

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -  
BIOQUÍMICA

DETECÇÃO DOS EFEITOS DOS ALCALÓIDES DE *Psychotria  
colorata* (W. ex R. & S.) Muel. Arg. EM SISTEMA OPIÓIDE DE  
ROEDORES, ATRAVÉS DE PARÂMETROS  
FARMACOLÓGICOS E NEUROQUÍMICOS

Dissertação apresentada por **Tânia Alves Amador** ao Curso de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, para  
obtenção do Título de Mestre.

ORIENTADORA: Dra. Elaine Elisabetsky

Porto Alegre

1995

## AGRADECIMENTOS

- À Zilna, Temis, Tamilton, Eli, Diego e Paulo (minha família), meu amor e carinho imenso sempre, por terem me aquecido com seu carinho no Rio Grande do Sul, apesar da distância.

- Ao meu pai Francisco Amador, pelo incentivo e carinho.

- À Elaine Elisabebtsky, por proporcionar a oportunidade de trabalhar com ciência, pela acolhida em Porto Alegre, pelo carinho nas horas difíceis e orientação neste trabalho.

- Ao Diogo Onofre, pela orientação nos primeiros passos da neuroquímica, pelo bom humor contagiante e pela paciência.

- Ao Prof. Sávio, pelo incentivo, orientação química e amizade; por ser um dos responsáveis por este trabalho existir.

- À Ana do Carmo, pela realização do trabalho fitoquímico, sem o qual não existiria esta dissertação.

- À Mirna, Cida, Ionara e Jeanine, primeiras amigas, meu carinho por estarem presentes em todos os momentos.

- Aos amigos de Belém que me incentivaram, pelo carinho, principalmente a Rosa, Dirceu, Sueli e Renata.

- À todos os bolsistas do Laboratório de Etnofarmacologia, pela amizade, apoio, carinho, sugestões, especialmente para Jô Anna, Luciane, Dioguinho, Fernanda, Lucimar, Gabriela.

- Aos colegas do grupo do Diogo, pelo auxílio, apoio, carinho, especial para a Tatiana Galletto pelo auxílio nos experimentos iniciais e amizade.

- Aos professores de Departamento de Farmacologia que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse realizar este trabalho.

- Às funcionárias do Dept. de Farmacologia, pelo auxílio quando solicitado, em especial a Rita, D. Joraci e D. Iolanda, pelo carinho e amizade.

- Aos funcionários do Dept. de Bioquímica, cujo trabalho auxilia na nossa pesquisa.

- À Cléia, secretária do Pós-graduação e à Sandra, pela paciência e auxílio.

- À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

- À CAPES e ao CNPq.

## SUMÁRIO

|  | página |
|--|--------|
| LISTA DE TABELAS.....  | I      |
| LISTA DE FIGURAS.....  | II     |
| ABREVIATURAS.....  | IV     |
| RESUMO.....  | VI     |
| ABSTRACT.....  | VIII   |
| I. INTRODUÇÃO.....   | 01     |
| I.1. ANALGÉSICOS.....  | 02     |
| I.1.1 Componentes da dor e abordagem terapêutica.....                        | 02     |
| I.1.2. Estereoespecificidade da ação opióide.....                            | 05     |
| I.1.3. Receptores opióides.....  | 06     |
| I.1.4. Relação entre as proteínas-G e os sítios de ligação opióide.....      | 10     |
| I.1.5. Mecanismos e sítios relevantes para indução de analgesia opióide..... | 11     |
| I.2. A ABORDAGEM ETNOFARMACOLÓGICA NA PROCURA DE<br>NOVAS DROGAS.....        | 12     |
| I.2.1 A metodologia da pesquisa etnofarmacológica.....                       | 15     |
| I.2.2. Etnofarmacologia para identificação de novos analgésicos.....         | 21     |
| I.2.3. Seleção de <i>Psychotria colorata</i> como fonte de analgésicos.....  | 22     |
| I.3. OBJETIVOS.....  | 26     |

|   |      |
|---|------|
| III. RESULTADOS.....  | 37   |
| III.1. RESULTADOS <i>In vivo</i> .....  | 38   |
| III.1.1. Teste de Formalina.....  | 38   |
| III.1.2. Teste de Tail Flick.....   | 41   |
| III.2. RESULTADOS <i>In vitro</i> .....   | 46   |
| III.2.1. Ensaio da união específica de [ <sup>3</sup> H]Naloxona.....   | 46   |
| III.2.2. Ensaio da atividade de adenilato ciclase (AC) e Ensaio da união<br>específica de [ <sup>3</sup> H]GMP-PNP..... | 50   |
| IV. DISCUSSÃO.....  | 53   |
| V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....   | 65   |
| VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 68   |
| VI.1. Trabalhos gerados a partir desta dissertação.....   | 83   |
| APÊNDICE.....   | 84   |
| Evolução do Estudo Fitoquímico de <i>Psychotria colorata</i> .....  | 84ii |

## LISTA DE TABELAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabela I   | Localização de receptores opióides propostos como mediadores de efeitos opióides.....  | 07 |
| Tabela II  | Efeitos dos extratos aquoso e alcaloídico inicial (pH 7) de folhas de <i>Psychotria colorata</i> no teste de Formalina (fases precoce e tardia)..... | 39 |
| Tabela III | Presença de alcalóides em espécies de <i>Psychotria</i> .....  | 55 |
| Tabela A1  | Testes preliminares fitoquímicos para classes de compostos presentes nos extratos aquoso e etanólico de <i>Psychotria colorata</i> (Apêndice).....   | ii |

## LISTA DE FIGURAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 01 | Estágios da proposta etnofarmacológica.....  | 17 |
| Figura 02 | Porcentagem de usos para dor por populações caboclas para a espécie <i>Psychotria colorata</i> .....                 | 24 |
| Figura 03 | Efeitos do extrato alcaloídico de folhas alcalinizadas pH 7 de <i>Psychotria colorata</i> no teste de Formalina..... | 40 |
| Figura 4a | Efeito do extrato alcaloídico de folhas alcalinizadas pH 7 de <i>Psychotria colorata</i> no teste de Tail Flick..... | 42 |
| Figura 4b | Efeito do extrato alcaloídico inicial de flores de <i>Psychotria colorata</i> no teste de Tail Flick.....            | 43 |
| Figura 05 | Efeito da fração 20 do extrato alcaloídico de folhas de <i>Psychotria colorata</i> no teste de Tail Flick.....       | 44 |
| Figura 06 | Efeito da fração 26 do extrato alcaloídico de folhas de <i>Psychotria colorata</i> no teste de Tail Flick.....       | 45 |
| Figura 07 | Curva dose-resposta da união específica de [ <sup>3</sup> H]Naloxona.....  | 47 |
| Figura 8a | Curva de inibição da união específica de [ <sup>3</sup> H]Naloxona por morfina.....                                  | 48 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 8b  | Curva de inibição da união específica de [ <sup>3</sup> H]Naloxona pelo extrato alcaloídico inicial de flores de <i>Psychotria colorata</i> ..... | 49 |
| Figura 09  | Efeito de morfina e extrato alcaloídico inicial de flores de <i>Psychotria colorata</i> na atividade de adenilato ciclase.....                    | 51 |
| Figura 10  | Efeito do extrato alcaloídico inicial de flores de <i>Psychotria colorata</i> na união específica de [ <sup>3</sup> H]GMP-PNP.....                | 52 |
| Figura 11a | Estrutura molecular de (-) eserolina.....   | 63 |
| Figura 11b | Estrutura molecular de morfina.....   | 63 |
| Figura 11c | Estrutura molecular de meso-chimonantina.....   | 63 |
| Figura 11d | Estrutura molecular de hodkinsina.....  | 63 |
| Figura 12  | Efeito de (+)-calicantina no teste de Tail Flick...   | 64 |

## ABREVIATURAS

|           |   |
|-----------|---|
| AC        | adenilato ciclase   |
| AMPc      | 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina  |
| B         | reagente de Bouchardat  |
| C         | casca   |
| Ca        | caule   |
| (+) cal   | (+) calicantina   |
| CC        | cromatografia de coluna   |
| CCD       | cromatografia de camada delgada   |
| CCPD      | cromatografia de camada delgada preparativa                                       |
| CLAE      | cromatografia líquida de alta eficiência  |
| D         | reagente de Dragendorff   |
| $\delta$  | delta   |
| EAA-pH 7  | extrato alcaloídico de folhas alcalinizadas de <i>Psychotria colorata</i>         |
| Eaq       | extrato aquoso de folhas de <i>Psychotria colorata</i>                            |
| EAFh-pH 7 | extrato alcaloídico inicial de folhas de <i>Psychotria colorata</i> obtido a pH 7 |
| EAFr-pH 7 | extrato alcaloídico inicial de folhas de <i>Psychotria colorata</i> obtido a pH 7 |
| F         | folhas  |
| Fig.      | figura  |
| Fl        | flores  |
| Fr        | frutos  |

|         |   |
|---------|---|
| Fr. 20  | fração 20-24 obtida do extrato EAa-pH 7 de <i>Psychotria colorata</i> |
| Fr.26   | fração 26-32 obtida do extrato EAa-pH 7 de <i>Pchotria colorata</i>   |
| Gi      | proteína G inibitória   |
| GMP-PNP | guanosina-5'(imido)trifosfato   |
| Gs      | proteína G estimulatória  |
| GTP     | guanosina-5'-trifosfato   |
| i.p.    | intaperitonal   |
| κ       | kapa  |
| M       | morfina   |
| M       | reativo de Mayer  |
| μ       | mi  |
| μg      | micrograma  |
| μl      | microlitro  |
| ml      | mililitro   |
| PA      | parte aérea   |
| PI      | planta inteira  |
| σ       | sigma   |
| SNC     | sistema nervoso central   |
| Tw      | polisorbato 80 purificado (tween)                                     |
| +       | presença  |
| -       | ausência  |

## RESUMO

O crescente reconhecimento da vasta diversidade química das florestas tropicais, associado com o desenvolvimento de novas técnicas para isolamento e elucidação de compostos químicos e suas propriedades farmacológicas, têm reacendido o interesse por produtos naturais pelas indústrias farmacêuticas. Entre as estratégias usadas para indentificação de espécies vegetais de interesse terapêutico, aparece a pesquisa do uso tradicional de plantas em medicina caseira, sendo a Amazônia e suas comunidades caboclas um cenário privilegiado deste conhecimento.

Uma pesquisa etnofarmacológica sobre o uso de plantas no manejo da dor caboclos do Estado do Pará apontou a espécie *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. como sendo tradicionalmente usada para o tratamento de "dor de ouvido" e como "calmante de dor abdominal". Experimentos farmacológicos preliminares com extrato aquoso de folhas e flores, demonstraram que os alcalóides presentes nas folhas desta espécie são dotados de atividade analgésica, avaliada através dos testes de contorções abdominais induzida por ácido acético e formalina (fases precoce e tardia).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade analgésica dos alcalóides presentes nos extratos alcaloídico de folhas e flores, monitorar farmacologicamente o fracionamento de extrato alcaloídico de folhas com o

propósito de identificar os alcalóides ativos e analisar o efeito dos alcalóides do extrato de flores em ensaios correlatos neuroquímicos (*in vitro*) preliminares.

Os resultados farmacológicos nos testes de Formalina e Tail Flick, indicaram que os alcalóides são os desencadeadores de resposta analgésica da planta. Em ambos os testes foi detectada um efeito analgésico, sendo que no teste de Tail Flick esse efeito foi reversível pela administração prévia de naloxona. Esses compostos também inibem a união específica de [ $^3$ H]naloxona em membranas de estriado de ratos, inibe a atividade basal da enzima adenilato ciclase na produção de AMPc, sem no entanto afetar a união específica de [ $^3$ H]GMP-PNP.

Estes resultados indicam que a atividade antinociceptiva dos alcalóides presentes nos extratos de folhas e flores de *Psychotria colorata*, é mediada via ativação de receptores opióides; reafirma o "status" da metodologia etnofarmacológica como ferramenta para a descoberta em plantas de novos compostos terapeuticamente úteis, e justificam estudos mais aprofundados através do isolamento dos alcalóides.

## ABSTRACT

The increasing recognition of the vast chemical diversity in tropical forests, associated with the development of revolutionary techniques for isolation and elucidation of chemical compounds and its pharmacological industries. The traditional use of plants as homemade medicines is among the strategies used to identify botanical species of therapeutic interest. The Amazonian "caboclos" communities are a privileged scenario of this knowledge.

Survey of medicine plants used among Amazonian "caboclos" (State of Pará) pointed *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg., traditionally used for "treatment of earache" and "calming abdominal pain". Previous pharmacological experiments with aqueous extract of leaf and flower, demonstrated that *Psychotria colorata* has marked analgesic activity, as evaluated through the acetic acid-induced writhing and formalin test.

This work intends to evaluate the analgesic activity of the alkaloids present in the alkaloids extracts of leaf and flower, to test pharmacologically the fractionating of the alkaloid extracts of the leaf, in order to identify the active alkaloids and to analyze the effects of the alkaloid extract of flower in preliminary neurochemical (*in vitro*) essays.

The pharmacological results in formalin and tail flick tests indicated that the alkaloids are responsible for the analgesics effects of the plant. Analgesia was detected in both tests and this effect in tail flick tests was reversed by previous administration of naloxone. These compounds also inhibited the binding of [<sup>3</sup>H] Naloxone in membranes of rat striata as well as a decreased adenylate cyclase basal activity, without having effects on binding of [<sup>3</sup>H]GMP-PNP.

This work indicates that the antinociceptive activity of the alkaloids present in the aqueous and alkaloid extracts of the leaf and flower de *Psychotria colorata* is mediated by activation of opioid receptors. Moreover, it confirms the status of the ethnopharmacological strategy, as a tool for the discovery of new therapeutically useful compounds, and supports further investigations through the isolation of the alkaloids of *Psychotria colorata*.

## I. INTRODUÇÃO

## **I.1. Analgésicos**

### **I.1.1. Componentes da dor e abordagem terapêutica**

O fato de a dor ser um fenômeno subjetivo, individualizado, apresenta dificuldades para que seja mensurada. A dor é um sintoma associado a diversos quadros patológicos e com frequência requer procura de auxílio médico. Estatísticas americanas, apontam que um terço da população experimenta dor que exige atenção médica e, em quase 50 milhões de pessoas, determina incapacitação total ou parcial (Wannmacher e Ferreira, 1992).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor, propõe a conceituação de dor "como uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada com lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos deste tipo de dano". Partindo deste conceito, pressupõe-se a existência de dois componentes: a sensação propriamente dita ou nocicepção e a reatividade emocional à dor (Lasagna, 1986a; Wannmacher e Ferreira, 1992).

A nocicepção se refere à atividade do sistema nervoso aferente induzida por estímulos exógenos (mecânicos, químicos, físicos e biológicos) e endógenos (inflamação, aumento de peristaltismo, isquemia tecidual). Sua recepção a nível periférico se dá em estruturas específicas, situadas em terminais nervosos livres e denominadas nociceptores. Em tecidos normais, estes não respondem a estímulos leves. Porém, na presença de inflamação, podem ser sensibilizados (hiperalgesia) por prostaglandinas e dopamina, tendo como mediadores AMPcíclico e cálcio, cuja concentração aumenta nos terminais nervosos. Os nociceptores então, tornam-se mais sensíveis à ativação por bradicinina e histamina, substâncias endógenas indutoras da dor. Em sequência, os estímulos são conduzidos através de vias periféricas sensitivas até o Sistema Nervoso

Central (SNC), onde, a nível hipotalâmico e cortical, se faz a integração da sensação dolorosa. O cérebro modula a dor, mediante vias eferentes inibitórias, de forma que a sensação dolorosa é resultado destes dois processos antagônicos. A atividade nervosa está vinculada à presença de neurotransmissores e neuromoduladores, tanto nas vias aferentes (substância P, GABA, colecistonina, somatostatina, encefalinas) quanto nas eferentes (acetilcolina, dopamina, noradrenalina, serotonina e encefalinas) (Jaffe e Martin, 1990; Wannmacher e Ferreira, 1992; Simon e Hiller, 1994).

