkaloids from *Cephaelis dichroa*. **Phytochemistry**, v. 33 (5), p. 1117-1119, 1993.

SOLIS, P. N.; RAVELO, A. G.; PALENZUELA, J. A.; GUPTA, M. P.; GONZÁLEZ, A.; PHILLIPSON, J. D. Quinoline Alkaloids from *Psychotria glomerulata*. **Phytochemistry**, v. 44 (5), p. 963-970, 1997.

SOMÉ, I. T.; SEMDE, R.; MOUSTAPHA, O.; AMIGHI, K.; GUISSOU, P. J.; DUEZ, P.; DUBOIS, J. Validation of gentamicin congeners using HPLC with electrochemical detection: comparison with fluorimetric detection. **C R Chimic**, v. 7, p. 1087-1093, 2004.

SQUIRE, L. R. The organization and neural substrates of human memory. **International Journal of Neurology**, v. 21, p. 218-222, 1987.

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. The medial temporal lobe memory system. **Science**, v. 253, p. 1380-1386, 1991.

STACKMAN, R. W.; ECKENSTEIN, F.; FREI, B.; KULHANCK, D.; NOWLIN, J.; QUINN, J. F. Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic *Ginkgo biloba* treatment. **Experimental Neurology**, v. 184, p. 510-520, 2003.

STANDAERT, D. G.; YOUNG, A. B. Tratamento dos distúrbios do Sistema nervoso central. In: HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2001.

STANDRIDGE, J. B. Pharmacotherapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease. **Clinical Therapeutics**, v. 26, p. 615-630, 2004.

STEFFEN, V. **Estudio del efecto de la vitamina E, el selenio, el deprenilo y la acetil-carnitina sobre la acción tóxica del 1-metil-4-fenilpiridinio**. Sevilla: Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología, 1994 (Tese de Doutorado).

STEFFEN, V.; SANTIAGO, M.; De la CRUZ, C. P.; REVILLA, E.; MACHADO, A.; CANO, J. Effect of intraventricular injection of 1-methyl-4-phenylpyridinium: protection by acetyl-L-carnitine. **Human & Experimental Toxicology**, v. 14, p. 865-871, 1995.

STEIN, M. B.; HEUSER, I. J. ; JUNCOS, J. L. ; UHDE, T. W. Anxiety disorders in patients with Parkinson's disease. **American Journal of Psychiatry**, v. 147, p. 217-220, 1990.

STEYERMARK, J., Botany of the Guyana Highlands. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 23, p. 227-832,1972.

STIP, E.; CHOUINARD, S.; BOULAY, L. J. On the trail of a cognitive enhancer for the treatment of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 29, p. 219-232, 2005.

STORGA, D.; VRECKO, K.; BIRKMAYER, J. G. D.; REIBNEGGER, G Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. **Neuroscience Letters**, v. 203, p. 29-32, 1996.

STÜVE, O.; YOUSSEF, S.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. Statins as potential therapeutic agents in neuroinflammatory disorders. **Current Opinion in Neurology**, v. 16, p. 393-401, 2003.

SUBHADHIRASAKUL, S.; AIMI, N.; TAKAYAMA, H.; PONGLUX, D.; SAKAI, S. Hunteroside, first biose bound monoterpenoid indole alkaloid from *Hunteriazeilanica*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, p. 991-993, 1994.

SUDHA. S.; LAKSHMANA, M. K.; PRADHAM, N. Phenobarbital in the anticonvulsivant dose range does not impair learning and memory or alter brain AchE activity or monoamine levels. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 633-638, 1996.

SUYENAGA, E. S. **Avaliação da atividade antiinflamatória de flavonóides por ensaios in vivo e in vitro**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2002 (Tese de Doutorado).

TANG, X. C.; HAN, Y. F. Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from Chimese herb. **CNS Drug Reviews**, v.5, p. 281-300, 1999.

TAYLOR, C. M. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae) in México and Central America. **Systematic Botany Monographs**, 261, p.1-112, 1989.

TAYLOR, C. M. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) in the West Indies. **Moscosa**, v. 7, p. 201-241, 1993.

TAYLOR, C. M. Overview of the *Psychotrieae* (Rubiaceae) in the Neotropics. **Opera Botanica. Belga**. 7, 1996.

TAYLOR, C. M. **Cephaelis (Rubiaceae: Psychotrieae)**, 1997. Disponível na Internet no endereço <http://www.mbot.org/MOBOT/Staff/Research/taylor/cephaeli.html>.

TRUONG, J. G.; RAU, K. S.; HANSON, G. R.; FLECKENSTEIN, A. E. Pramipexole increases vesicular dopamine uptake implications for treatment of Parkinson's neurodegeneration. **European Journal of Pharmacology**, v. 474, p. 223-226, 2003.

TULVING, E.; MARKOWITSCH, H. J. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. **Hippocampus**, v. 8, p. 198-204, 1998.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 24 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, p. 1920-1924 e 2149-2151, 2000.

VALLONE, d.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, V. 24, p. 125-132, 2000.

VALVERDE, J.; TAMAYO, G.; HESSE, M. β -Carbolines Monoterpenoid Glucosides from *Palicourea adusta*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1485-1489, 1999.

Van PRAAG, H. M. Can stress cause depression? **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 28, p. 891-907, 2004.

VEROTTA, L.; PETERLONGO, F.; ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; NUNES, D. S. High-performance liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry analyses of the alkaloid extracts of Amazon *Psychotria* species. **Journal of Chromatography A**, v. S41, p. 165-176, 1998.

VEROTTA, L.; ORSINI, F.; SBACCHI, M.; SCHEILDLER, M. A.; AMADOR, T. A.; ELISABETSKY, E. Synthesis and antinociceptive activity of chimonathines and pyrrolinoindoline-type alkaloids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2133-2142, 2002.

VIANA, G. S. B. **Doenças neurodegenerativas**. In: GRAEFF, F. G.; Brandão, M. L. (Ed.). **Neurobiologia das doenças mentais**, 5 ed. São Paulo: Lemos Editorial, 1999.

VICENTE-TORRES, M. A.; GIL-LOYZAGA, P.; CARRICONDO, F.; BARTOLOMÉ, M. V. Simultaneous HPLC quantification of monoamines and metabolites in the blood-free rat cochlea. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 119, p. 31-36, 2002.

VINGERHOEST, G.; VERMEULE, E.; SANTENS, P. Impaired intentional content learning but not spared incidental retention of contextual information in non-demented patients with Parkinson's disease. **Neuropsychologia**, v. 43, p. 675-681, 2005.

VIZUETE, M. L.; STEFFEN, V.; AYALA, A.; CANO, J.; MACHADO, A. protective effect of deprenyl against 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in rat striatum. **Neuroscience Letters**, v.152, p. 113-116, 1993.

WALLINGFORD, R. A.; EWING, A. G. Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, v. 59, p.1762-1766, 1987.

WANG, L.; HAN, Y. F.; TANG, X. C. Huperzine A improves cognitive deficits caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.398, p. 65-72, 2000.

WERKMAN, T. R.; GLENNON, J. C.; WADMAN, W. J.; McCREARY, A. C. Dopamine receptor pharmacology: interactions with serotonin receptors and significance for the aetiology and treatment of schizophrenia. **CNS & Neurological Disorders – Drug Targets**, v. 5, p. 3-23, 2006.

WILSON, J. M.; SANYAL, S.; Van TOL, H. H. M. Dopamine D₂ and D₄ receptor ligands: relation to antipsychotic action. **European Journal of Pharmacology**, v. 351, p. 273-286, 1998.

WITHERUP, K. M.; BOGUSKY, M. J.; ANDERSON, P. S.; RAMJT, H. Cyclopsychoptide A, a Biologically Active, 31-Residue Cyclic Peptide Isolated from *Psychotria longipes*. **Journal of Natural Products**, v. 57 (12), p. 1619-1625, 1994.

WOOD, A T.; HALL, M. R. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of catecholamines and indoleamines using a simple gradient solvent system and native fluorescence detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 744, p. 221-225, 2000.

YAMASHITA, K.; TANAKA, S. Parametric study of dopaminergic neuromodulatory effects in a reduced model of the prefrontal cortex. **Neurocomputing**, v. 65-66, p. 579-586, 2005.

YAMAZAKI, Y.; URANO, A.; SUDO, H.; KITAJIMA, M.; TAKAYAMA, H.; YAMAZAKI, M.; AIMI, N.; SAITO, K. Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants. **Phytochemistry**, v. 62, p. 461-470, 2003.

YOON, S. Y.; KWON, Y. B.; KIM, H. W.; ROH, D. H.; KANG, S. Y.; KIM, C. Y.; HAN, H. J.; KIM, K. W.; YANG, I. S.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. Intrathecal neostigmine reduces the zymosan-induced inflammatory response in a mouse air pouch model via adrenomedullary activity: Involvement of spinal muscarinic type 2 receptors. **Neuropharmacology**, v. 49, p. 275-282, 2005.

ZANGARA, A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, p. 675-686, 2003.