A reação emocional à dor corresponde a interpretação afetiva dessa sensação, de caráter individual e influenciada por estados ou traços psicológicos, experiências prévias e fatores culturais, sociais e ambientais. O reconhecimento destes fatores é capaz de filtrar, modular ou distorcer a sensação dolorosa; esta sensação é aproximadamente normal em indivíduos que têm as vias nervosas íntegras (Graeff, 1989).

As abordagens terapêuticas da dor levam em conta os componentes discutidos acima. O objetivo da terapêutica não se restringe apenas eliminar a sensação dolorosa, mas sim em aliviar a dor. Nesse contexto, as drogas usadas para o tratamento da dor se dividem em não-opioides e opioides (Wannmacher e Ferreira, 1992).

Os analgésicos não-opioides são indicados para as dores de intensidade leve a moderada, de natureza tegumentar e localização diversificada (cefaléia, dismenorréia, dores músculo-esqueléticas), associadas ou não a processo inflamatório periférico. Em virtude do alívio produzido, esta classe de drogas tem consumo amplo, atingindo a cifra de 100 mil toneladas/ano (Ferreira, 1985). No Brasil, o uso de medicamentos do tipo aspirina é amplo, e associado a automedicação. Os tipos de dores citadas respondem a esses agentes que, se comparados aos opioides, apresentam a vantagem de não induzir efeitos

adversos, como tolerância e dependência física. Entretanto, a incidência de reações tóxicas por salicilato é alta, ocorrendo anualmente mais de 10.000 casos de intoxicação graves registradas nos Estados Unidos (Wannmacher e Ferreira, 1992; Flower et al, 1987).

Os analgésicos não-opioides têm propriedades analgésica, antitérmica e antiinflamatória, relacionadas à inibição irreversível da enzima cicloxigenase, que converte ácido araquidônico em prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina. As prostaglandinas, especialmente PGE2, sensibilizam o nociceptor periférico às ações de histamina (promove a reação inflamatória) e bradicinina (estimula terminações nervosas levando à nocicepção) (Flower e Moncada, 1987).

Os analgésicos opioides são indicados no tratamento de dores agudas, de moderada a intensa, que não respondem a analgésicos menos potentes ou que, por sua natureza, não são a eles suscetíveis. Também são eficazes no controle da dor crônica, sendo a tolerância e a dependência física fatores limitantes do uso prolongado. Cabe notar que em pacientes terminais com dor, o potencial de abuso passa a ter importância secundária. E em situações de dor severa (pós-operatória, de infarto do miocárdio, etc.) a preocupação primordial também é aliviar imediatamente a dor (Wannmacher e Ferreira, 1992).

O ópio é um dos medicamentos mais antigos usado pelo homem. Sua eficácia no alívio da dor e diarreia é conhecida há centenas de anos. A partir do século dezenove, a morfina é reconhecida como sendo o principal alcalóide responsável pela maioria dos efeitos benéficos do ópio. Entretanto, também é responsável pelos seus efeitos indesejáveis, dos quais o mais importante é o desenvolvimento de adição (vício) após o uso crônico (Jaffe e Martin, 1990; Simon e Hiller, 1994).

Nas últimas duas décadas tem havido um desenvolvimento importante na elucidação dos aspectos neuroquímicos e neurofarmacológicos dos efeitos dos

opióides, sendo este um campo de pesquisa muito ativo. Laboratórios governamentais, industriais e de universidades têm-se esforçado na tentativa de encontrar um analgésico que mantenha as vantagens da morfina e seja destituído dos seus efeitos euforizantes e do potencial de adição (Simon e Hiller, 1994).

### I.1.2. Estereoespecificidade da ação opióide

O objetivo de se conseguir um analgésico livre dos efeitos indesejáveis da morfina, associado a hipótese de que seus diversos efeitos sejam mediados por receptores específicos, gerou um grande número de trabalhos sobre os requisitos estruturais necessários para as atividades farmacológicas. Foi reconhecido que muitas das ações dos opióides, tais como analgesia e adição, são estereoespecíficas, isto é, estas atividades residem em somente um dos enantiômeros de uma mistura racêmica. Também foi demonstrado que alterações relativamente pequenas em partes da molécula de morfina, resultam em mudanças drásticas na sua farmacologia. A mudança mais importante e interessante é a substituição da metila no grupo amino terciário por um grupo alil ou ciclopropilmetila, que dota de atividade antagonista específica e potente a molécula resultante, em oposição a muitas das ações farmacológicas da morfina e outros agonistas. Alguns antagonistas (nalorfina, ciclazocina) mantêm parte de seu efeito analgésico ou potência agonista (agonista-antagonista), enquanto outros, como por exemplo naloxona e naltrexona, tornam-se antagonistas puros, destituídos de propriedades agonistas (Simon e Hiller, 1994).

A extraordinária estereoespecificidade destas drogas pode ser facilmente explicada pela existência de sítios de ligação, nos quais as drogas se fixam para exercer seus efeitos. A ligação nestes sítios ou "receptores" é o desencadeador

de uma série de reações, cujo somatório resulta nas respostas observadas. Apesar de os antagonistas possuírem alta afinidade para ligação a estes receptores, eles não são capazes de desencadear os eventos subsequentes. Em 1973 três laboratórios simultânea e independentemente, apresentaram evidências bioquímicas da ligação opióide esteroespecífica (Pert e Snyder, 1973; Simon et al, 1973; Terenius, 1973) em membranas cerebrais.

### 1.1.3. Receptores opióides

Os sítios de ligação opióide estão presentes no sistema nervoso central e em alguns tecidos periféricos (Stein, 1993; Simon e Hiller, 1994). Estudos detalhados da distribuição dos sítios de ligação de opióides têm sido realizados em diversas espécies, incluindo humanos, macacos, vacas, cobaias e ratos. Várias técnicas vêm sendo utilizadas para determinar esta distribuição, como a ligação específica com ligantes marcados e determinados através da técnica de "slice". Outra técnica usada no mapeamento dos receptores opióides é a autoradiografia (Leslie, 1987).

Foram observados muitos resultados contraditórios entre os laboratórios que trabalham com mapeamento; entretanto isso pode ser justificado pela grande diferença nos níveis de receptores opióides na várias regiões do SNC. Apesar disso, as áreas ricas em receptores opióides tendem a estar relacionadas com o sistema límbico ou áreas que estejam envolvidas na percepção e modulação da dor. Existem evidências de que estes receptores podem ser tanto pré-sinápticos como pós-sinápticos (Simonds, 1988; Jaffe e Martin, 1990). Na Tabela I estão resumidas as regiões com maior densidade de receptores e as respostas mediadas por estas regiões.

Tabela I: Localização de receptores opióides propostos como mediadores de efeitos opióides específicos

| Efeito Opióide  | Localização dos receptores opióides   |
|---|---|
| <b>ANALGESIA</b>  |   |
| espinha   | lâmina I e II do corno dorsal   |
| trigeminal  | substância gelatinosa do nervo trigeminal   |
| supraespinhal   | substância cinzenta periaquedutal, núcleo talâmico medial, núcleo talâmico intralaminar, ?estriado          |
| <b>REFLEXOS AUTONOMOS</b>   |   |
| supressão da tosse, hipotensão ortostática, inibição da secreção gástrica | núcleo do trato solitário, comissuras, locus ceruleos e ambíguos  |
| depressão respiratória  | núcleo do trato solitário, núcleo parabraquial  |
| náusea e vômito   | área postrema   |
| miose   | colículo superior, núcleo prétectal   |
| <b>EFEITOS ENDOCRINOS</b>   |   |
| inibição da secreção de vasopressina                                      | pituitária posterior<br>infundíbulo hipotalâmico, núcleo hipotalâmico,                                      |
| efeitos hormonais   | sistema óptico acessório, ?amígdala   |
| <b>EFEITOS NO COMPORTAMENTO E NO HUMOR</b>                                | amígdala, núcleo estrial terminal, hipocampo, córtex, núcleo talâmico médio, núcleo acumbeo, ?gânglio basal |
| <b>RIGIDEZ MOTORA</b>   | estriado  |

Fonte: Simon and Hiller, *Basic Neurochemistry*, 321-339, 1994.

As evidências para a existência de múltiplos receptores opióides existe há diversas décadas, tendo sido realizados experimentos farmacológicos utilizando uma série de agonistas e antagonistas para fundamentar esta hipótese (Martin, 1976). Como resultado destas análises postulou-se a existência de três tipos diferentes de receptores, os quais foram denominados de  $\mu$  (por ligar morfina),  $\kappa$  (ligando cetociclazocina) e  $\sigma$  (ligando N-alilnormetazocina ou SK 10047). Após a descoberta das encefalinas, foi descoberto um novo tipo de receptor, nomeado de  $\delta$  (Lord et al, 1977).

Atualmente são aceitos os receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ . O fato de os efeitos de  $\sigma$  não serem revertidos por naloxona, resultou na retirada deste receptor da classificação de receptores opióides. Por outro lado, surgem evidências da existência de subtipos de receptores ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ,  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$ ,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ ) (Wagner e Chavkin, 1995).

A descoberta das três famílias de peptídios endógenos (encefalinas, endorfinas e dinorfinas), propiciou o avanço nos estudos da farmacologia, fisiologia e bioquímica dos opióides. O estudo dos opióides endógenos têm movimentado muitos esforços para que se esclareçam aspectos anatômicos, fisiológicos e moleculares dos receptores que ligam estes peptídeos. A compreensão corrente sobre estes aspectos pode ser resumida como segue: (a) Os peptídeos opióides estão estocados em vesículas de neurônios específicos, que contêm transmissores de ação rápida, como glutamato; os opióides agem como co-transmissores e servem para modular as ações de transmissores primários. (b) Os opióides são liberados nos espaços extracelulares após prolongada despolarização da membrana neuronal; desta forma, opióides modulam a transmissão sináptica somente sob condições de intenso "input" aferente. (c) A estrutura da sinapse de peptídeos opióides pode ser maior que a de aminotransmissores de ação rápida, porque os peptídeos têm

que se difundir do seu sítio de liberação para o sítio de ação; isto é evidenciado pela cinética lenta dos peptídeos opióides (segundos até iniciar o efeito, minutos até cessar o efeito). Os opióides apresentam um grande raio de ação do sítio de liberação e maior afinidade pelos seus receptores quando comparada à afinidade dos aminotransmissores pelos seus receptores. (d) Opióides ativam uma variedade de processos de sinais de transmissão; diferentes mecanismos são evidentes em diferentes tipos células (Wagner e Chavkin, 1995).

As propriedades farmacológicas dos peptídeos opióides podem ser resumidas partindo-se do pressuposto de que seus efeitos farmacológicos são similares aos dos alcalóides opiáceos sintéticos e derivados de plantas. Os papéis fisiológicos do sistema opióide parecem abranger áreas diversas que incluem a percepção de dor, mecanismo de estresse, regulação respiratória, controle da temperatura, desenvolvimento de tolerância e dependência física, bem como a modulação de funções diurética e cardiovascular. Os padrões de comportamento que parecem ser influenciados pelos peptídeos opióides incluem comportamento sexual, locomotor, ingestão líquida e sólida e "grooming" (Olson, 1993). Os opióides também estão envolvidos com modulação de memória (Izquierdo e Netto, 1985). Tal como os seus correlatos exógenos interagem com o sistema endócrino, produzindo aumento na liberação do hormônio do crescimento, ACTH, prolactina, e hormônio diurético; diminuem na circulação os níveis de tiotropina, hormônio luteinizante e hormônio folículo estimulante (Brownstein, 1994; McEwen, 1994).

A participação dos peptídeos opióides e seus receptores em um número de condições patológicas vem sendo investigado. Como exemplo pode-se citar a investigação nos estados de depressão e esquizofrenia. Duas hipóteses foram desenvolvidas para o papel dos peptídeos endógenos na esquizofrenia. Uma aponta os sintomas de catatonia como sendo resultado do excesso de peptídeos

opióides; outra hipótese argumenta que a deficiência destes pode ter importância na esquizofrenia (Simon e Hiller, 1994). Estes dados são importantes por indicarem o quanto o sistema opióide tem imbricações com outros sistemas do SNC, o que vem gerando um grande número de trabalhos relevantes para a compreensão deste sistema, que apesar de bastante estudado ainda mantém desconhecidas informações fundamentais da sua fisiologia e farmacologia.

#### I.1.4. Relação entre as Proteínas-G e os sítios de ligação opióide

A modulação da ligação a receptores opióides por sais fisiológicos, guanosina fosfatos, e a regulação das atividades de GTPase e adenilato ciclase têm sido extensivamente estudadas. Os resultados derivados de ensaios *in vitro* sugerem que estes receptores são provavelmente membros da super-família de receptores acoplados às proteínas-G. A união dos ligantes de todos os tipos de receptores opióides bem aceitos ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ) pode ser modificada pela adição de GTP aos ensaios de união com radioligantes. GTP diminui significativamente a afinidade dos sítios de ligação para agonistas opióides e afeta grandemente a ligação dos antagonistas. O íon sódio também diminui a união de agonistas, efeito este que é aditivo ao do GTP. Agonistas  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  têm sido relatados como estimuladores da atividade de GTPase de maneira naloxona-sensível. Em relação à atividade de adenilato ciclase, a grande maioria dos trabalhos demonstra uma inibição desta atividade, sendo que este efeito seria dependente de GTP. Os resultados apresentados sustentam a hipótese de que os receptores opióides estejam acoplados às proteínas-G (Childers, 1991).

A questão sobre quais proteínas-G são ativadas ainda é bastante debatida. Têm sido demonstrado que efeitos do receptor opióide podem ser sensíveis à

toxina pertussis, o que indicaria evidências do envolvimento de  $G_i$  e  $G_o$ . Estudos com linhagens de células de neuroblastomas, também sugerem o envolvimento de  $G_s$  mediando os efeitos de receptores  $\mu$  e  $\delta$  (Cruciani et al, 1993).

Os trabalhos de purificação e clonagem de receptor opióide, vêm trazendo mais indícios da participação destes receptores na super-família das proteínas-G (Kieffer et al, 1992; Yasuda et al, 1993).

#### 1.1.5. Mecanismos e sítios relevantes para indução de analgesia opióide

O grupo dos analgésicos opióides abrange agonistas puros, agonistas parciais (agonistas/antagonistas mistos) e antagonistas, bem como os peptídeos endógenos com atividade opióide, embora estes últimos ainda não tenham sido explorados como agentes terapêuticos. Os fármacos desta classe, ligam-se aos receptores opióides localizados no SNC e em órgãos periféricos (Jaffe e Martin, 1990; Wannmacher e Ferreira, 1992).

Como mencionado anteriormente, aceita-se que a indução de analgesia por opióides deve-se a ações em diversos sítios no SNC. O sistema límbico possui alta concentração de receptores opióides e parece mediar a resposta afetiva aos agonistas opióides e a euforia, sensação irreal de bem estar, responsável em grande parte pelo potencial de abuso (Wannmacher e Ferreira, 1992).

Pelo menos três mecanismos parecem estar envolvidos:

(1) receptores opióides nos terminais de nervos aferentes mediam a inibição de neurotransmissores, entre eles a substância P;

(2) morfina antagoniza os efeitos da administração de substância P exógena, exercendo ações inibitórias pós-sinápticas nos neurônios e interneurônios que carregam a informação nociceptiva para os grandes centros do cérebro;

(3) tanto  $\kappa$  quanto  $\delta$  parecem agir de forma similar; entretanto, a supressão de estímulos térmicos pelo receptor  $\kappa$  é fraca, sendo sua maior atividade relacionada com a redução de estímulos químicos e viscerais (especialmente importante em analgesia modulada por receptores medulares) (Jaffe e Martin, 1990; Wollemann et al, 1993; Menendez et al, 1993).

A morfina e os derivados opióides continuam sendo as substâncias mais eficazes que a terapêutica moderna dispõe para o alívio da dor. Embora os opióides sejam altamente efetivos para o manejo da dor crônica, sua aplicabilidade é limitada pelos graves efeitos colaterais, tais como tolerância, náusea, vômito, constipação, depressão respiratória abuso e dependência (Graeff, 1989; Jaffe e Martin, 1990). Estes fatores, entre outros, os impulsionaram nas últimas décadas os estudos para a compreensão do sistema opióide e a pesquisa de novas drogas analgésicas que viessem acrescentar alternativas ao arsenal terapêutico usado no manejo da dor.

## **I.2. A abordagem etnofarmacológica na procura de novas drogas**

Entre as várias definições de etnofarmacologia, talvez a mais ampla seja: "Etnofarmacologia é a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem" (Holmstedt e Bruhn, 1983). Diversos pesquisadores, na discussão da importância histórica e do potencial contemporâneo da pesquisa etnofarmacológica têm enfatizado que tais estudos podem levar a descoberta de novas drogas protótipo

(Elisabetsky e Shanley, 1994). O estudo de drogas de origem vegetal não sugere uma defesa ao retorno do uso destes remédios em sua forma original (Holmstedt, 1991). Os objetivos da etnofarmacologia são o resgate e documentação de uma importante herança cultural em acelerado processo de deturpação e perda, e a investigação e avaliação científica dos agentes empregados (Holmstedt e Bruhn, 1983; De Smet e River, 1989; Philipson e Anderson, 1989).

O significado econômico dos produtos naturais pode ser observado através dos dados de Principe (1989), que estima que a porção derivada de plantas dentro do mercado de drogas alopáticas tenha sido de U\$ 11 bilhões nos Estados Unidos em 1985, e de cerca de U\$ 45 bilhões no conjunto de outros países desenvolvidos do mundo ocidental. Numa outra perspectiva, a China mantém 400.000 hectares para o plantio de plantas medicinais, permitindo a existência de 800 indústrias farmacêuticas. Bruhn (1989) relata que 51% de todas as drogas registradas na Suécia contém produtos naturais e ele estima que 50% de todas as drogas de países industrializados são produtos naturais. Em países como os Estados Unidos, 45% dos produtos farmacêuticos comercializados provém ou contém produtos naturais (Jaroszewski, 1984).

Países subdesenvolvidos dependem excessivamente da importação de drogas (Geretti, 1983). No Brasil 84% de todas as drogas consumidas, são importadas (de Mello, 1987). Além disso, 60% de todas as drogas processadas são consumidas por apenas 23% da população (Gerez e Pedrosa, 1987), deixando os remédios caseiros, preparados a base de plantas, como a principal fonte de recursos terapêuticos para maioria da população brasileira. Este quadro se estende a países da Ásia, África e aos outros países da América Latina, onde por opção ou único recurso, as plantas são utilizadas com fins terapêuticos diretamente da natureza (Svendsen e Scheffer, 1982).

Os grupamentos culturais que ainda mantêm convivência direta com a natureza, observado-a mais de perto e empregando-a nas atividades do dia-a-dia, são os que ainda preservam viva essa herança cultural (Elisabetsky e Posey, 1986). A importância dos conhecimentos adquiridos por populações rurais, indígenas, caboclas e outras comunidades tradicionais em todo o mundo, pode ser avaliada através do reconhecimento dos inúmeros medicamentos usados na terapêutica moderna ou de seus precursores, que foram obtidos de fontes naturais e já usados por estas populações.

Existem na literatura e na terapêutica moderna inúmeros exemplos de medicamentos que surgiram a partir de produtos naturais. A descoberta do princípio de *Papaver somniferum*, a morfina, motivou a descoberta de outros compostos farmacologicamente ativos, como a codeína utilizada como poderoso antitussígeno. A morfina foi ainda responsável pela descoberta de hipnoanalgésicos, como a peptidina e de substâncias do grupo das butiferas, em que o haloperidol é o principal representante.

Uma série de outros compostos podem ser citados para reforçar a importância da pesquisa de produtos naturais como fonte de novos compostos terapêuticos: estricnina, quinina, ácido acetil salicílico, atropina, cocaína, reserpina e os alcalóides vimblastina e vincristina (Svendsen e Scheffer, 1982; Korolkovas e Burckhalter, 1988; Barreiro, 1990). Estas substâncias se tornaram importantes na medicina, tanto por suas moléculas servirem de modelo para síntese de outras substâncias (drogas protótipo), como por contribuírem para o maior entendimento sobre sistemas fisiológicos até então pouco conhecidos.

A Amazônia brasileira, apresenta o cenário ideal para o estudo do desenvolvimento de novos compostos com potencial terapêutico, seja por sua vasta diversidade biológica ou ainda pela presença de grupos culturais que se utilizam de sistemas de saúde baseados na utilização dos recursos naturais

(Elisabetsky e Shanley, 1994). Esta região pode ser considerada como fonte inexplorada, já que das 80.000 espécies de plantas superiores da Amazônia, menos de 2% foram testadas quanto a atividade farmacológica (Gottlieb e Kaplan, 1990; Eisner, 1992).

A etnofarmacologia traz consigo o desafio de vencer e fundir a cooperação completa de campos diversos como botânica, antropologia, química, farmacologia e bioquímica (Elisabetsky e Shanley, 1994). Proporciona no entanto uma estratégia apropriada para países detentores de alta diversidade biológica e cultural e caracterizados pela escassez de pesquisa na área do desenvolvimento de novas drogas a partir de produtos naturais.

### I.2.1. A metodologia de pesquisa etnofarmacológica

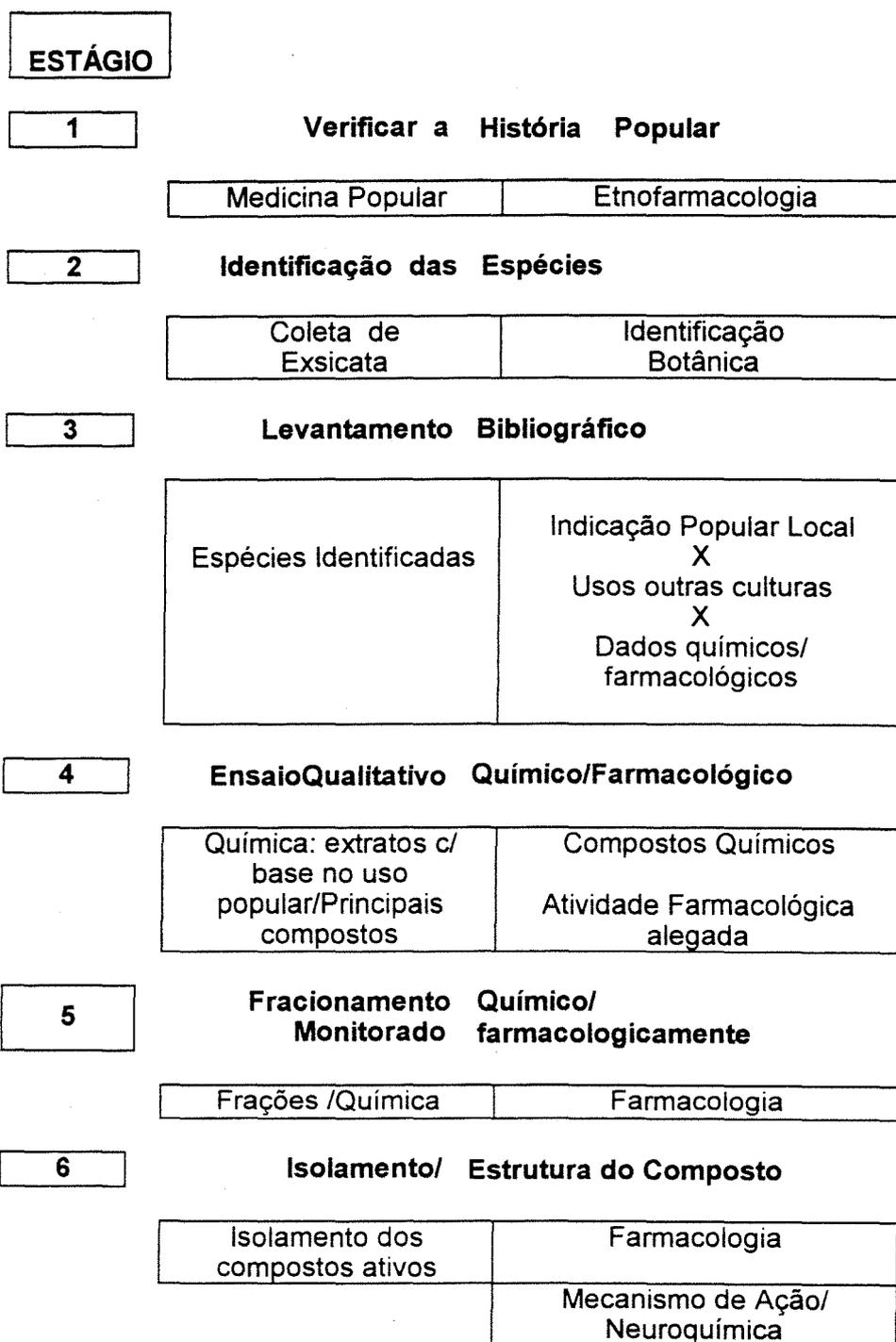
De maneira geral, o estudo de cada espécie vegetal envolve os seguintes passos:

- 1) Coleta e análise de dados etnofarmacológicos;
- 2) Determinação botânica incluindo depósito de material voucher em Herbário; pesquisa bibliográfica sobre espécie e gênero (etnomedicina, química e farmacologia).
- 3) Análise química preliminar para classes de compostos presentes na parte da planta usada medicinalmente e na própria preparação tradicional;
- 4) Estudo farmacológico de extrato(s) bruto(s) iniciais em modelos experimentais relevantes à ação farmacológica sugerida pela análise da informação popular;
- 5) Fracionamento químico (seguido de análises químicas, cromatográficas e espectroscópicas) e estudo farmacológico/toxicológico pré-clínico de frações

estandardizadas (e/ou compostos isolados), com objetivo de subsidiar os estudos clínicos;

6) Elucidação de estruturas e estudo químico de substâncias isoladas, para orientação da farmacotécnica e controle de qualidade químico/biológico das frações estandardizadas do fitoterápico, além de fundamentar futuros estudos farmacológicos com princípios ativos semi-sintéticos (Malone, 1983; Elisabetsky, 1985).

A Figura 1 esquematiza a proposta metodológica da etnofarmacologia para o desenvolvimento de novas drogas, a partir de espécies vegetais.



**Figura 1:** Esquema da proposta etnofarmacológica para o desenvolvimento de novas drogas.

que deve ser feita entre o uso popular e a classificação nosológica ocidental (Elisabetsky and Castilhos, 1990). Estudos de cunho sócio-cultural têm mostrado que os conceitos de doença são influenciados culturalmente pelas crenças. Assim a correspondência entre categorias nosológicas pode ser feita com sucesso, quando se tem um conhecimento abrangente do cenário cultural e do sistema médico em que o uso tradicional está sendo descrito.

No caso particular da procura de espécies que se apresentem como uma fonte para a obtenção de novos compostos terapêuticos que possam ser usados sem restrições culturais, ou seja, por qualquer população, a análise deve procurar plantas com usos indicativos prováveis, que sejam aproveitados independentemente da sociedade em que venha a ser aplicado. O fato de um número de culturas diferentes utilizarem a mesma espécie com a mesma finalidade ou ainda de relatos rigorosos sobre uma dada planta, pode ser um indicativo desta probabilidade (Elisabetsky e Gely, 1987).

Neste contexto, o trabalho do levantamento junto às comunidades tradicionais, deve ser complementado e subsidiado por uma pesquisa bibliográfica, que também pode ser usada para avaliar a especificidade da atividade farmacológica associada com os compostos ativos, já que se pode encontrar um padrão homogêneo de uso em várias culturas, ou que a mesma planta seja usada por diferentes culturas para propósitos totalmente diferentes.

Após o levantamento junto à comunidade, a coleta e identificação botânica das espécies indicadas e o levantamento bibliográfico, são iniciados os testes químicos para posterior análise farmacológica. Neste estágio da investigação vários aspectos químicos devem ser considerados para o estudo de drogas usadas popularmente, como parte da proposta etnofarmacológica. Cabe salientar que não se trata de elucidar o perfil químico da espécie - como em fitoquímica clássica - e sim identificar o(s) composto(s) responsáveis pela atividade

farmacológica eventualmente detectada em extratos brutos e, em última análise, responsáveis pela ação terapêutica alegada.

As plantas medicinais apresentam na sua composição uma mistura de princípios ativos principais, compostos ativos secundários e outras substâncias químicas - todos podem eventualmente alterar a atividade biológica benéfica e/ou induzir efeitos indesejáveis. O levantamento bibliográfico combinado com a informação etnofarmacológica sobre o modo de preparação do remédio tradicional pode proporcionar hipóteses sobre a composição química da formulação ou sobre a liberação e concentração dos compostos ativos, já que o modo de preparo reflete uma longa experiência do usuário. Desta forma, as "regras" da formulação popular devem ser levadas em consideração para o entendimento do significado químico.

A interpretação destas informações deve ser usada quando da preparação dos extratos fitoquímicos. Por exemplo, plantas aromáticas geralmente são adicionadas à água quente e o chá é coberto (abafado) por alguns minutos antes de ser ingerido; neste caso a presença de óleo essencial e outros compostos voláteis devem ser considerados para a obtenção da atividade desejada. Ou quando, em outro exemplo, o material vegetal é adicionado à água a temperatura ambiente ou em fervura, indica que as substâncias voláteis não são importantes. As espécies botânicas que habitualmente são preparadas como "beberagens" alcoólicas que permanecem em infusão por vários dias, sugerem que a preparação dos seus extratos preliminares seja realizada em concentrações de água:etanol (Nunes, 1995). Estes exemplos mostram a importância da preparação popular para o sucesso da investigação química dentro da proposta etnofarmacológica na busca de novas drogas.

A interação entre os laboratórios de química e farmacologia, visa o monitoramento farmacológico do fracionamento químico. Assim, o trabalho

farmacológico multiplica-se por tantas vezes quantas forem as frações produzidas pelo laboratório de química. Na fase de monitoramento, apenas um "end point" farmacológico é selecionado com o objetivo de diferenciar as frações ativas das inativas. Eventualmente, uma propriedade específica pode ser investigada para subsidiar a decisão do quanto deve ser investido na continuidade dos estudos da espécie. O estudo farmacológico completo só é realizado com a fração, composto ou preparação galênica que se pretende usar em estudos clínicos (Farnsworth e Morris, 1976).

### I.2.2. Etnofarmacologia para identificação de novos analgésicos

A aplicação da metodologia etnofarmacológica na busca de compostos analgésicos apresenta fatores complicadores específicos. Tem sido reconhecido que variáveis socioculturais e psicológicas desempenham um papel fundamental na definição, percepção e reação à dor. Segundo Lasagna (1986a, 1986b) uma mesma palavra pode ter diferentes significados, e reconhecer este fato pode ser útil para compreender porque as respostas podem variar dependendo da natureza da dor, quando se trata de caracterizar uma dose para um analgésico particular ou um placebo, apesar do uso de uma mesma palavra para descrever a intensidade da dor ou do efeito analgésico.

A dor pode ser um sintoma comum de diversas doenças. Por este motivo, o fato de um informante referir-se ao efeito mais óbvio do remédio - que seria uma diminuição, melhora ou cessação da dor - pode se tornar em fator complicante ao se interpretar a informação popular, já que o efeito medicamentoso pode na realidade representar ação direta na causa da dor e não necessariamente um efeito analgésico.

A incerteza com relação ao significado da informação original pode ser minimizada se o tipo de dor e sintomas associados, descritos pelos informantes, são cuidadosamente analisados. Uma espécie de planta descrita como sendo eficaz para um único tipo de dor, pode ser uma sugestão que o efeito deste remédio não seja de analgesia. Por outro lado, se a espécie é indicada para um grande número de dores, aumenta a probabilidade de que esta planta tenha um verdadeiro efeito analgésico ao invés de, por exemplo, uma ação antiinflamatória. Outro aspecto que deve ser considerado, é quando as dores estão relacionadas a espasmos musculares (dor abdominal, cólica menstrual, indigestão); neste caso suspeita-se de uma atividade relaxante muscular que resulta na cessação da dor (Elisabetsky e Castilhos, 1990).