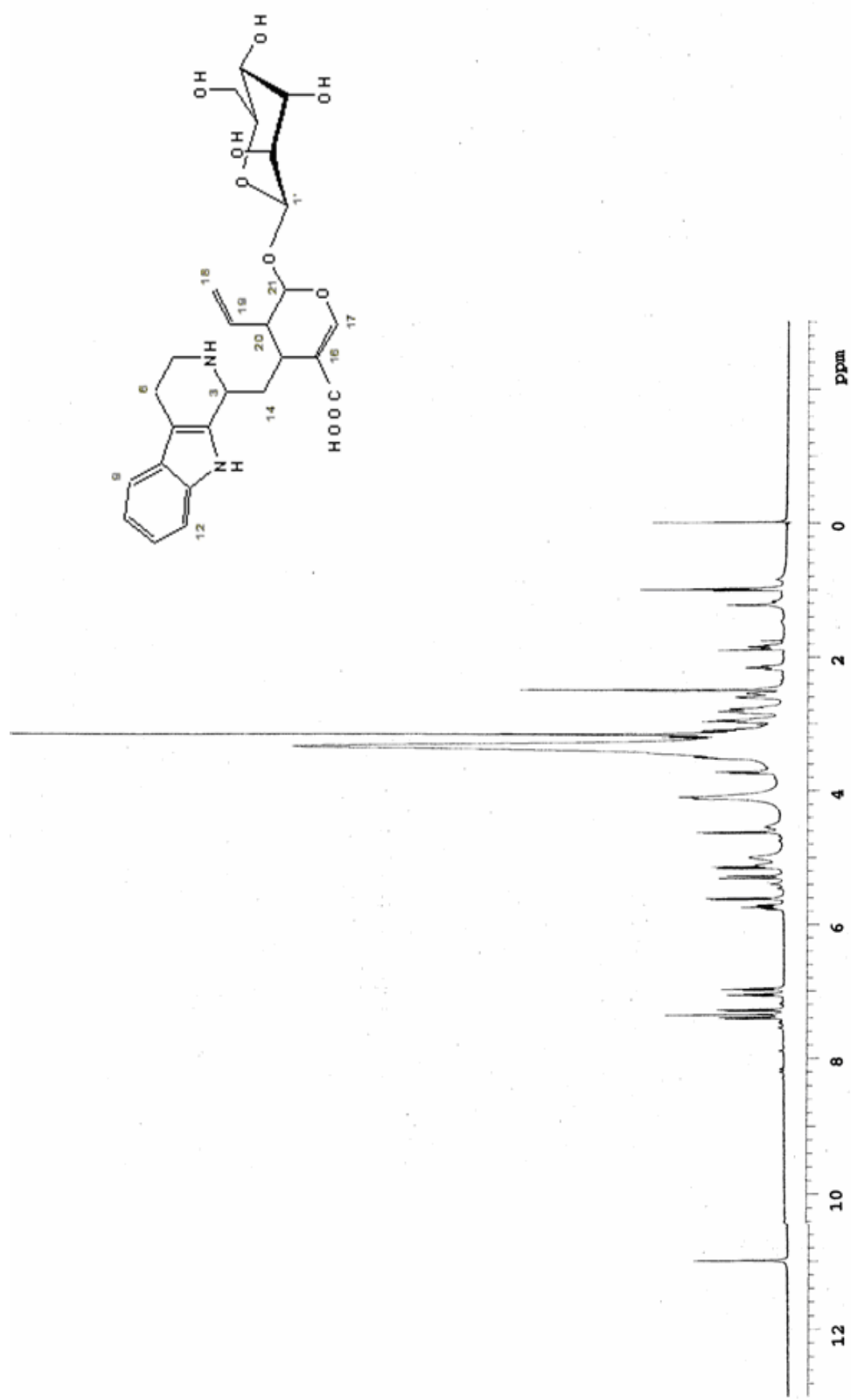
ZHANG, L.; ZHOU, F. M.; DANI, J. A. Cholinergic drugs for Alzheimer's disease enhance in vitro dopamine release. **Molecular Pharmacology**, v. 66, p. 538-544, 2004.

ZHOU, J. ZHANG, H. Y.; TANG, X. C. Huperzine A attenuates cognitive deficits and hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. **Neuroscience Letters**, v.313, 137-140, 2001.

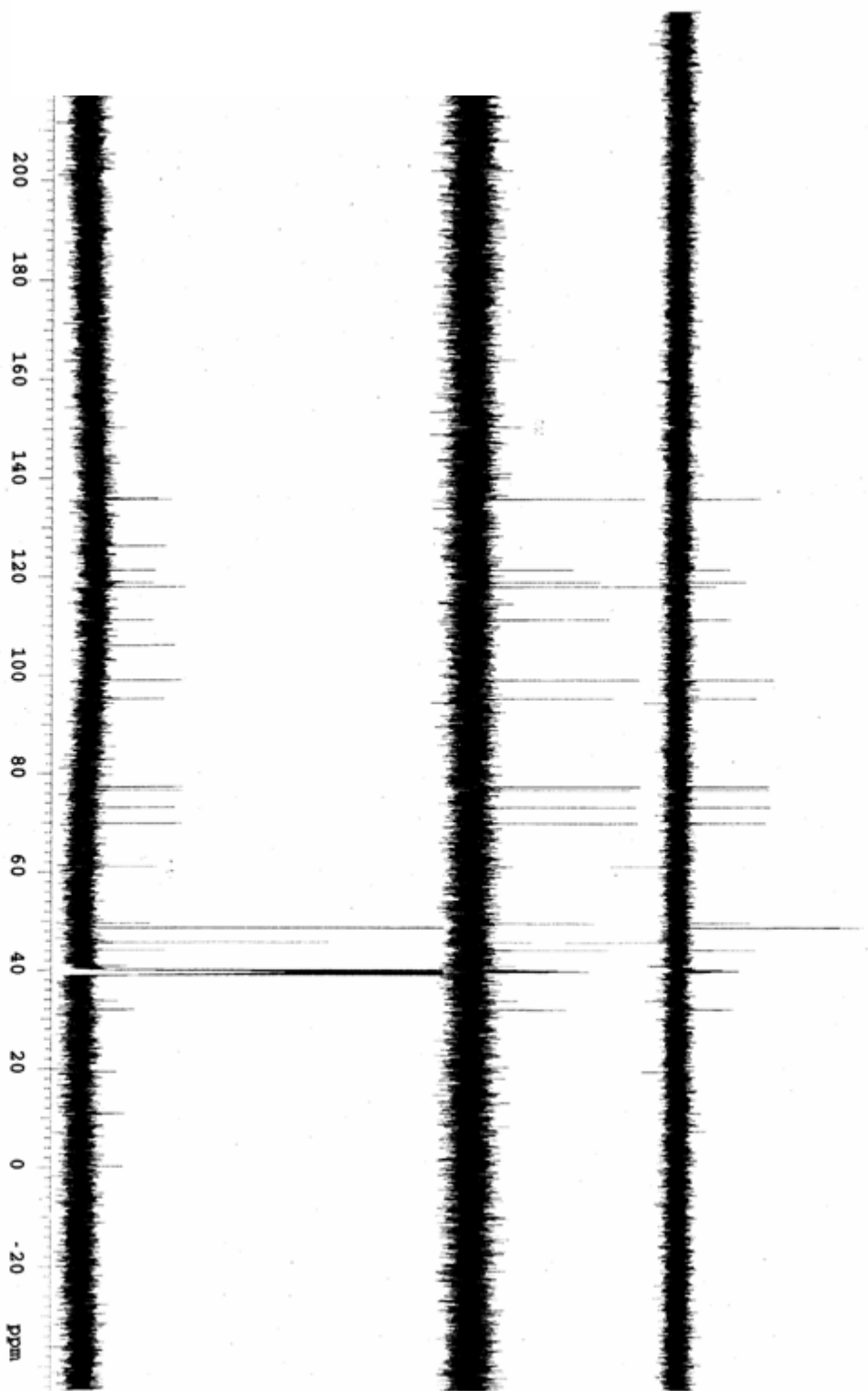
ZHU, X.; GIACOBINI, E.; HORNSPERGER, J. M. Effect of MDL 73,745 on acetylcholine and biogenic amine levels in rat cortex. **European Journal of Pharmacology**, v. 276, p. 93-99, 1995.

ZIGMOND, S.H.; HIRSCH, J.G. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. **Journal of Experimental Medicine**, v.137, p.387-410, 1973.

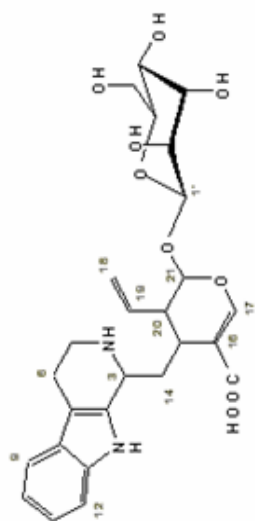
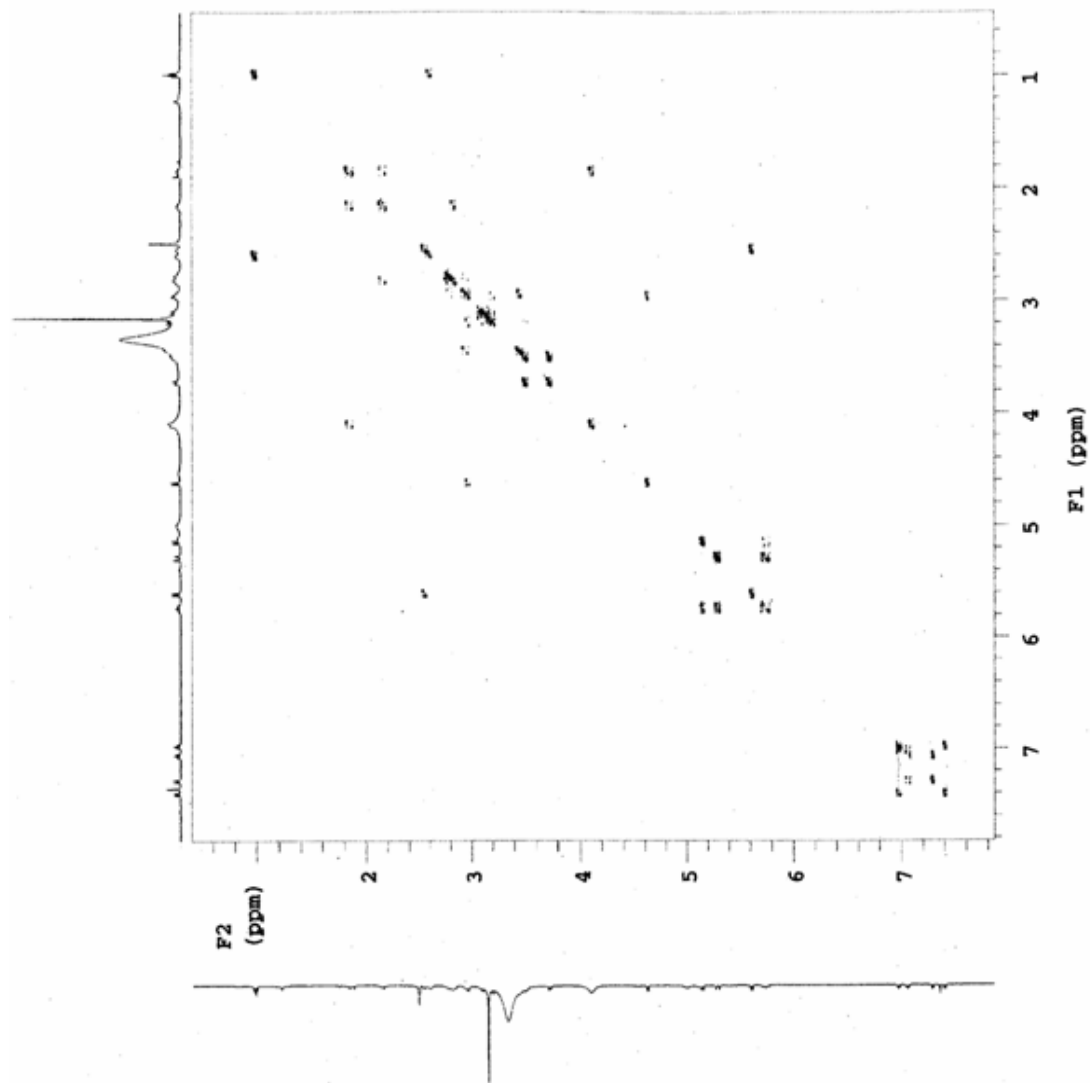
ANEXOS



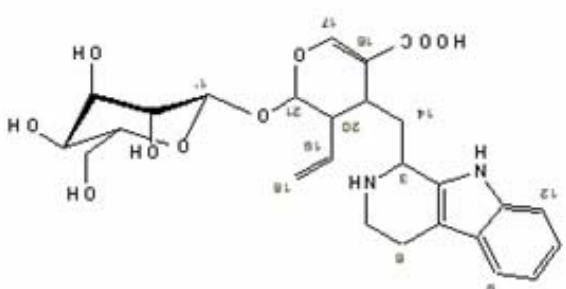
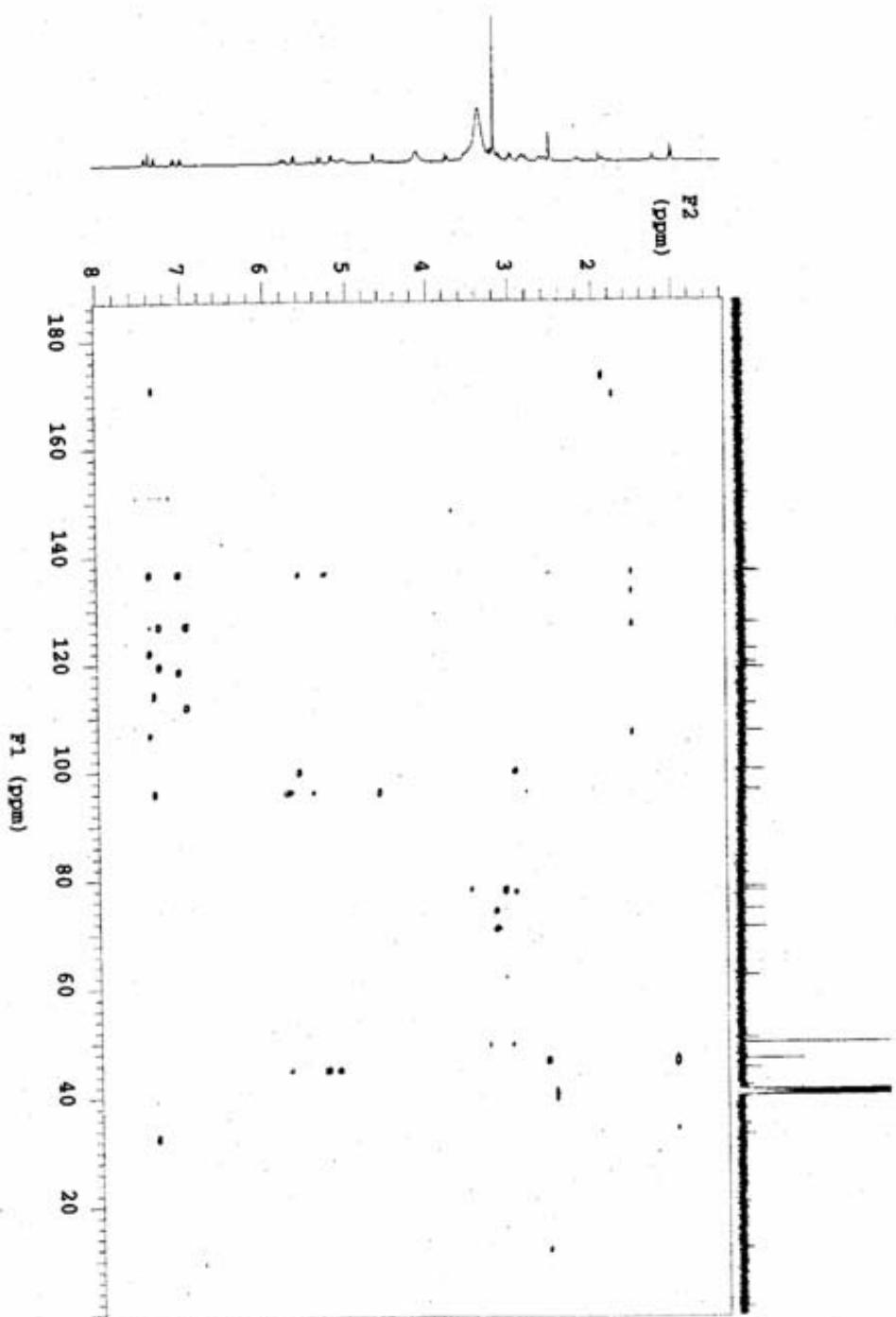
Espectro de H¹RMN para ácido estRICTOSIDÍNICO (DMSO-d₆; 500 MHz; tetrametilsilano como padrão interno).



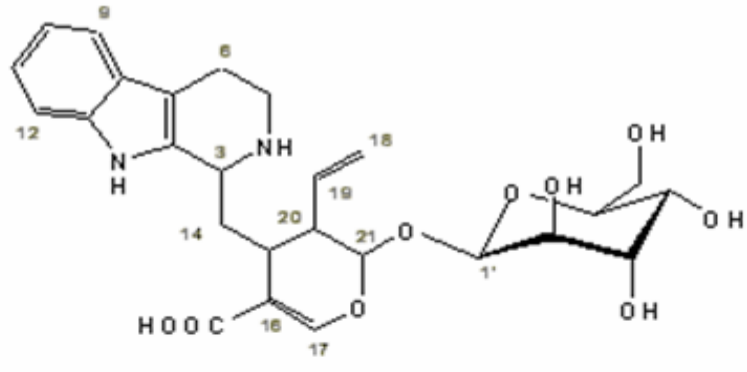
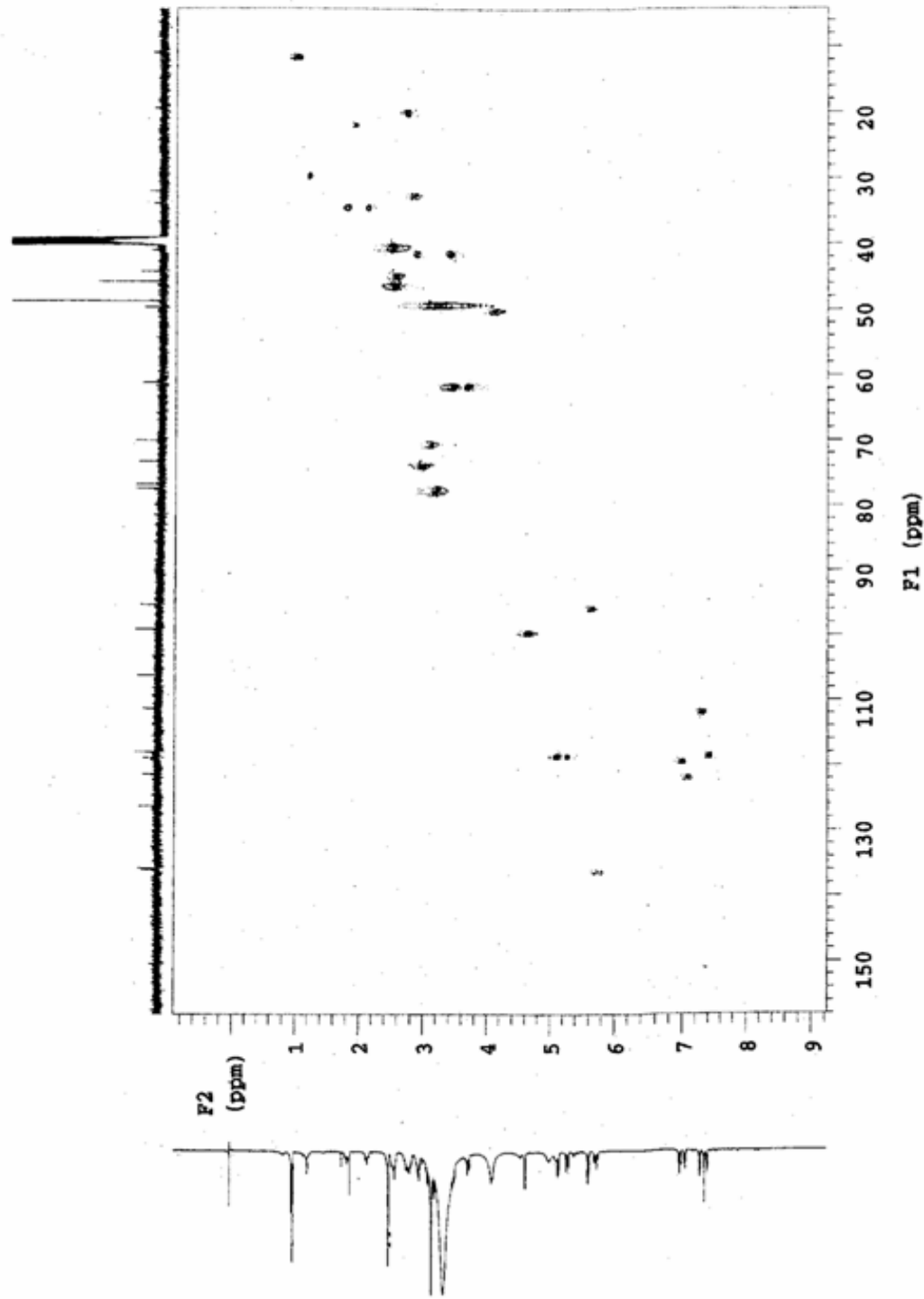
Espectro de ^{13}C RMN-DEPT para ácido strictosídico (DMSO- d_6 , 125 MHz; tetrametilsilano como padrão interno).