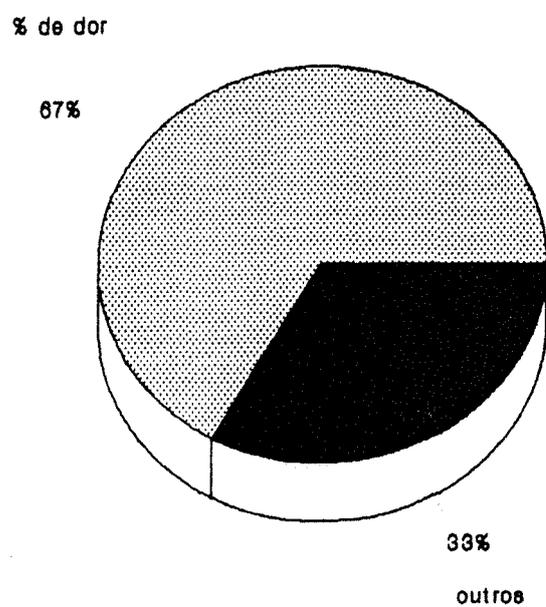
### 1.2.3. Seleção de *Psychotria colorata* como fonte de analgésicos

Com o objetivo de direcionar a seleção de espécies vegetais com potencial para o desenvolvimento de novos compostos analgésicos, foi realizado um levantamento etnofarmacológico das espécies usadas tradicionalmente no manejo da dor, por caboclos do Estado do Pará (Elisabetsky e Castilhos, 1990).

Para a coleta dos dados etnofarmacológicos foi usado um questionário direcionado para obter informações sobre o tipo de dor tratado com cada espécie e outras informações etnofarmacológicas: nome comum da planta, parte da planta usada, métodos de preparação, modo de administração, posologia, mistura com outras espécies, efeitos colaterais e/ou condições específicas em que o uso é contra-indicado, fonte do conhecimento relatado, experiência pessoal, entre outras. Este questionário foi aplicado a vendedores de plantas medicinais do "Mercado do Ver-o-peso", que é o maior mercado da cidade de Belém e possui

uma seção exclusiva para a comercialização de plantas medicinais e outros remédios caseiros. Também foram entrevistados especialistas da medicina cabocla e usuários de diversas comunidades. Entre estas comunidades estão duas vilas localizadas no município de Barcarena (Vila Nova e Itupanema), próximas a Belém. O trabalho nestas comunidades foi realizado entre os anos de 1985 e 1986, por Amorozo e Gely (1988). As pesquisas levantaram uma lista de 30 espécies, das quais 24 foram selecionadas para os estudos subsequentes (passos 2 e 3 da metodologia acima discutida). Destas, seis foram selecionadas para serem avaliadas em testes farmacológicos específicos para atividade antinociceptiva.

Uma das espécies, considerada promissora por essa análise, foi *Psychotria colorata* (Will. ex R. & S.) Muell. Arg., conhecida popularmente como "pérpetua-do-mato". Esta espécie foi indicada em 67% dos usos para o manejo da dor (Figura 2).



**Figura 2:** Porcentagem de usos para dor indicado por populações caboclas do Estado do Pará, para a espécie *Psychotria colorata*.

As flores de péripetua-do-mato são usadas pelos caboclos de Barcarena para dor de ouvido, utilizando a seguinte receita de preparo: colocar a flor debaixo do riscado (cinza do fogão), amarrada dentro de uma folha de bananeira; deixar um pouquinho para amolecer. Tirar, lavar "para esfriar", fazer uma "boneca" com um pedaço de pano e pingar no ouvido (Amorozo e Gely, 1988; Elisabetsky e Castilhos, 1990).

As raízes e frutos de *Psychotria colorata* também foram indicadas como sendo usadas para dores abdominais ou somente "dor". Neste caso, a raiz e os frutos são colocados em água e fervidos. A decocção é administrada por via oral (Corrêa, 1931; Elisabetsky et al, 1995).

Os testes químicos preliminares indicaram a presença de alcalóides como os principais compostos presentes nas folhas e flores da planta. Esta classe de compostos químicos tem importante significado na pesquisa de novos analgésicos. A avaliação farmacológica do extrato aquoso das folhas e flores de *Psychotria colorata*, em testes específicos para detecção de atividade analgésica (contrações abdominais induzidas por ácido acético, teste de formalina, e latência para retirada da cauda ao estímulo térmico - Tail Flick) evidenciou forte atividade antinociceptiva. A obtenção destes resultados determinaram a preparação de extratos alcaloídicos e sua avaliação farmacológica.

### 1.3. Objetivos

Baseado na utilização popular da espécie *Psychotria colorata* por comunidades caboclas no manejo da dor, considerando-se que os resultados químicos preliminares indicaram a presença de alcalóides, e ainda os dados farmacológicos indicativos de atividade analgésica, o desenvolvimento deste trabalho relacionou as seguintes metas:

- a) avaliar a atividade analgésica dos alcalóides presentes nos extratos alcaloídico de folhas e flores;
- b) monitorar farmacologicamente o fracionamento do extrato alcaloídico de folhas, buscando a identificação do(s) alcalóide(s) ativo(s);
- c) analisar o efeito dos alcalóides do extrato de flores em ensaios neuroquímicos (*in vitro*) preliminares, com o objetivo de fundamentar a atividade *in vivo* e dar início à elucidação do modo de ação destes alcalóides.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

## II.1. Material vegetal

O material vegetal foi coletado em diversos locais da cidade de Belém e outros municípios do Estado do Pará. Material voucher foi depositado no New York Botanical Garden (ZC 23, NYBG) e a identificação confirmada pelo Dr. Brian Boom, do New York Botanical Garden.

## II.2. Drogas e reagentes

### II.2.1. Extratos, frações e amostras de alcalóides

A pesquisa foi realizada de forma integrada entre os Laboratórios de Química de Produtos Naturais da UFPA e de Etnofarmacologia da UFRGS. A dinâmica da pesquisa integrada foi apropriada à metodologia etnofarmacológica, objetivando que os ensaios farmacológicos orientassem a investigação química, no sentido de racionalizar a busca pelos alcalóides responsáveis pelo efeito analgésico.

O estudo fitoquímico de *Psychotria colorata*, foi objeto de uma dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Pará (UFPA), por Carvalho (1993).

O presente trabalho foi desenvolvido com os extratos e frações obtidos no decorrer do estudo fitoquímico integrado a este trabalho. Para permitir a compreensão sobre a obtenção dos alcalóides investigados nesta dissertação, o resumo do trabalho químico está descrito no Apêndice desta dissertação.

Os resultados presentes neste trabalho se referem ao extrato alcaloídico inicial obtido a pH 7 de folhas (EAI<sub>Fh</sub>-pH 7) e flores (EAI<sub>Fr</sub>-pH 7); ao extrato alcaloídico obtido a partir da alcalinização das folhas pH 7 (EAA<sub>pH 7</sub>) e as frações 20-24 (Fr. 20) e 26-32 (Fr. 26) obtidas do extrato EAA<sub>pH7</sub>.

## II.2.2. Reagentes

As drogas usadas nos experimentos farmacológicos foram: Formalina (Merck); Ácido Acético (Merck); Tween - polisorbato 80 purificado (Rhodia); Sulfato de Morfina, gentilmente cedido pelo Dr. José Roberto Leite, da Escola Paulista de Medicina; Cloridrato de Naloxona (Sigma).

Nos ensaios neuroquímicos foram utilizados os seguintes reagentes: [3H]Adenosina-3',5'-monofosfato-cíclico (AMPc  $23\text{Ci}/\text{mmol}$ ), B,y-Imido[3H]guanosina 5'-trifosfato ( $19.1\text{ Ci}/\text{mmol}$ ) e [3H]naloxona ( $60\text{ Ci}/\text{mmol}$ ) adquiridos da Amersham Life Science. Guanina-imidodifosfato (GMP-PNP) e Adenosina-5'-trifosfato (ATP) obtidos da Boehringer Mannheim. Proteína quinase de coração bovino, Albumina sérica bovina, 3'-5'-Monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico) e Naloxona obtidos da Sigma Company, St. Louis, MO.

Todos os outros reagentes de grau analítico foram obtidos de fornecedores padrões.

## II.3. Animais

II.3.1. Ensaios *in vivo* - em todos os experimentos farmacológicos foram usados camundongos albinos (Swiss), machos e adultos, pesando entre 25-30g (comida e água *ad libitum*), fornecidos pelo Biotério do Instituto de Biociências da UFRGS.

II.3.2. Ensaios *in vitro* - utilizou-se ratos Wistar, albinos, machos, adultos (60-90 dias), mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com comida e água *ad libitum*, adquiridos do IB da UFRGS.

## II.4. Preparação das soluções de alcalóides

### II.4.1. *In vivo*

O extrato aquoso foi solubilizado diretamente em água destilada. O extrato alcaloídico de folhas e flores, e as frações do extrato de folhas foram solubilizadas em tween (68 µl/ml de solução).

### II.4.2. *In vitro*

Pelo fato de não termos trabalhado com uma substância isolada, com estrutura e peso molecular definidos, não foi possível realizar concentrações molares com o extrato alcaloídico de flores.

As soluções foram preparadas na concentração de 1.000 µg/ml, diluídas numa proporção de 30 µl de tween/ml de solução para os ensaios da união específica de [<sup>3</sup>H]GTP-PNP e atividade de adenilato ciclase.

Para o ensaio da união específica de [<sup>3</sup>H]Naloxona, o solvente tween mostrou-se incompatível com a preparação. Após várias experiências na tentativa de encontrar um solvente adequado, optou-se pela solubilização dos extratos em 2 µl de HCl 3 N para um volume final de 7 ml, o que mantinha o pH da preparação nas condições ideais para o estudo de receptores opióides e não precipitava o extrato.

## II.5. Ensaio *in vivo*

Em todos os experimentos os animais foram colocados por 45 minutos, antes de iniciar os testes, em caixas de acrílico (20 x 20 x 20 cm), com a

finalidade de evitar estresse e o fator novidade, reconhecidos por liberar opóides endógenos (Netto et al, 1987).

As soluções testadas foram administradas 30 minutos antes dos procedimentos algogênicos. Todas as substâncias testadas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.).

Os resultados de todos os testes foram validados com sulfato de morfina, o opóide padrão. Para os grupos controle foram usados salina (morfina, naloxona) e solução de tween (extratos alcaloídicos e frações).

### II.5.1. Teste de Formalina

Os experimentos foram realizados segundo o método descrito por Hunskaar e Hole (1987). Após a administração das substâncias testes, foi injetado subcutaneamente (s.c.) 3ml de uma solução de formalina 1 %, no dorso da pata traseira esquerda dos animais, usando uma microseringa com agulha de 20 gauge.

Os camundongos foram observados nas caixas de acrílico com um espelho de três lados, que permitiu uma visão ampla das patas; o tempo despendido pelo animal em lambar a pata (tempo de "licking") foi observado e registrado da seguinte maneira: nos 5 primeiros minutos após a injeção de formalina (fase precoce) e por 10 minutos iniciados após 20 minutos da injeção na pata do animal (fase tardia).

As duas fases do teste de formalina em camundongos parecem ser diferentes, envolvendo diferentes mecanismos de nocicepção. A reação dos animais na fase precoce é devido à ação direta de formalina em nociceptores, enquanto que na fase tardia, está relacionada à inflamação.

### I.5.2. Teste de Tail Flick (latência para retirada da cauda ao estímulo térmico)

A analgesia foi avaliada com equipamento de Tail Flick (Albasch Equipamentos Eletrônicos). Os métodos de Netto et al (1987) e Ramabadran et al (1989) foi adaptado como segue. A linha de base de latência (tempo de reação) foi obtida com três medidas pré-droga, sendo a média das três medidas considerada o tempo de reação pré-droga. Animais com 2 medidas iguais ou acima de 6 segundos foram descartados.

Os tratamentos foram administrados imediatamente após a última medida pré-droga. Após trinta minutos foram realizadas mais 3 medidas e a média destas foi considerada como tempo de reação pós-droga. O tempo de 10 segundos foi estabelecido como o teto máximo em cada medida, para evitar dano tecidual.

A dose dos alcalóides que apresentou maior atividade foi usada para a reversão com naloxona, que foi administrada (i.p.) 8 minutos antes da droga teste. Naloxona foi usada em duas doses (3,0 e 10,0 mg/kg), dependendo da resposta dos animais às doses de morfina.

## II.6. Ensaio *in vitro*

### II.6.1. Preparação de Membrana (união específica de [<sup>3</sup>H]Naloxona)

A preparação de membrana foi realizada como descrito por Lee et al. (1975). Os ratos foram decapitados, o cérebro dissecado e os estriados removidos rapidamente e pesados. A estrutura foi homogeneizada em 50 volumes de tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7.4). O homogeneizado foi centrifugado a

100.000xg por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso no mesmo volume de tampão e recentrifugado.

O precipitado final foi suspenso no tampão, ajustando-se a concentração de proteína para 0,2 mg/ml. Estes procedimentos foram realizados a uma temperatura de 4°C.

#### II.6.2. Ensaio da União Específica ("binding") de [<sup>3</sup>H]Naloxona

A membrana (200 µg de proteína) foi incubada por 5 minutos a 35°C num volume final de 500 µl de meio de incubação contendo tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7.4). Após este procedimento foi adicionado [<sup>3</sup>H]Naloxona e incubado por um período adicional de 15 minutos a 35°C. Os experimentos foram realizados em triplicata. A reação foi interrompida por filtração sob vácuo com filtros GF/B Sartorius e imediatamente lavados com 20 ml de tampão Tris/HCl 50 mM gelado (pH=7.4). Os filtros foram depositados em frascos (vial's plásticos) com 3 ml de líquido de cintilação (2 litros de tolueno, 1 litro de Triton X-100, PPO 16.5 mg e POPOP 250 mg) para a determinação da radioatividade com cintilador Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter.

#### II.6.3. Preparação de Membrana (atividade de adenilato ciclase e união específica [<sup>3</sup>H]GMP-PNP)

Membranas lisadas e lavadas foram preparadas por uma modificação do método usado por Souza e Ramirez (1991). Após a retirada e pesagem dos estriados, estes foram homogeneizados em 20 volumes de solução com sacarose 0.32 M, Tris/HCl 10 mM e MgCl<sub>2</sub> 1 mM (pH 7.4). O homogeneizado foi

centrifugado a 1.000xg por 15 minutos, o sobrenadante (S1) foi reservado em gelo. O precipitado foi ressuspensão no tampão inicial e novamente centrifugado.

O segundo precipitado foi descartado e S1/S2 foram juntados e centrifugados a 27.000g por 15 minutos. O precipitado resultante foi ressuspensão em 20 volumes do tampão Tris/HCl 10 mM (pH 7.4) e permaneceu no gelo por 30 minutos para que vesículas formadas durante a homogeneização com sacarose fossem lisadas.

A seguir foi realizada nova centrifugação a 27.000xg por 15 minutos. Este procedimento foi repetido por mais três vezes, lavando-se sempre o precipitado com tampão Tris/HCl 10 mM. Ao final o precipitado foi ressuspensão no tampão e ajustado para uma concentração final de proteína de 1 mg/ml.

#### II.6.4. Ensaio da Atividade de Adenilato Ciclase (AC)

A atividade da AC foi determinada de acordo com Paz et al (1994), através da produção de AMPc a partir de ATP não radioativo. As incubações foram realizadas a 30°C em frascos de eppendorf, com volume final de 100 µl, Tris/HCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM, 1 g% albumina sérica bovina, GMP-PNP (exceto nos tubos controle) e os alcalóides de *Psychotria colorata* (10 µg/tubo) ou solução de tween (10 µl/tubo). A membrana foi pré-incubada por 15 minutos, sendo que a reação foi iniciada pela adição de de ATP 1 mM e interrompida após 1 minuto através de fervura por 5 minutos. Após a interrupção da reação, os tubos foram centrifugados a 12.000xg por 5 minutos e o precipitado descartado. Alíquotas de 50µl (amostra) do sobrenadante foram utilizadas para dosagem do AMPc formado.