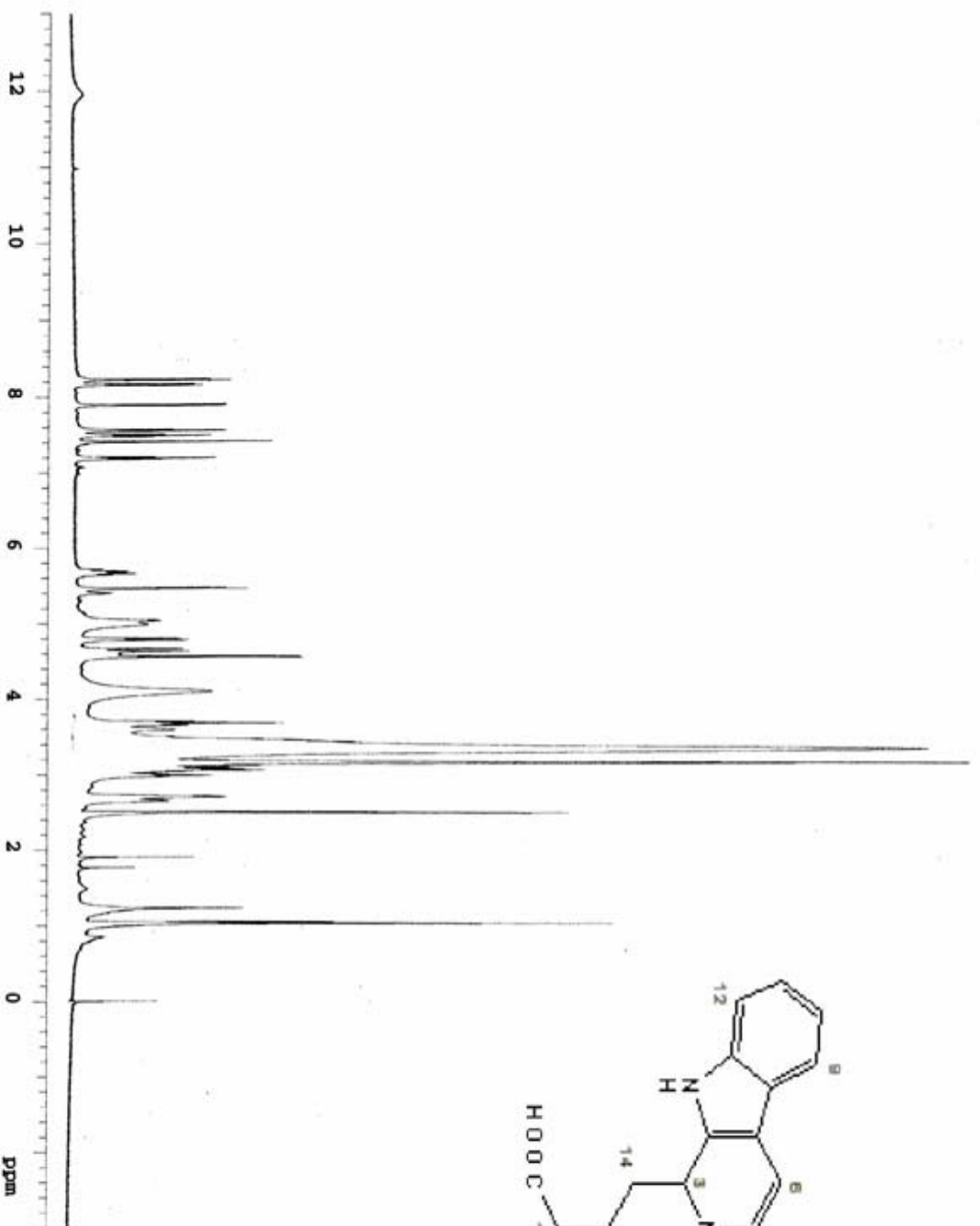
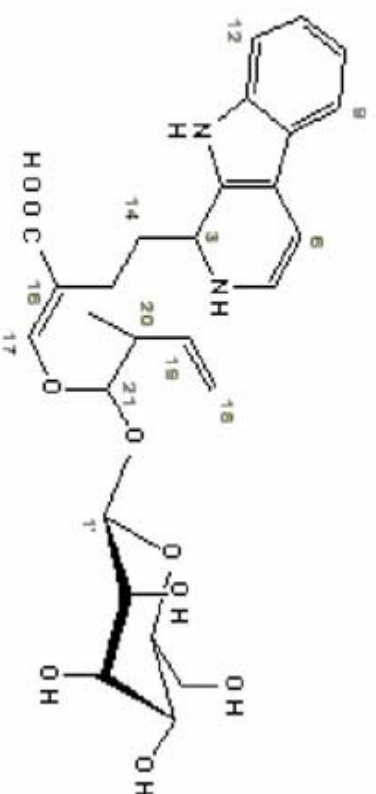
Espectro de H^1 - H^1 COSY para ácido estrictosidínico (DMSO- d_6 ; 500 MHz; tetrametilsilano como padrão interno).



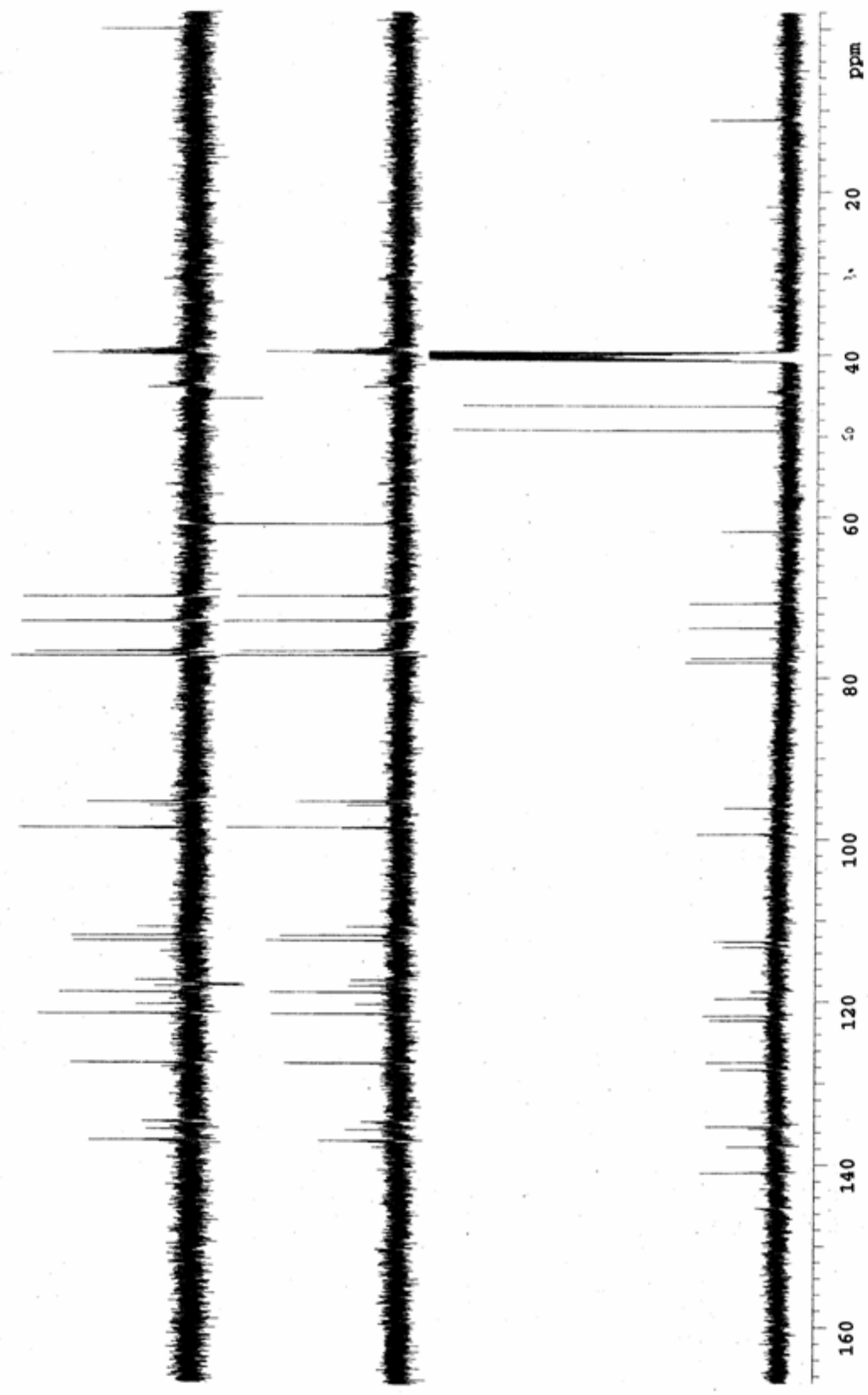
Espectro de HMBC para ácido stricteosidínico (DMSO- d_6 , 500 MHz, tetrametilsilano como padrão interno).



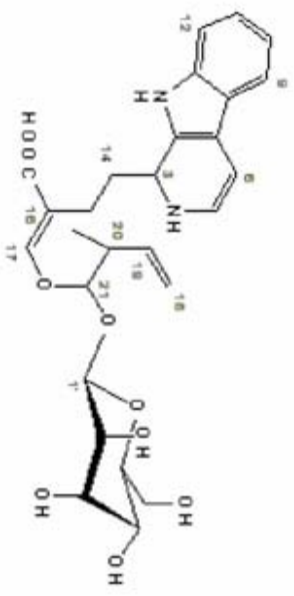
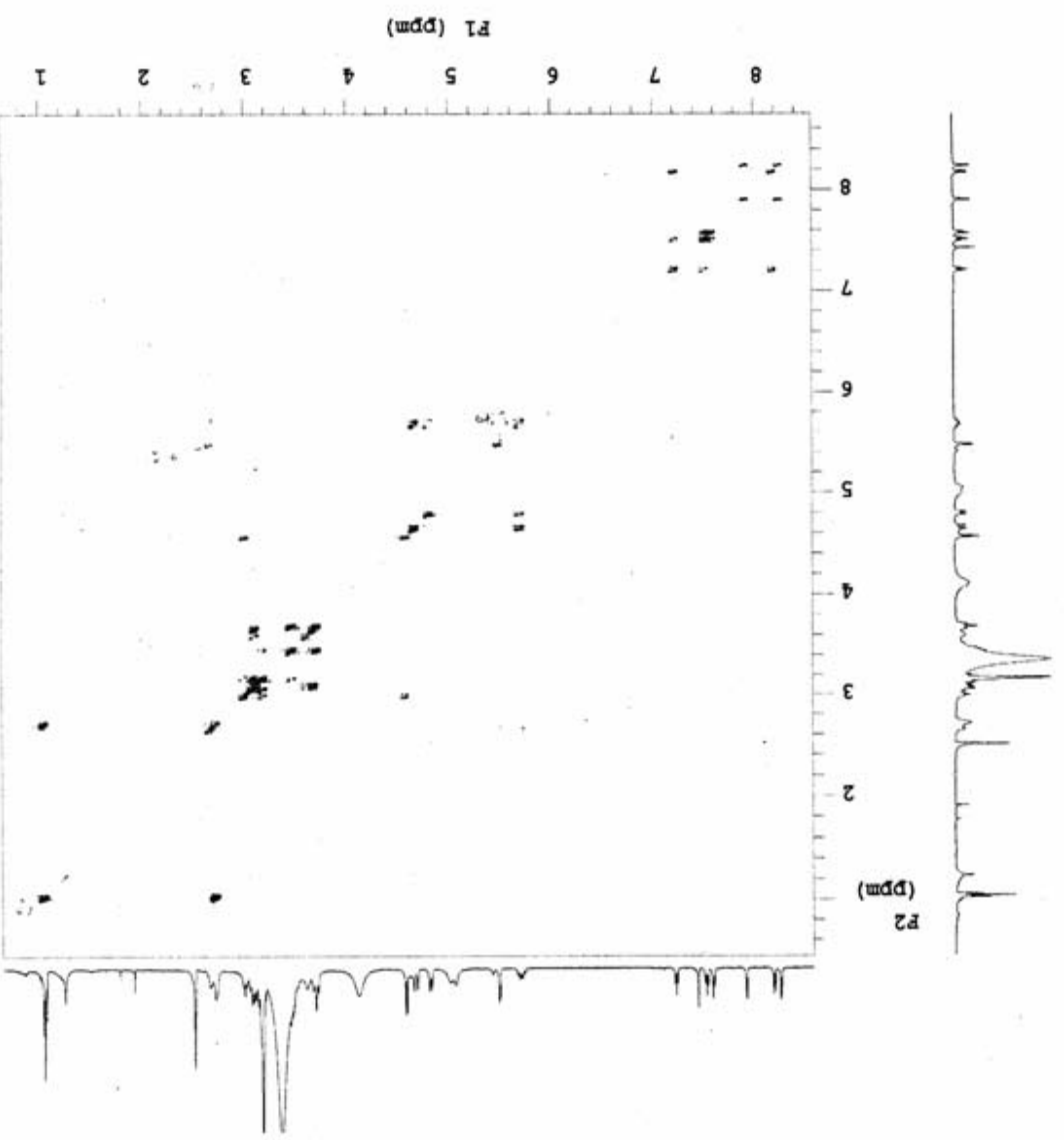
Espectro de HSQC para ácido strictosidínico (DMSO- d_6 ; 500 MHz; tetrametilsilano como padrão interno).



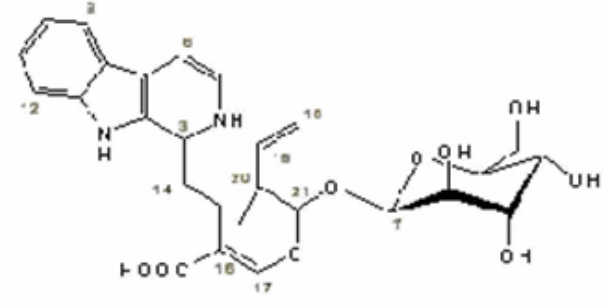
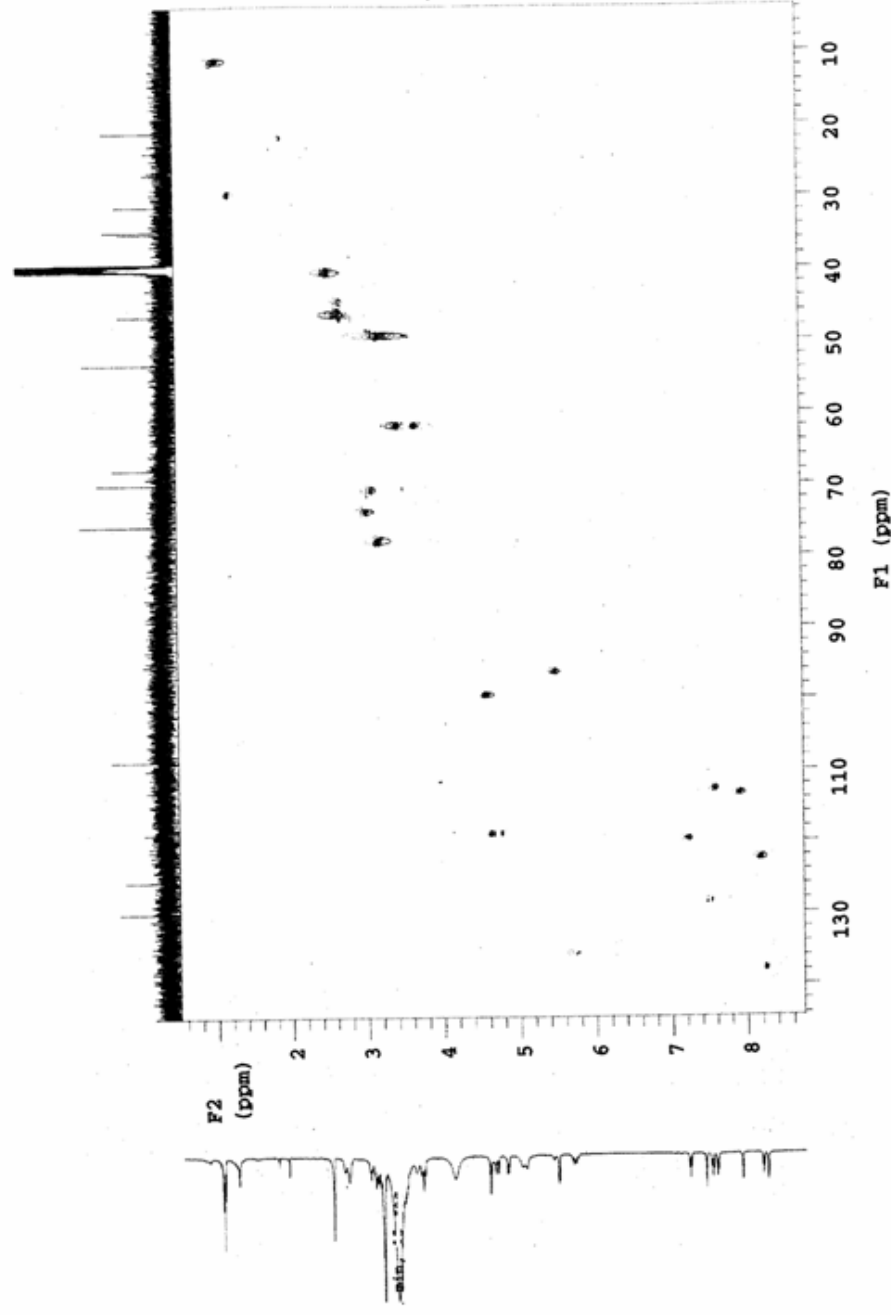
Espectro de H¹RMN para miriantosina (DMSO-d₆, 500 MHz, tetrametilsilano como padrão interno).