### II.6.5. Dosagem do AMPc formado

O conteúdo de AMPc produzido foi dosado de acordo com Tovey et al (1974) pelo método de "radio binding ensaio". Em frascos do tipo eppendorfs foram adicionados 50  $\mu$ l da solução de [ $^3$ H]AMPc e 100  $\mu$ l da solução de proteína "binding" da AMPc (proteína quinase A). Os eppendorfs foram incubados a 4°C (em gelo) de 14 a 18 horas. A incubação foi interrompida pela adição de 100  $\mu$ l de carvão ativado (650 mg de carvão, 500 mg de albumina e 25 ml de tampão do Kit). O tampão Kit foi preparado com Tris/HCl 1 M e 25 ml de EDTA). Os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 12.000xg. Retirou-se uma alíquota de 120  $\mu$ l do sobrenadante, que foi pipetada em frascos (vial's plásticos) onde previamente havia sido adicionado 240  $\mu$ l de uma solução SDS 0.1 N/HCl 3 N/NaOH 1 N. Adicionou-se 3 ml da líquido de cintilação para a determinação da radioatividade em cintilador. Determinou-se a concentração de AMPc formado nas amostras, por comparação com a faixa linear de uma curva padrão com concentrações de AMPc que variavam de 1 a 16 pmol/tubo.

### II.6.6. Ensaio da União Específica de [ $^3$ H]GMP-PNP

As medidas da união de [ $^3$ H]GMP-PNP a membranas (200-300  $\mu$ g de proteína) foram realizadas no seguinte meio de incubação: Tris/HCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM, em volume final 500  $\mu$ l. As membranas foram incubadas a uma temperatura de 30°C por 15 minutos. A incubação foi iniciada pela adição da membrana e interrompida por centrifugação a 12.000xg por 2 minutos. O precipitado foi rapidamente lavado com H<sub>2</sub>O destilada fria (4°C) e tratado com SDS 0.1 g%. Após 14 a 18 horas, os frascos contendo as membranas incubadas

foram levados à estufa a 60°C por 15 minutos. Após agitação dos tubos, retirou-se uma alíquota de 240 µl da amostra que foi adicionada em frascos contendo 100 µl de HCl 3 N. Após a adição de 3 ml de líquido de cintilação, os frascos foram levados ao cintilador para a determinação da radioatividade.

A interação específica foi calculada pela diferença entre a os valores da união total e inespecífica (concentrações 1.000 vezes maiores de GMP-PNP não radioativo).

## **II.7. Dosagem de Proteínas**

O conteúdo proteico foi determinado como descrito por Lowry et al (1951), em alíquotas da suspensão final das preparações de membrana. Uma solução de albumina sérica 1 mg/ml foi usada para a curva padrão.

## **II.8. Análise Estatística**

### *II.8.1. In vivo*

Os resultados do Teste de Formalina foram analisados por análise de variância (ANOVA/DMS) de uma via.

No Teste de Tail Flick, os resultados das medidas pré e pós-tratamento foram comparadas pelo Teste de Wilcoxon. A diferença entre as medidas pós-droga entre os grupos foi analisada pelo Teste de ANOVA/DMS.

### *II.8.2. In vitro*

Os resultados dos ensaios *in vitro* foram analisados pelo Teste ANOVA/DMS ou pelo Teste *t* de Student.

### **III. RESULTADOS**

### III.1. Resultados *in vivo*

#### III.1.1. Teste de Formalina

Os resultados do EAiFh-pH 7 de *Psychotria colorata* no teste de formalina (precoce e tardia) comparados com os resultados iniciais obtidos com o extrato aquoso (EAq), podem ser vistos na Tabela II. Os dois extratos apresentaram atividade em ambas as fases. Pode-se perceber que na fase precoce EAq apresentou uma resposta dose-dependente. Na fase tardia o efeito inibitório máximo deste extrato, é alcançado com a menor dose avaliada (15.6 mg/kg).

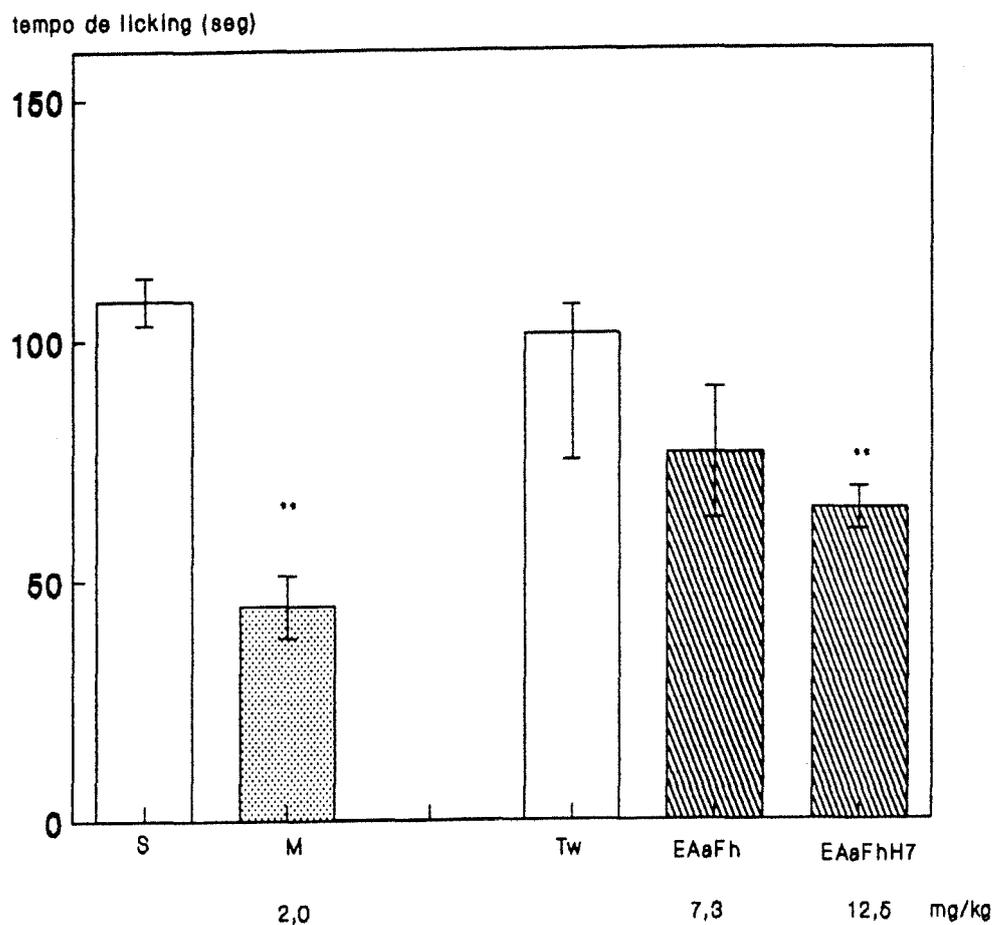
O EAa-pH 7 (obtido a partir das folhas alcalinizadas) foi estudado somente na fase precoce do teste de formalina. Estes resultados podem ser observados na Figura 3; a maior dose (12,5 mg/kg) apresentou apenas uma moderada inibição do tempo dispendido em lambar a pata ("licking").

**Tabela II:** Efeito dos extratos aquoso e alcaloídico inicial (pH 7) de folhas *Psychotria colorata* no teste de Formalina (fases precoce e tardia).

| Tratamento     | Dose<br>(mg/kg) | N  | Licking<br>(0-5min) | Inibição<br>(%) | N  | Licking<br>(20-30min) | Inibição<br>(%) |
|----------------|-----------------|----|---------------------|-----------------|----|-----------------------|-----------------|
| <b>Salina</b>  | -               | 17 | 130,4 ± 9,1         | -               | 8  | 104,5 ± 17,6          | -               |
| <b>Morfina</b> | 0,4             | 18 | 114,4 ± 6,8         | 12,2            | 11 | 64,6 ± 11,0           | 38,1*           |
|                | 0,8             | 12 | 78,3 ± 4,0          | 40,0*           | 12 | 61,1 ± 12,0           | 41,5*           |
|                | 1,6             | 12 | 69,7 ± 6,7          | 46,5*           | 11 | 30,3 ± 11,0           | 71,0**          |
| <b>EAq</b>     | 15,6            | 12 | 113,3 ± 11,0        | 13,2            | 4  | 1,9 ± 1,9             | 98,2**          |
|                | 62,5            | 4  | 76,0 ± 19,0         | 41,7            | -  | -                     | -               |
|                | 250,0           | 6  | 38,8 ± 5,8          | 70,3**          | 5  | 0,0 ± 0,0             | 100,0**         |
|                | 500,0           | 5  | 9,0 ± 2,5           | 93,1**          | -  | -                     | -               |
| <b>Tw</b>      | -               | 5  | 107,1 ± 7,0         | -               | 6  | 47,1 ± 6,4            | -               |
| <b>EAI</b>     | 15,6            | 6  | 83,7 ± 8,0          | 21,8            | 6  | 18,5 ± 8,4            | 61,0**          |
|                | 31,2            | 6  | 46,1 ± 3,4          | 57,0**          | 5  | 0,0 ± 0,0             | 100,0**         |

Valores expressos em segundos (média ± erro padrão). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 (ANOVA) em relação aos respectivos controles.

Tw = tween; EAq = extrato aquoso; EAI = extrato alcaloídico inicial.



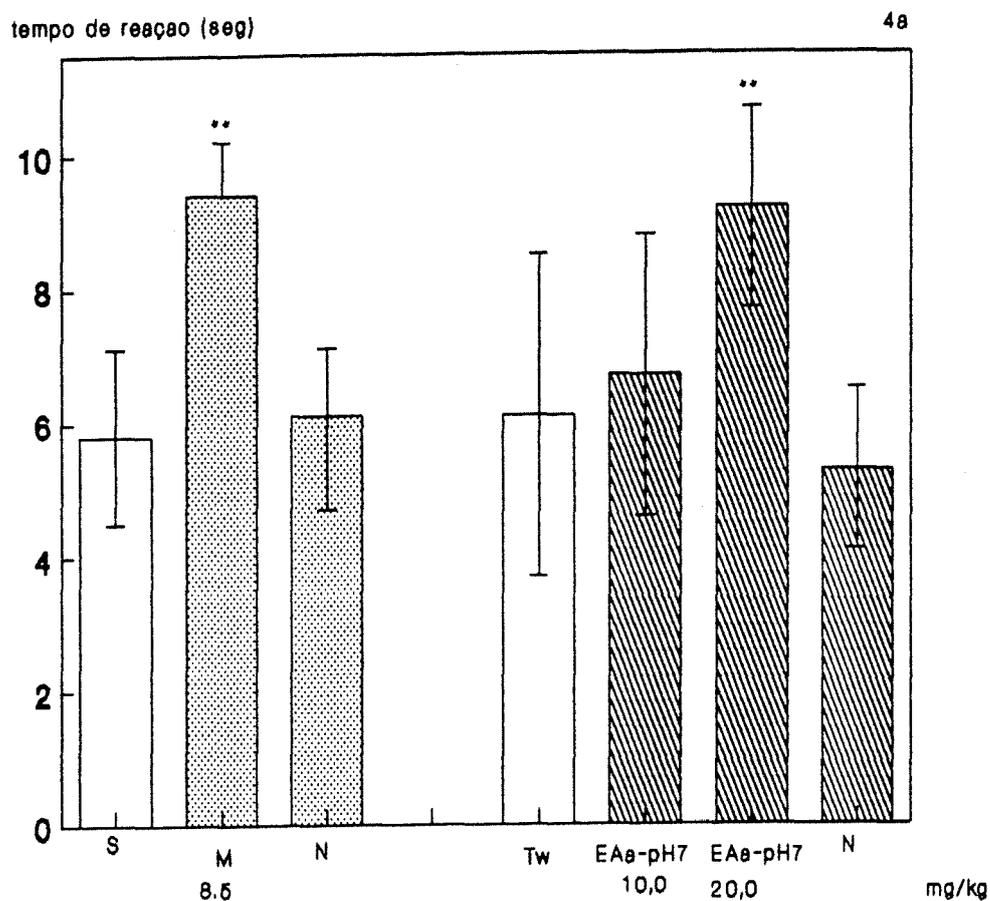
**FIGURA 3:** Efeitos analgésicos do EAa-pH 7 no teste de Formalina (fase precoce). Salina n= 18; tw n= 17; morfina n= 8; EAa-pH 7 n= 6 (7,3 mg/kg) e 4 (12,5). As barras representam o erro padrão. \* = p < 0.05-ANOVA: comparação com os respectivos controles.

S = salina; M = morfina; Tw = Tween; EAa = extrato alcaloídico de folhas alcalinizadas pH 7.

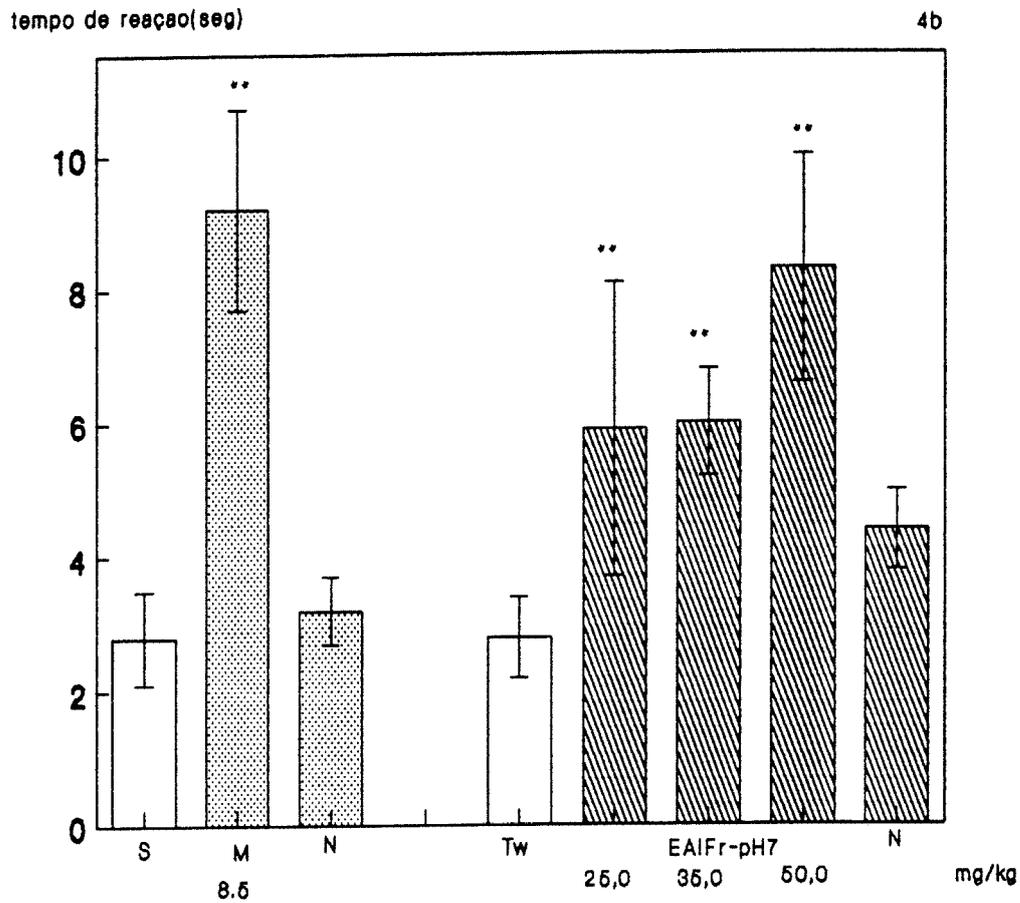
### III.1.2. Teste do reflexo de retirada da cauda por estímulo térmico (Tail Flick)

A Figura 4 compara os efeitos analgésicos dos alcalóides dos EAa-pH 7 (Figura 4a) e EAI-pH 7 (Figura 4b) de *Psychotria colorata* no teste de Tail Flick. Como pode ser observado, todos os tratamentos produziram analgesia reversível pela administração prévia de naloxona.

O efeito analgésico das Fr. 20 e Fr. 26 (vide obtenção no Apêndice) está representado nas Figuras 5 e 6. A Fr. 20, na dose de 10,0 mg/kg, apresentou um efeito analgésico comparável à morfina 3,5 mg/kg. A analgesia foi revertida quando administrada naloxona previamente.



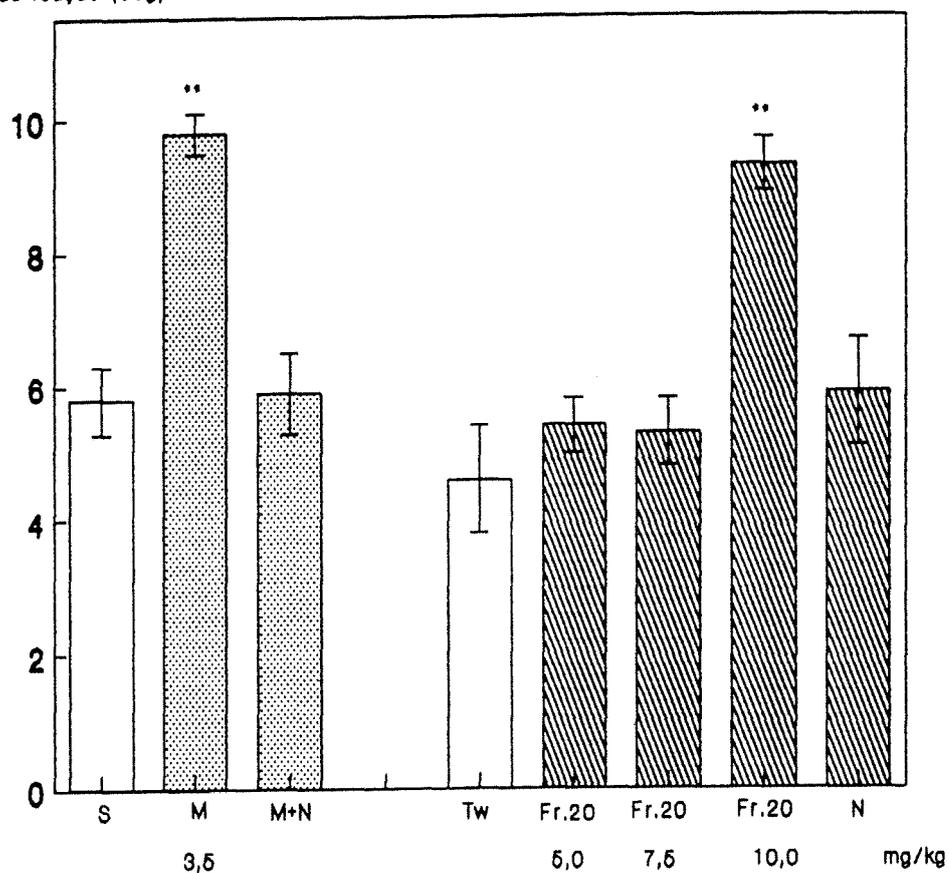
**FIGURA 4a:** Efeitos analgésicos de EAa-pH 7 de *Psychotria colorata*, morfina e a reversibilidade por naloxona. A reversão por naloxona foi testada 20 mg/kg de EAa-pH 7.  $n=5$ . As barras representam o erro padrão. \*\* =  $p < 0.01$ -ANOVA: comparação com os respectivos controles. S = salina; M = morfina; N = naloxona; Tw = Tween; EAa-pH 7 = extrato alcaloídico de folhas alcalinizadas pH 7.



**FIGURA 4b:** Efeito inibitório de EAIfr-pH 7 de *Psychotria colorata*, morfina e a reversibilidade por naloxona no teste de Tail Flick. A reversão por naloxona foi testada na dose de 50 mg/kg do extrato. n= 5. As barras representam o erro padrão. \*\* =  $p < 0.01$ -ANOVA: comparação com os respectivos controles.

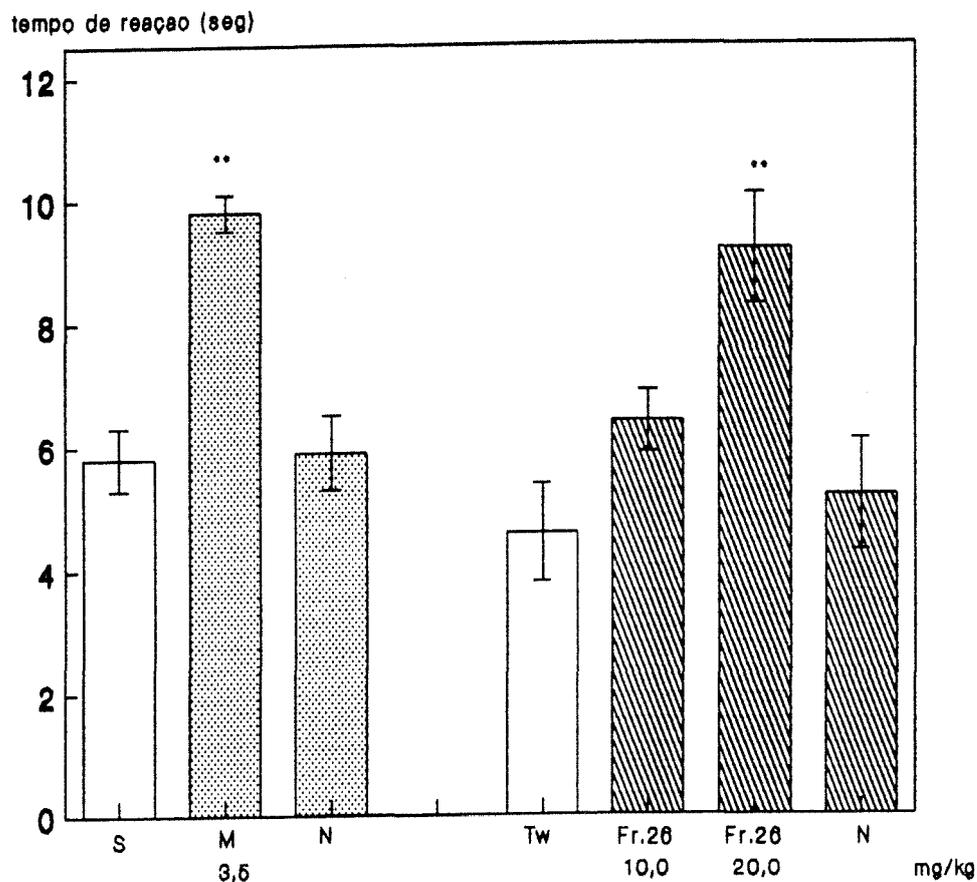
S = salina; M = morfina; Tw = Tween; EAIfr-pH 7a = extrato alcaloídico de flores pH 7.

tempo de reação (seg)



**FIGURA 5:** Efeito inibitório da Fr. 20 do EAa-pH 7 de *Psychotria colorata*, morfina e a reversibilidade por naloxona no teste de Tail Flick. A reversão por naloxona foi testada na dose de 10 mg/kg do extrato. n= 5. As barras representam o erro padrão. \*\* =  $p < 0.01$ -ANOVA: comparação com os respectivos controles.

S = salina; M = morfina; Tw = Tween; N = naloxona; Fr. 20 = fração 20.



**FIGURA 6:** Efeito da Fr.26 do EAa-pH 7 de *Psychotria colorata*, morfina e a reversibilidade por naloxona no teste de Tail Flick. A reversão por naloxona foi testada na dose de 20 mg/kg do extrato.  $n=5$ . As barras representam o erro padrão. \*\* =  $p < 0.01$ -ANOVA: comparação com os respectivos controles.

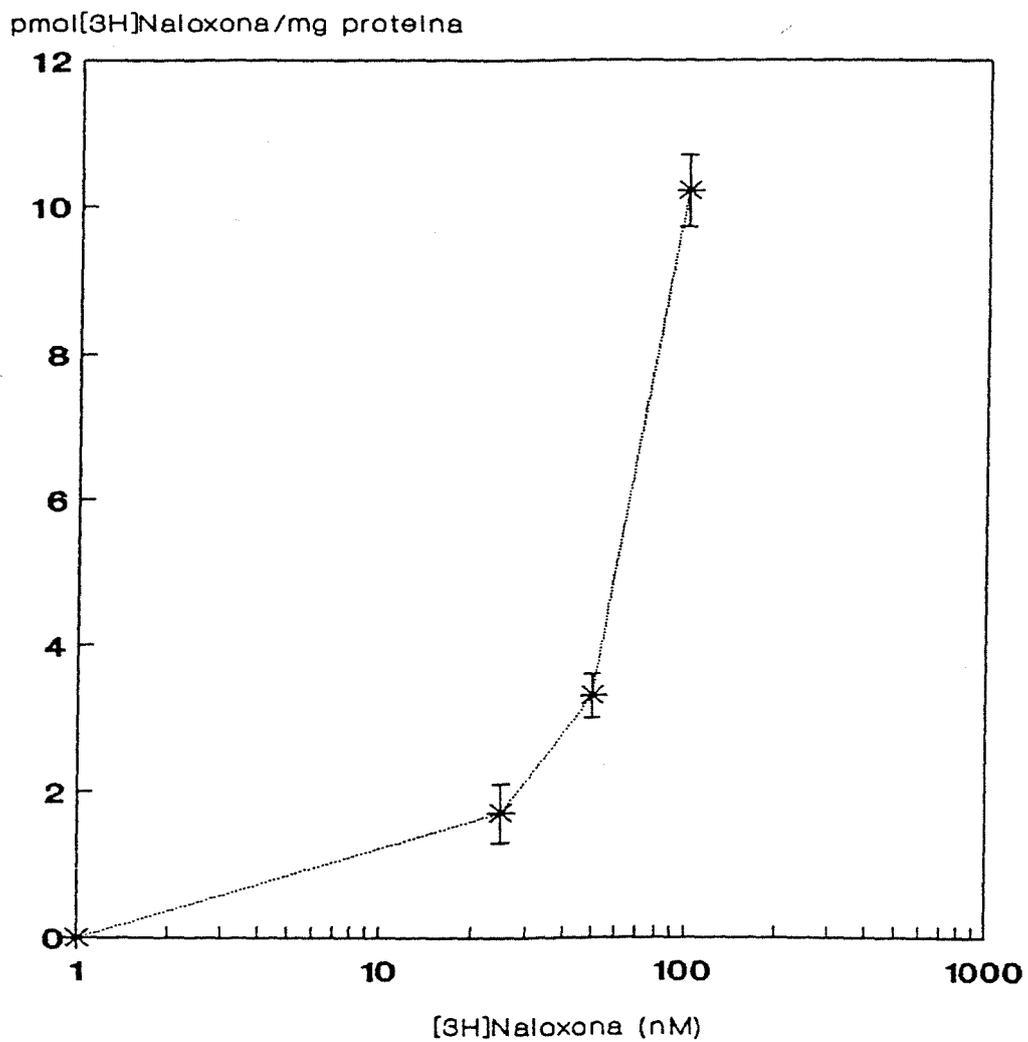
S = salina; M = morfina; Tw = Tween; N = naloxona; Fr. 26 = fração 26.

## III.2. Resultados *in vitro*

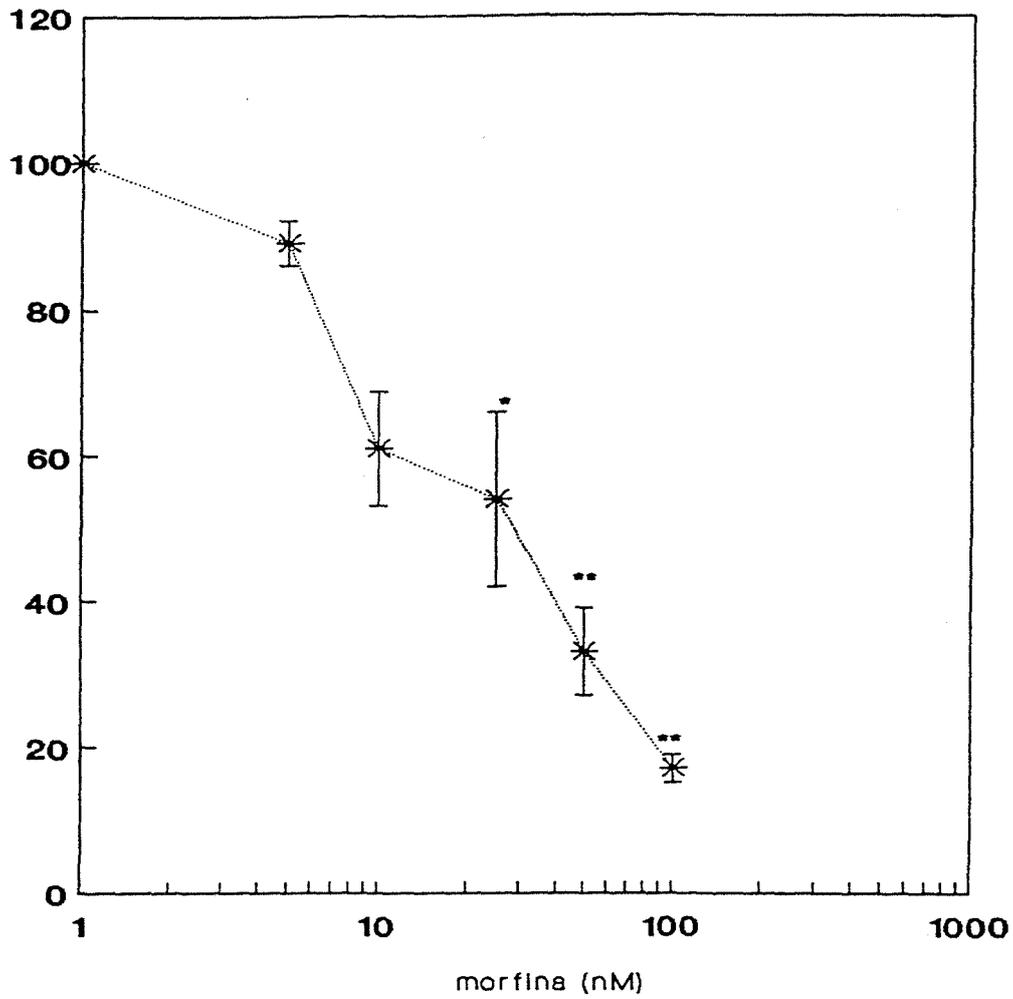
### III.2.1. União específica de [<sup>3</sup>H] Naloxona

Foi realizada uma curva de concentração [<sup>3</sup>H]Naloxona para validar a técnica em nosso laboratório, utilizando 25, 50 e 100 nM do radioligante. A interação específica foi calculada pela diferença entre os valores obtidos na ausência (união total) e na presença (união inespecífica) de naloxona não marcada em concentrações 1.000 vezes maiores que a concentração de [<sup>3</sup>H]Naloxona. A Figura 7 demonstra que a união específica aumenta com o aumento das concentrações de [<sup>3</sup>H]Naloxona.