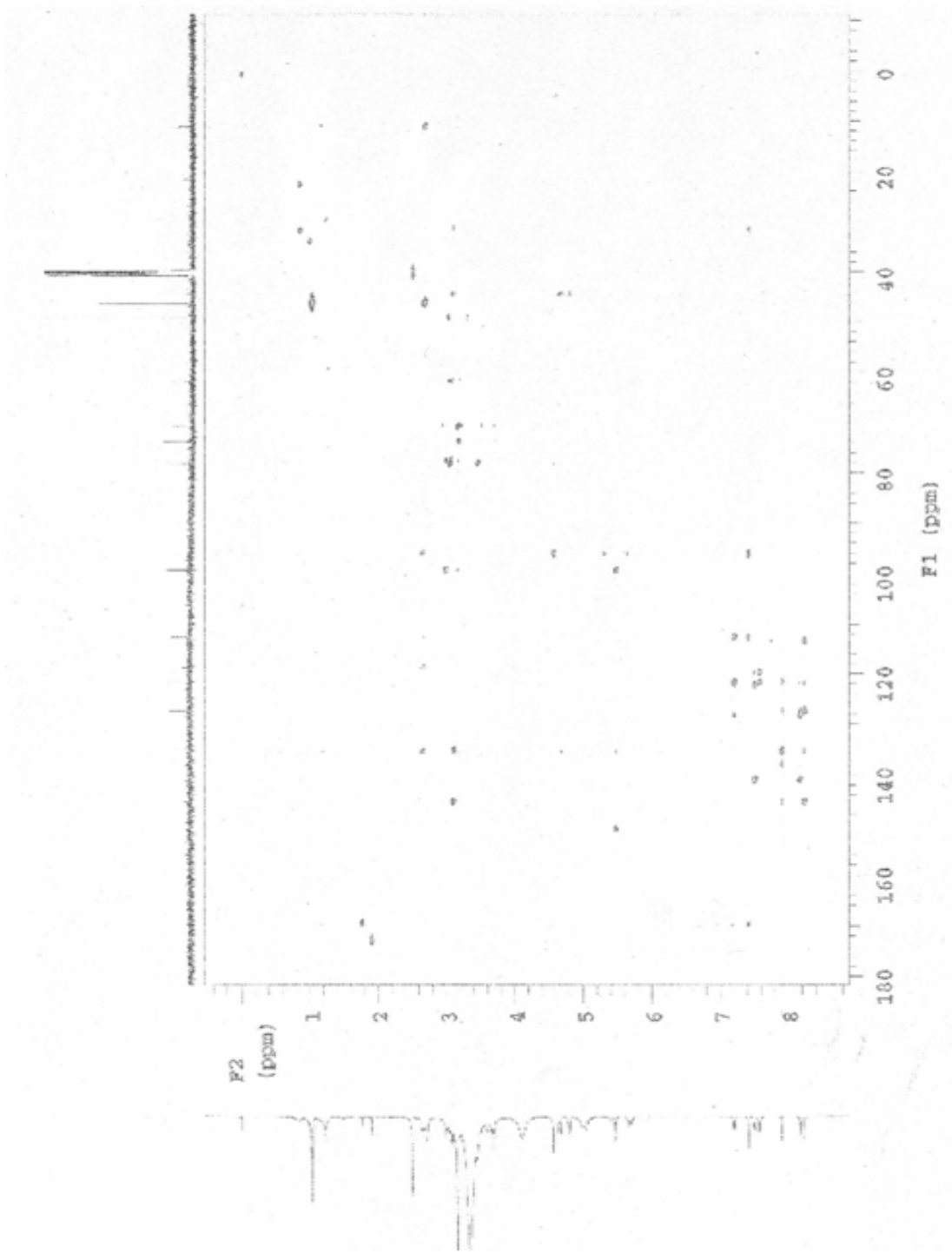
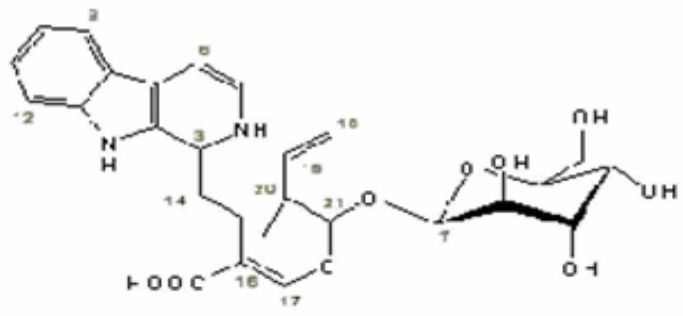
Espectro de C^{13} RMN-DEPT para miriantosina (DMSO- d_6 ; 125 MHz; tetrametilsilano como padrão interno).



Espectro de H^1-H^1 COSY para mirriantossina (DMSO- d_6 ; 500 MHz; tetrametilsilano como padrão interno).



Espectro de HSQC para miriantosina (DMSO- d_6 ; 500 MHz; tetrametilsilano como padrão interno).



Espectro de HMBC para miriantosina (DMSO-d₆; 500 MHz; tetrametilsilano como padrão interno).

Solução Salina de Hanks

Solução estoque

NaCl	40 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Água q.s.p.	500 mL

Solução Tris 1 M (hidróxi-aminoetano)

Tris	121 g
Água q.s.p.	1000 mL
pH 7,3 ajustado com HCl	

Solução de CaCl₂ (1,1 M)

CaCl ₂	12 g
Água q.s.p.	100 mL

Solução de MgSO₄

MgSO ₄ .7 H ₂ O	9,9 g
Água q.s.p.	100 mL

No momento da utilização

Solução estoque.....	100 mL
Solução Tris 1M	2,75 mL
Solução de CaCl ₂ (1,1 M)	170 µL
Solução de MgSO ₄	200 µL
Água q.s.p.	1000 mL
pH 7,35 ajustado com HCl 0,1 N e adição de 220 mg de dextrose	

Reagentes utilizados para coloração dos filtros no ensaio da câmara de Boyden

1) etanol absoluto	5 minutos
2) água	2 minutos
3) solução de hematoxilina	45-60 segundos
4) água	2 minutos
5) solução de "Tap water"*	10 minutos
6) etanol 70 %	10 minutos
7) etanol 95 %	10 minutos
8) butanol : etanol (4:1 V/V)	10 minutos
9) xilol	12 horas

*solução de Tap water: sobrenadante de uma solução saturada de carbonato de lítio.



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA PROPEQ

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

RESOLUÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número:2003139

Título do projeto: Análise de Alcalóides de *Psychotria myriantha* Müel. Arg e *P. nuda* (Cham. Et Schltdl) Wawra (Rubiaceae)

Investigador(es) principal(ais): Amélia T. Henriques(Orientadora) e Fabiane Moreira Farias(Doutoranda)

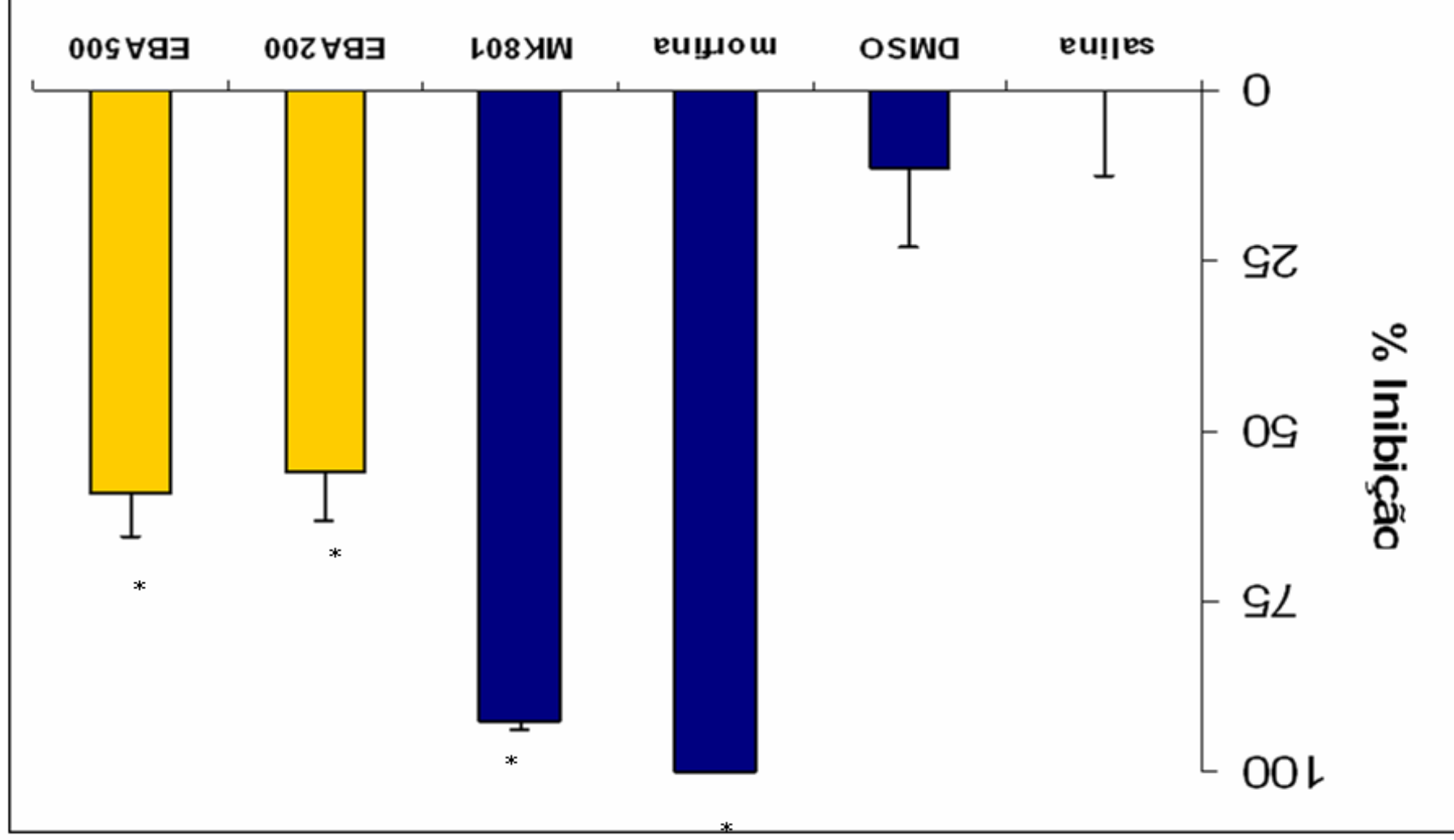
O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião n.22, ata n. 43, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