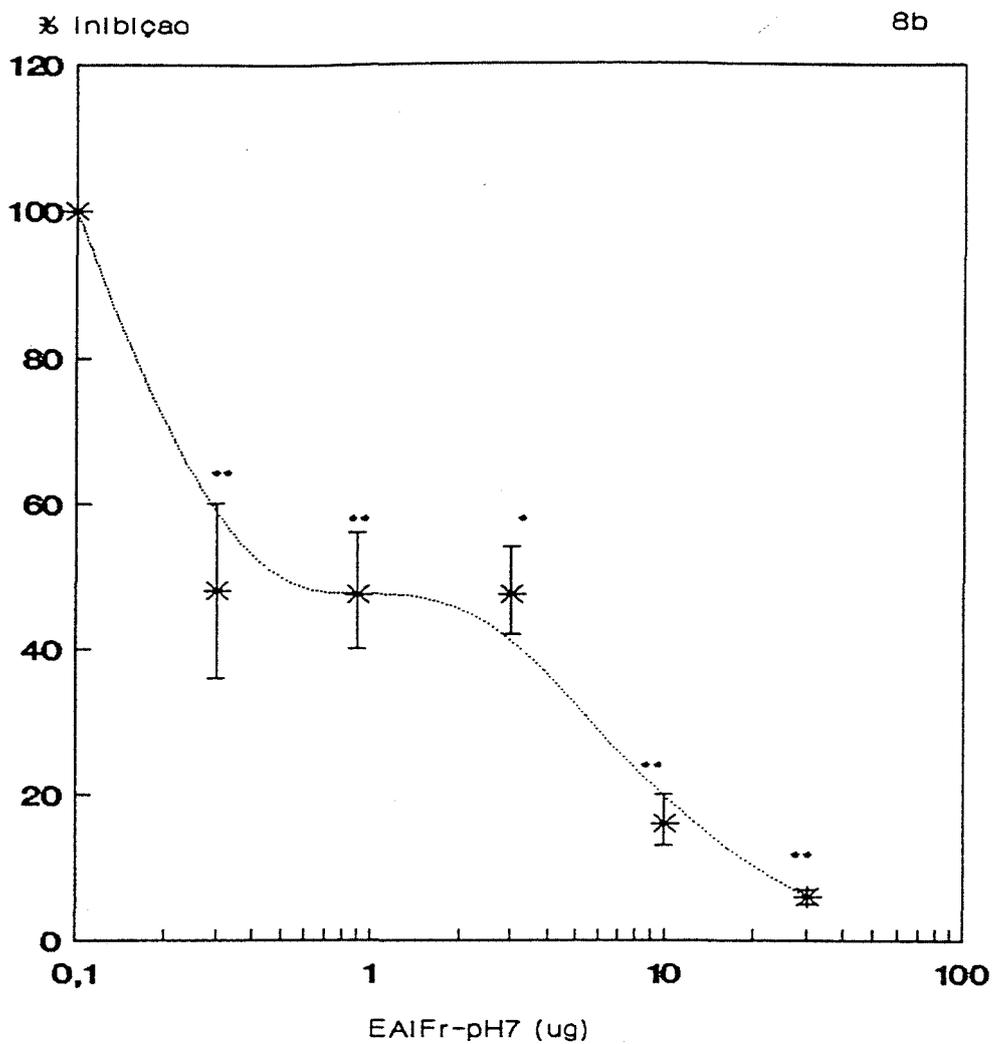
A concentração de 100 nM foi selecionada para a pesquisa da interferência dos alcalóides de *Psychotria colorata* na união específica de [<sup>3</sup>H]Naloxona. A confirmação da especificidade do "binding" foi demonstrada pela curva de concentração de morfina inibindo a ligação do antagonista radioativo. A Figura 8a apresenta a curva de concentração de morfina (5-100 nM) inibindo a união específica de [<sup>3</sup>H]Naloxone de forma dose-dependente. O efeito dos alcalóides do extrato e flores de *Psychotria colorata* (0,3-30µg/tubo) são apresentados na Figura 8b: eles inibem a ligação de [<sup>3</sup>H]Naloxona com um padrão dose-dependente, comparável ao efeito de morfina.



**FIGURA 7:** Curva dose-resposta da união específica de  $[^3\text{H}]$ Naloxona (25, 50 e 100 nM). Os valores foram expressos em pmol/mg de proteína. Cada ponto representa Média  $\pm$  EPM de nove experimentos separados.



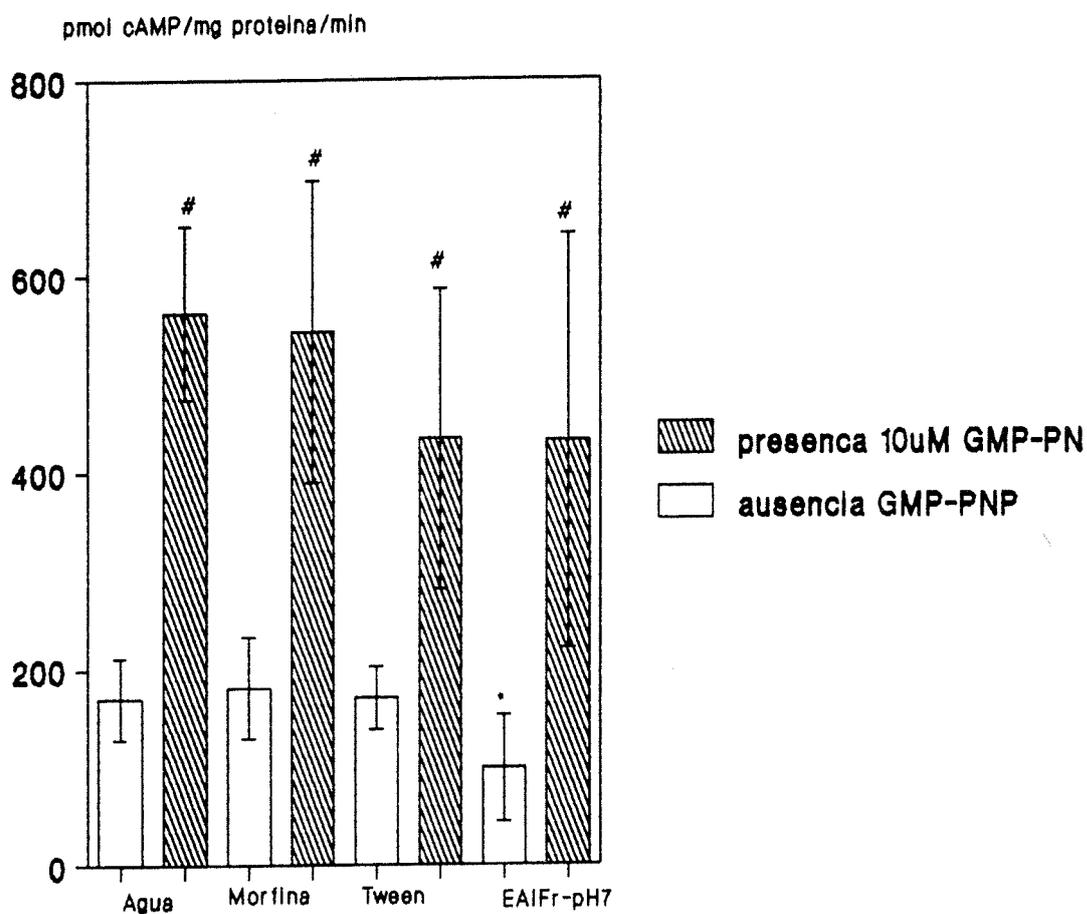
**FIGURE 8a:** Curva dose-resposta dos efeitos de morfina (5, 10, 25, 50, 100 nM) na ligação específica [<sup>3</sup>H]Naloxona 100 nM. Valores foram expressos em pmol/mg de proteína. Cada ponto representa Média  $\pm$  EPM de três experimentos. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , ANOVA.



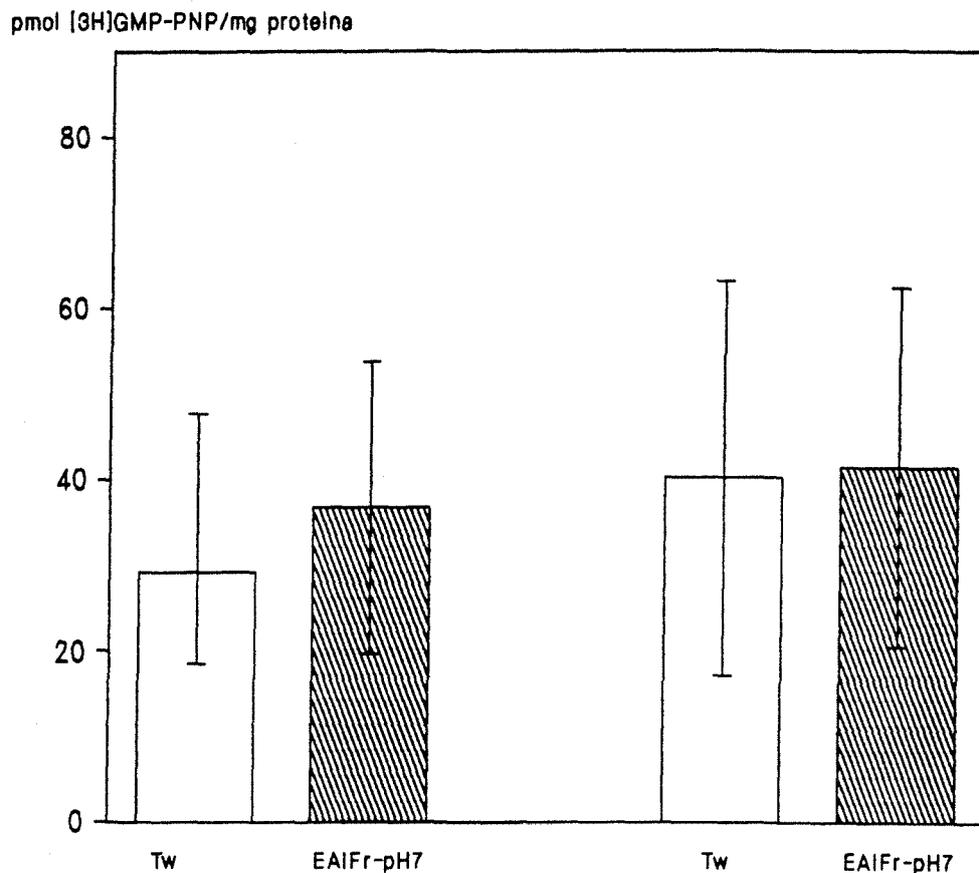
**Figura 8b:** Inibição da união específica de [ $^3\text{H}$ ] Naloxona pelo EAIFr-pH 7 (0.3, 1, 3, 10 e 30  $\mu\text{g}$ /tubo) de *Psychotria colorata*. Valores foram expressos em pmol/mg de proteína. Cada ponto representa Média  $\pm$  EPM de três experimentos. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ -ANOVA.  
EAIFr-pH 7 = extrato alcaloídico de flores pH 7.

### III.2.2. Atividade de adenilato ciclase (AC) e União específica de [<sup>3</sup>H]GMP-PNP

A Figura 9 demonstra que tanto EAiFr-pH 7 (10 $\mu$ g/tubo) de *Psychotria colorata* quanto morfina, não interferem na atividade da enzima adenilato ciclase quando estimulada por GMP-PNP. Entretanto, EAiFr-pH 7 apresentou uma pequena inibição na atividade de AC basal. O extrato de *Psychotria colorata* não afetou a ligação de [<sup>3</sup>H]GMP-PNP. O resultado pode ser visto na Figura 10.



**FIGURE 9:** Efeito do EAiFr-pH 7 (10µg/tubo) e de morfina (1,32 µM) na atividade de (AC). Valores estão expressos em pmol AMPc/mg proteína/min. Cada valor representa Média ± EPM de três experimentos. A análise estatística: a) compara os níveis de AMPc entre Tween e EAiFr-pH 7 (Teste *t*-Student, \* =  $p < 0.05$ ); b) os níveis de AMPc na presença ou ausência (basal) de GMP-PNP (ANOVA # = 0.01). EAiFr- pH 7 = extrato alcaloídico inicial de flores.



**FIGURE 10:** Comparação entre os efeitos de EAIfr-pH 7 de *Psychotria colorata* (5 e 50  $\mu\text{g}/\text{tubo}$ ) com  $\text{H}_2\text{O}$  e tween na união específica de [3H]GMP-PNP (40 nM). Valores foram expressos como pmol/mg de proteína. Cada valor representa a Média  $\pm$  EPM de três experimentos. Não foi observada diferença significativa.

Tw = tween; EaiFr-pH 7 = extrato alcaloídico de flores pH 7.

## **IV. DISCUSSÃO**

A metodologia etnofarmacológica, bem direcionada e coerentemente interpretada, tem dado provas de que pode ser a mais eficaz estratégia na procura de novas drogas de origem vegetal. A espécie *Psychotria colorata*, pertencente a um gênero botânico rico em plantas usadas tradicionalmente na medicina popular, se afirmou neste trabalho como uma fonte importante de compostos bioativos.

O gênero *Psychotria* encontra-se botanicamente classificado na grande família RUBIACEAE, extremamente bem representada no noroeste da Amazônia. Apesar de ser cosmopolita, muitas espécies são tropicais. A família é bem conhecida por ser fonte de café, quinina e ipeca. Esta família é rica em constituintes químicos com potencial atividade biodinâmica, incluindo iridóides, diversos tipos de alcalóides, triterpenos e seus compostos glicosídicos, esteróis, antraquinonas, derivados naftalênicos, polifenóis, taninos, compostos cianogênicos, entre outros (Schultes e Raffauf, 1990).

As espécies do gênero *Psychotria* têm gerado considerável interesse por apresentarem compostos biologicamente ativos, principalmente alcalóides e entre eles os de núcleo pirroloindolínico. Um levantamento bibliográfico, realizado por Leal (1994) apresenta uma visão geral das espécies de *Psychotria* que contêm alcalóides e sua distribuição geográfica (Tabela III). Interessante ressaltar, que são minoria as espécies que apresentam estes compostos e que estas parecem estar restritas a territórios geográficos determinados, como América do Sul e Ilhas do Pacífico.

Tabela III: Presença de alcalóides em espécies de *Psychotria*.

| Origem Geográfica     | Espécies                 | Órgãos testados | Presença de alcalóides | Referências  |
|-----------------------|--------------------------|-----------------|------------------------|--|
| BRASIL                | <i>P. colorata</i>       | F, FL           | +                      | Elisabetsky et al, 1990<br>Schultes et al, 1990  |
|                       | <i>P. lupulina</i>       | F               | +                      |  |
| PERU                  | <i>P. patens</i>         | F               | +                      | Smolensky et al, 1975<br>Rivier et al, 1972  |
|                       | <i>P. carthagenensis</i> | F, Ca           | +                      |  |
|                       | <i>P. viridis</i>        | F               | +                      |  |
| GUIANA FRANCESA       | <i>P. platypoda</i>      | F, Ca, Rz       | +                      | Grenand et al, 1987  |
|                       | <i>P. poeppigiana</i>    | F, Fl           | +                      |  |
|                       | <i>P. ulviformes</i>     | F               | +                      |  |
| PORTO RICO            | <i>P. berteriana</i>     | F, Ca           | -                      | Fong et al, 1972   |
|                       | <i>P. guadalupensis</i>  | PI              | -                      |  |
| ZAIRE                 | <i>P. eminiiana</i>      | PA              | -                      | Malaisse et al, 1979   |
|                       | <i>P. kirkii</i>         | F, Fr           | -                      |  |
|                       | <i>P. linearisepala</i>  | F, Ca, Rz       | -                      |  |
|                       | <i>P. peduncularis</i>   | F, C            | -                      |  |
|                       | <i>P. plantaginoidea</i> | PI              | -                      |  |
|                       | <i>P. spithamea</i>      | PA, Rz          | -                      |  |
| FRANÇA                | <i>P. bacteriophyla</i>  | F               | -                      | Rivier et al, 1972   |
|                       | <i>P. emetica</i>        | F               | -                      |  |
|                       | <i>P. undulata</i>       | F               | -                      |  |
| MALÁSIA               | <i>P. angulata</i>       | F, Ca, Fr       | -                      | Amarasingham et al, 1964<br><br>Kiang et al, 1961<br>Adjibadé, 1989<br>Willaman et al, 1961<br>Lajis et al, 1993<br>Willaman et al, 1961 |
|                       | <i>P. calocarpa</i>      | F, Ca, Rz, Fr   | -                      |  |
|                       | <i>P. griffithii</i>     | F, Ca           | -                      |  |
|                       | <i>P. malayana</i>       | F, Ca, C, Rz    | -                      |  |
|                       | <i>P. montana</i>        | F, Ca, Rz       | -                      |  |
|                       | <i>P. rostrata</i>       | F               | +                      |  |
|                       | <i>P. sarmentosa</i>     | F, Ca, Rz       | -                      |  |
| <i>P. viridiflora</i> | F, C                     | -               |                        |  |
| INDONÉSIA             | <i>P. expansa</i>        | F               | +                      | Arbain et al, 1989   |
|                       | <i>P. hirta</i>          | F               | +                      |  |
|                       | <i>P. rostrata</i>       | F               | +                      |  |
| AUSTRÁLIA             | <i>P. coelospermum</i>   | F, Ca           | -                      | Smolensky et al, 1974  |
| NOVA GUINÉ            | <i>P. amphytirsa</i>     | F, Ca           | -                      | Hartley et al, 1973  |
|                       | <i>P. apiculata</i>      | F, Ca, C        | -                      |  |
|                       | <i>P. beccarioides</i>   | F, C            | +                      |  |
|                       | <i>P. chaunantha</i>     | F, Ca           | -                      |  |
|                       | <i>P. diplococca</i>     | F, C            | -                      |  |
|                       | <i>P. djamuensis</i>     | F, C            | -                      |  |
|                       | <i>P. dolichosepala</i>  | F, Ca, C        | -                      |  |
|                       | <i>P. leonardii</i>      | F, Ca           | -                      |  |
|                       | <i>P. leptothyrsa</i>    | F, Ca           | -                      |  |
|                       | <i>P. luteola</i>        | F, C            | -                      |  |
|                       | <i>P. micralabastra</i>  | F, C            | -                      |  |
|                       | <i>P. multicosmoides</i> | F, C            | -                      |  |
|                       | <i>P. olivacea</i>       | F               | -                      |  |
|                       | <i>P. randiana</i>       | F, C            | -                      |  |
|                       | <i>P. shumanii</i>       | F, C, Fr        | -                      |  |
| <i>P. stricta</i>     | F, Ca                    | -               |                        |  |