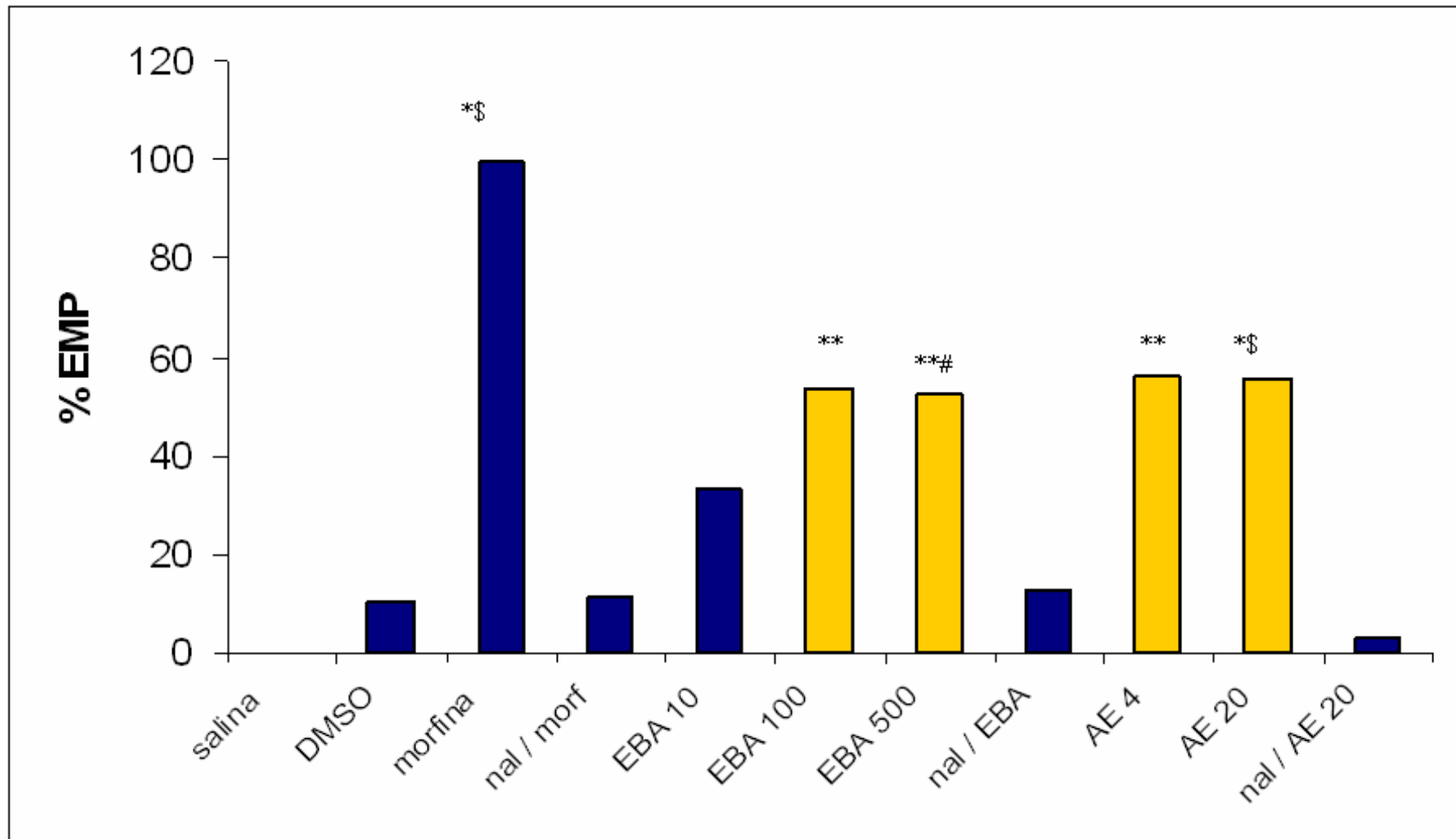
Porto Alegre, 10 de setembro de 2003.



Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/UFRGS

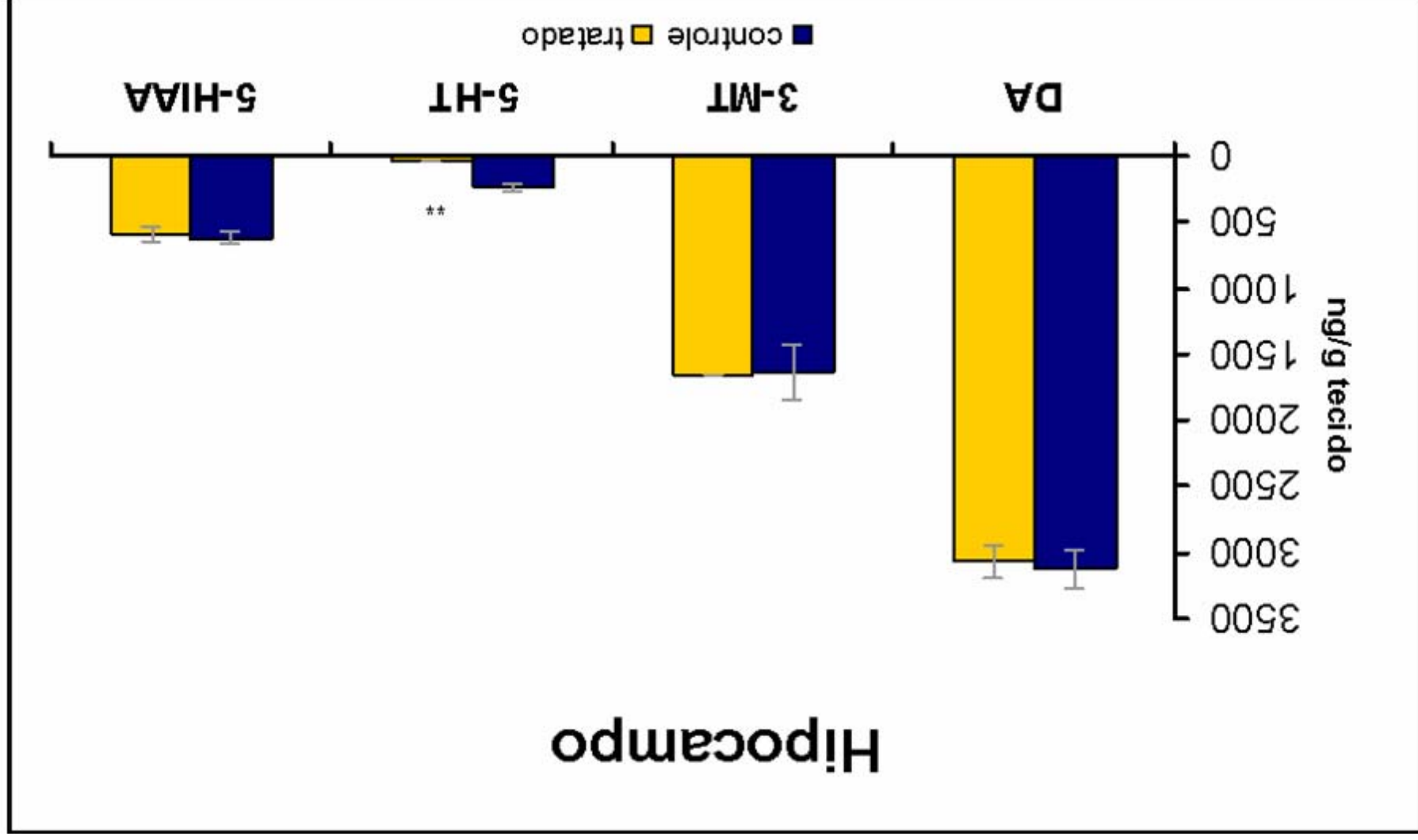
Efeito de EBA no teste da dor induzida por capsicina. * = $p < 0,01$ em relação ao veículo (morfina 6 mg/kg, MK-801).
Dados expressos em % de inibição de *licking* \pm E.P.M.





Efeito de EBA e ácido estrictosidínico no teste *tail flick*. Dados expressos em % de efeito máximo possível. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ em relação ao veículo; # = $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo pré-tratado com naloxona; \$= $p < 0,01$ em relação ao mesmo grupo pré-tratado com naloxona. Kruskal-Wallis/Mann-tney

Gráfico comparativo entre hipocampus tratados com injeção intra-hipocampal de ácido estrictosídico 20 µg/µL e hipocampus controle.



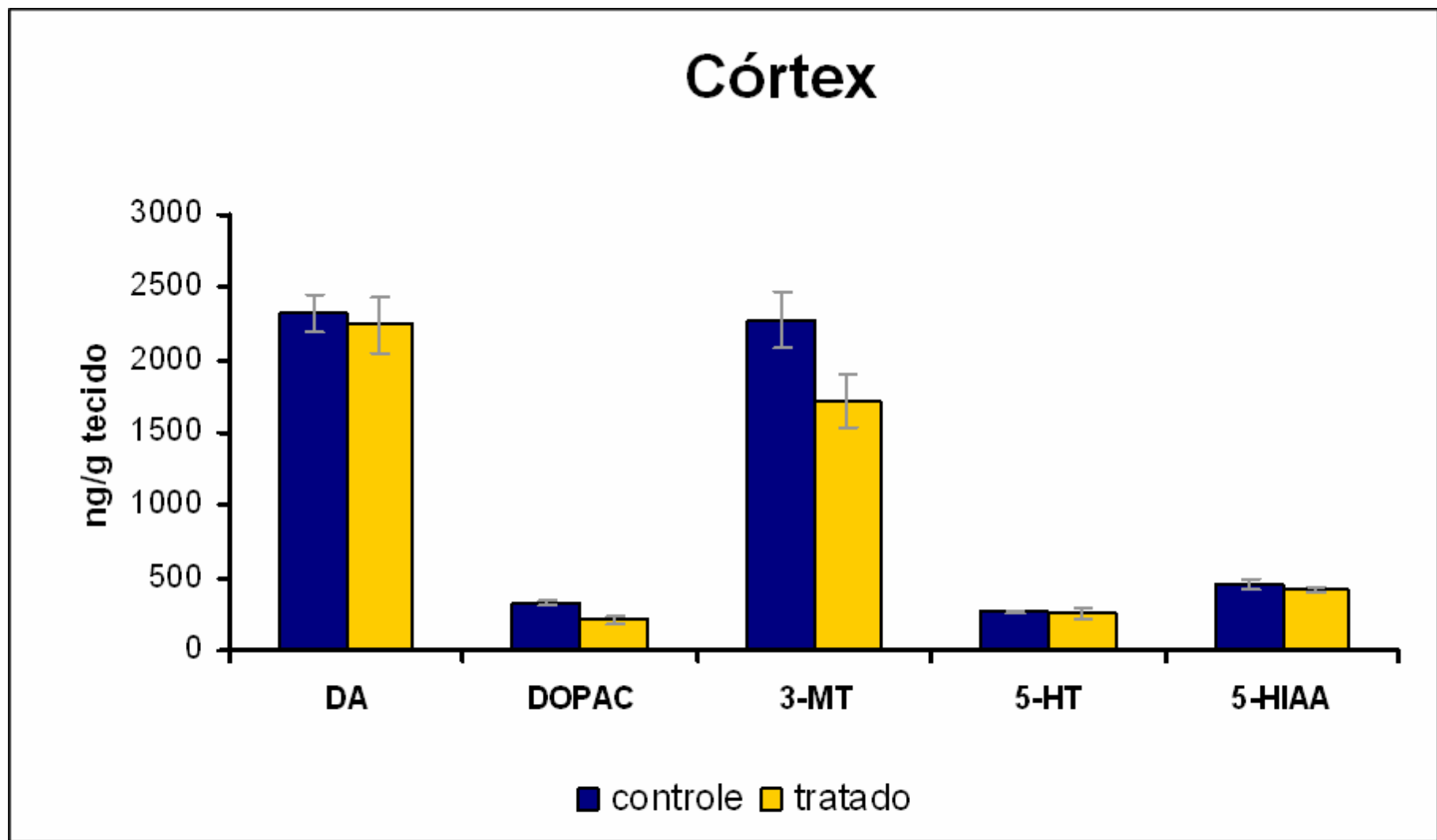
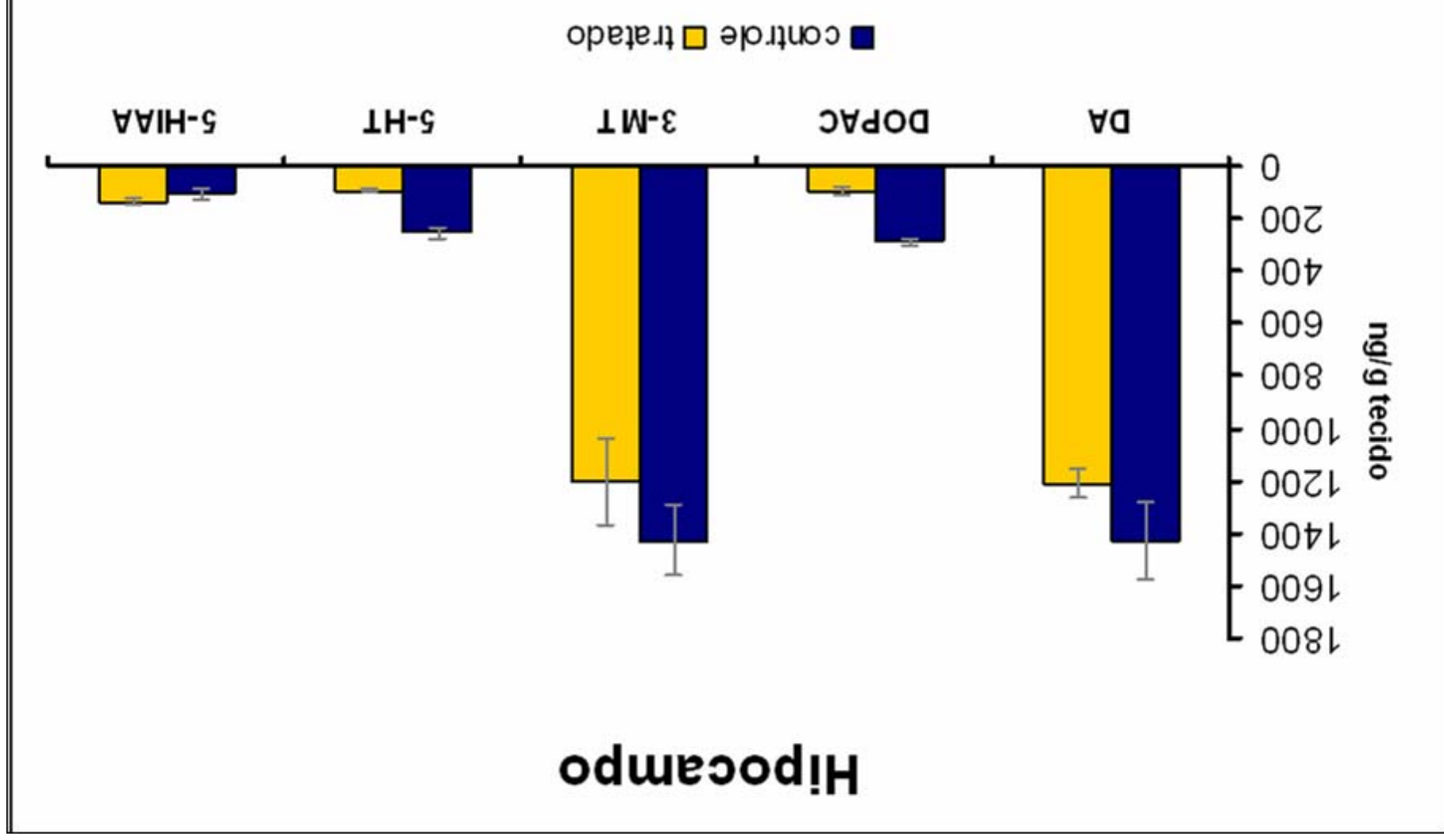


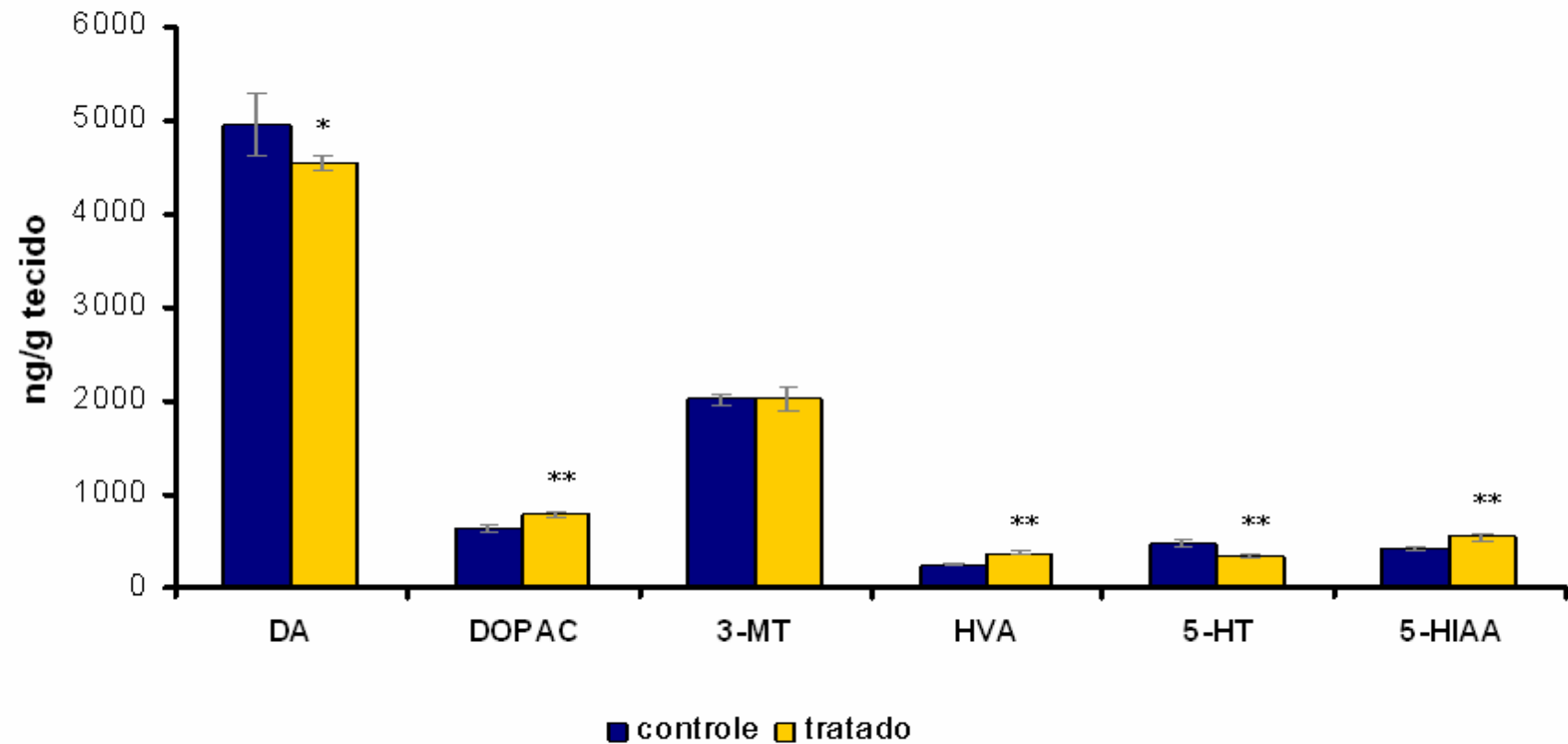
Gráfico comparativo entre hipocampus tratados com injeção intra-hipocampal de ácido estrictosidínico 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e hipocampus controle.

mg/kg.

Resultados do tratamento intraperitoneal com ácido estrictosídrico em hipocampus de ratos tratados com dose de 10



Estriado



Resultados do tratamento intraperitoneal com ácido estrictosidínico em estriados de ratos tratados com dose de 10 mg/Kg.