Tabela III (continuação): Presença de alcalóides em espécies de Psychotria.

| Origem Geográfica       | Espécies                 | Órgãos testados | Presença de alcalóides | Referências                         |
|-------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------|-------------------------------------|
| NOVA CALEDÔNIA          | <i>P. baillonii</i>      | F, Ca, C        | -                      | Adjibadé, 1989<br>Paris et al, 1969 |
|                         | <i>P. balansae</i>       | F,Fr            | -                      |                                     |
|                         | <i>P. brachylaena</i>    | F,Fr,C          | -                      |                                     |
|                         | <i>P. calorhamnus</i>    | F               | -                      |                                     |
|                         | <i>P. cardiochlamys</i>  | F,C             | -                      |                                     |
|                         | <i>P. collina</i>        | F,C,Fr          | +                      |                                     |
|                         | <i>P. douarrei</i>       | F,C,Rz          | +                      |                                     |
|                         | <i>P. fuscopilosa</i>    | F,Fr            | -                      |                                     |
|                         | <i>P. goniocarpa</i>     | F,C             | -                      |                                     |
|                         | <i>P. laxissima</i>      | F               | -                      |                                     |
|                         | <i>P. leratii</i>        | F,Ca,C          | -                      |                                     |
|                         | <i>P. leucococca</i>     | F,C             | -                      |                                     |
|                         | <i>P. ligustrina</i>     | F,Fr            | +                      |                                     |
|                         | <i>P. lycioides</i>      | F,C             | -                      |                                     |
|                         | <i>P. microglosa</i>     | F,C             | -                      |                                     |
|                         | <i>P. monanthos</i>      | F               | -                      |                                     |
|                         | <i>P. nummularioides</i> | F, C            | -                      |                                     |
|                         | <i>P. oleoides</i>       | F               | +                      |                                     |
|                         | <i>P. oubatchensis</i>   | F,C             | -                      |                                     |
|                         | <i>P. pancheri</i>       | F               | -                      |                                     |
|                         | <i>P. rubefacta</i>      | F,C             | -                      |                                     |
|                         | <i>P. rupicola</i>       | F               | -                      |                                     |
| <i>P. serpenflorens</i> | F                        | -               |                        |                                     |
| <i>P. speciosa</i>      | F                        | -               |                        |                                     |
| <i>P. suaveolens</i>    | F                        | -               |                        |                                     |
| <i>P. toninensii</i>    | F,C                      | -               |                        |                                     |
| VANUATU                 | <i>P. anethyensis</i>    | F,Fr,Rz         | -                      | Adjibadé, 1989                      |
|                         | <i>P. forsteriana</i>    | F,C,Rz,Fr       | +                      |                                     |
|                         | <i>P. milnei</i>         | F               | +                      |                                     |
|                         | <i>P. nacdado</i>        | F,C             | -                      |                                     |
|                         | <i>P. trichostoma</i>    | F,C             | +                      |                                     |

Rz= raiz; Ca= caule; C=casca; F=folhas; Fl= flores; Fr=frutos; Pl= planta inteira; PA= parte aérea  
+ = presente; - = ausente.

Fonte: Leal, 1994

Os estudos químicos de espécies de *Psychotria* têm mostrado a ocorrência de diversas classes de compostos, tais como: alcalóides complexos, provavelmente derivados de um precursor triptamínico, naftoquinona, ácido ursólico e derivados, triptaminas, fitosteróis e complexos metálicos de níquel (Carvalho, 1993). Uma variedade de compostos alcaloídicos foram isolados de diversas espécies de *Psychotria*. Os alcalóides poliindólicos chimonantina, hodkinsina, psychotridina, iso-psychotridina, quadrigemina A, quadrigemina B, foram isolados de folhas e/ou da planta inteira de *Psychotria forsteriana* (Roth et al, 1985; Adjibadé et al, 1986). Estes alcalóides comportam-se como potentes inibidores da agregação plaquetária humana, agindo em doses inferiores aos inibidores clássicos como dipiridamol e isobutilmetilxantina (Beretz et al, 1985; Adjibadé, 1989). Recentemente, foram isolados das cascas do tronco desta espécie, calicantina e seus isômeros iso-calicantina e meso-chimonantina. A calicantina é um convulsivante eletrofisiologicamente semelhante a estricnina (Adjibadé et al, 1991, 1992).

Alcalóides pirrolidinoindolínicos, como hodkinsina, psychotridina, iso-psychotridina A, iso-psychotridina B e quadrigemina C, foram encontrados nas folhas de *Psychotria oleoides* da Nova Caledônia. Os três últimos foram avaliados quanto a atividade antibiótica, sendo que iso-psychotridina B foi o mais ativo (Libot et al, 1987; Adjibadé, 1989). Ainda desta espécie, foi isolado outro alcalóide indólico, a psycholeína, que assim como outros alcalóides pirrolidinoindolínicos, inibem a liberação do hormônio de crescimento (Guéritte-Voegelein et al, 1992).

Outras espécies de *Psychotria* foram fonte para o isolamento de alcalóides poliindólicos: *Psychotria beccarioides* encontrada na Nova Guiné (Adjibadé, 1989); *Psychotria rostrata*, comum na Malásia Peninsular, apresenta como componente principal a quadrigemina B, além de hodgkinsina, (-) calicantina, (+) chimonantina e calicantina (Lajis et al, 1993). Esta espécie é usada

tradicionalmente na Malásia para o tratamento de constipação. A quadrigemina B, apresentou atividade citotóxica para células HEP-2 e para linfócitos humanos normais; também foi observada atividade bactericida (Mahmud et al, 1993); os alcalóides (-) emetina, cefaelina, emetamina e 0-metilpsicotrina, foram isolados de *Psychotria granadensis* (Cordell et al, 1989); da espécie *Psychotria tomentosa* o alcalóide isoquinolínico (-) emetina (Willaman e Shubert, 1961).

Os extratos de *Psychotria colorata* foram avaliados a princípio nos teste de Formalina e de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O teste de contorções abdominais é mais sensível que o teste de formalina, porém menos específico que esse último (Hunskaar e Hole, 1987). No estudo desta planta, os ensaios farmacológicos iniciais indicaram que o extrato aquoso (EAq) das folhas possuía potente atividade analgésica, tanto no teste de Formalina quanto em Writhing induzido por ácido acético (Elisabetsky et al, 1995). A preparação de extratos contendo principalmente os alcalóides das folhas de *Psychotria colorata* (EAI<sub>Fh</sub>-pH 7), proporcionou um ganho da atividade analgésica se comparado com a faixa de doses ativas encontradas nos ensaios preliminares realizados com o extrato aquoso.

Na Tabela II podemos analisar a afirmação acima: na fase precoce do teste de Formalina, EAq exibiu 41% de inibição do tempo dispendido em lambe a pata (licking) na dose de 62,5 mg/kg, enquanto que com a metade desta dose (31,2 mg/kg) o extrato alcaloídico (EAI<sub>Fh</sub>-pH 7) atinge 57% de inibição. A obtenção de extratos partindo-se de folhas alcalinizadas (EAa-pH 7), que concentrava ainda mais os alcalóides aumentando o rendimento da extração, propiciou os resultados de formalina (fase precoce) que estão na Figura 3, onde observa-se atividade estatisticamente significativa já na dose de 12,5 mg/kg (36% de inibição do tempo de licking).

Nesta fase do trabalho pode-se constatar que os alcalóides de *Psychotria colorata* eram, de fato, os componentes que conferiam a atividade analgésica a esta espécie. Os vários extratos e frações contendo alcalóides começaram então a ser analisados pelo teste de Tail Flick, o mais usado para detecção de atividade analgésica do tipo opióide, que tem como "end point" de observação um aumento de latência para a retirada da cauda, que pode ser induzido pela administração de drogas opióides (Kawakita e Funakoshi, 1987).

É conhecido que os testes nociceptivos térmicos envolvem principalmente a ativação de receptores opióides do tipo  $\mu$  e de receptores  $\kappa$  nos testes com algogênicos não-térmicos (Abbot e Young, 1988; Fürst et al, 1988). Os alcalóides de *Psychotria colorata* foram eficientes em bloquear os reflexos dolorosos nos dois tipos de teste.

Os extratos alcaloídicos de folhas e de flores (Fig. 4a e 4b) e as frações obtidas do extrato de folhas (Fig. 5 e 6) apresentaram uma clara atividade analgésica no teste de Tail Flick e este efeito foi reversível pela administração prévia do antagonista opióide naloxona.

A ligação específica de neurotransmissores e o acoplamento aos seus receptores desencadeando eventos celulares, têm sido usado como uma relevante ferramenta para o estudo dos correlatos neuroquímicos dos efeitos observados *in vivo* de novas drogas (Sweetnam et al, 1993). Neste trabalho utilizou-se técnicas da união de radioligante para determinar a interferência dos alcalóides de flores de *Psychotria colorata* na ligação de [ $^3$ H]Naloxona a receptores opióides, na união específica de GMP-PNP, além dos efeitos sobre a atividade de AC em cérebro de ratos.

Os resultados obtidos até aqui devem ser vistos como preliminares, mas verifica-se uma inibição, pelos alcalóides, da união específica de [ $^3$ H]Naloxona, com um perfil semelhante ao da morfina (Fig. 8a e 8b, respectivamente). Estes

resultados reforçam os dados obtidos nos ensaios farmacológicos, de que os efeitos analgésicos dos alcalóides de folhas e flores de *Psychotria colorata* envolve a ativação de receptores opióides.

A participação dos receptores opióides e de seus ligantes em eventos celulares importantes têm sido relatados em inúmeros trabalhos. Existem evidências que os três principais tipos destes receptores ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ) utilizam AMPc como seu segundo mensageiro e que a ativação de receptores opióides pode inibir a atividade de adenilato ciclase via proteína-G (Simonds, 1988, Jaffe e Martin, 1990; Konkoy e Childers, 1993).

Os ensaios realizados para observar a interferência dos alcalóides de *Psychotria colorata* na união específica de [ $^3$ H]GMP-PNP a proteínas-G, indicam que nas condições usadas, os alcalóides não afetam esta ligação (Fig. 10). No entanto, quanto a atividade de AC, os alcalóides inibem a produção de AMPc basal, sem interferir na produção estimulada por GMP-PNP (Fig. 9).

É aceito que muitas das ações dos opióides se devem a sua grande estereoespecificidade (Simon e Hiller, 1994). Os analgésicos opióides com atividade central, apesar de possuírem estruturas químicas diferentes, apresentam características comuns: (a) um átomo de carbono quaternário; (b) um anel fenílico ligado a este átomo de carbono; (c) um grupo amino terciário separado do anel por dois átomos de carbono terciários; (d) uma hidroxila fenólica em posição meta relativa à ligação do carbono quaternário, caso o nitrogênio terciário seja parte de um anel de seis membros. A configuração absoluta e quiralidade seriam condições imprescindíveis para a atividade opióide, e isto pode ser demonstrado analisando-se o fato de que nos derivados de morfina somente isômeros levógiros apresentam atividade analgésica (Korokolvas e Burckhalter, 1988).

Estudos farmacológicos demonstraram que (-) eserolina (Fig. 11a), apresenta atividade analgésica superior a de (-) morfina (Fig. 11b) e a comparação das estruturas moleculares destes dois compostos indica que (-) eserolina apresenta todos os requisitos estruturais necessários para desencadear a atividade analgésica (Fürst et al, 1982; Galli et al, 1982; Schonenberger et al, 1986).

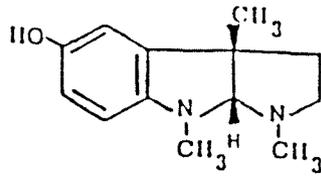
Partindo dos pressupostos acima relacionados para que uma droga atue no SNC como um analgésico opióide, Carvalho (1993) comparou, através de modelos moleculares, as estruturas de alcalóides indolínicos com as estruturas de (-) morfina e (-) eserolina, e sugere que dentre os alcalóides pirroloindolínicos que têm configuração absoluta conhecida, somente meso-chimonatina (Fig. 11c) e hodkinsina (Fig. 11d) apresentam as exigências estruturais necessárias para se ligarem a receptores opióides.

Durante o estudo fitoquímico foi isolado das folhas de *Psychotria colorata* (vide Apêndice) o alcalóide calicantina. Apesar do baixo rendimento deste alcalóide, foi possível testá-lo no teste de Tail Flick para verificar se o composto apresentava atividade analgésica, além de orientar a tentativa de novos isolamentos. Os resultados obtidos no ensaio farmacológico (Fig. 12) e a comparação das estruturas moleculares, segundo a análise acima, apontando a calicantina com impedimento estérico indicaram a impossibilidade deste composto estar envolvido com a atividade analgésica apresentada pela espécie vegetal em estudo.

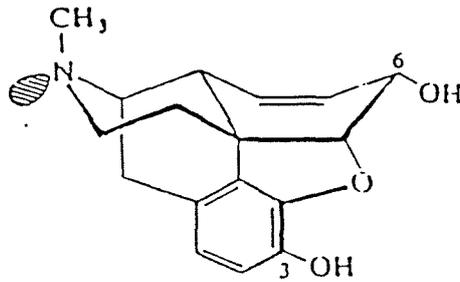
As análises mais recentes da mistura de alcalóides das flores, (investigada nos ensaios neuroquímicos), através de espectros de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), indentificaram a presença de vários alcalóides pirrolidinoindolínicos, incluindo o trímero hodkinsina, que contém uma unidade

indolínica sobreponível a (-) eserolina, um dos compostos que pode estar relacionado com a ativação de receptores opióides, desencadeando o efeito analgésico.

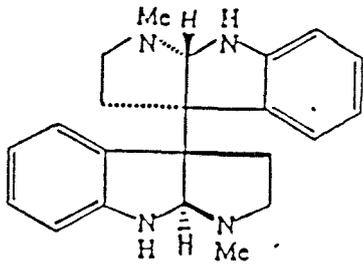
Estes dados complementam a observação dos ensaios *in vivo* e *in vitro* apresentados neste trabalho e corroboram a idéia de que os alcalóides de *Psychotria colorata* se constituem numa fonte de moléculas com potencial ação analgésica do tipo opióide. O isolamento, a caracterização completa das estruturas químicas e avaliação neurofarmacológica destes compostos, proporcionarão o esclarecimento da sua utilidade clínica e se estes são capazes de oferecer vantagens sobre os compostos atualmente em uso na terapêutica analgésica.



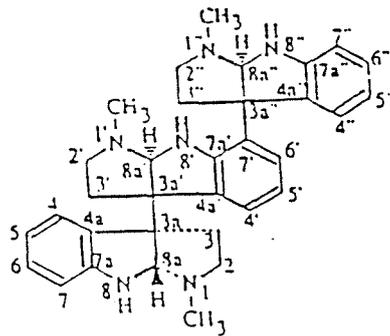
a. (-)eserolina



b. (-)morfina

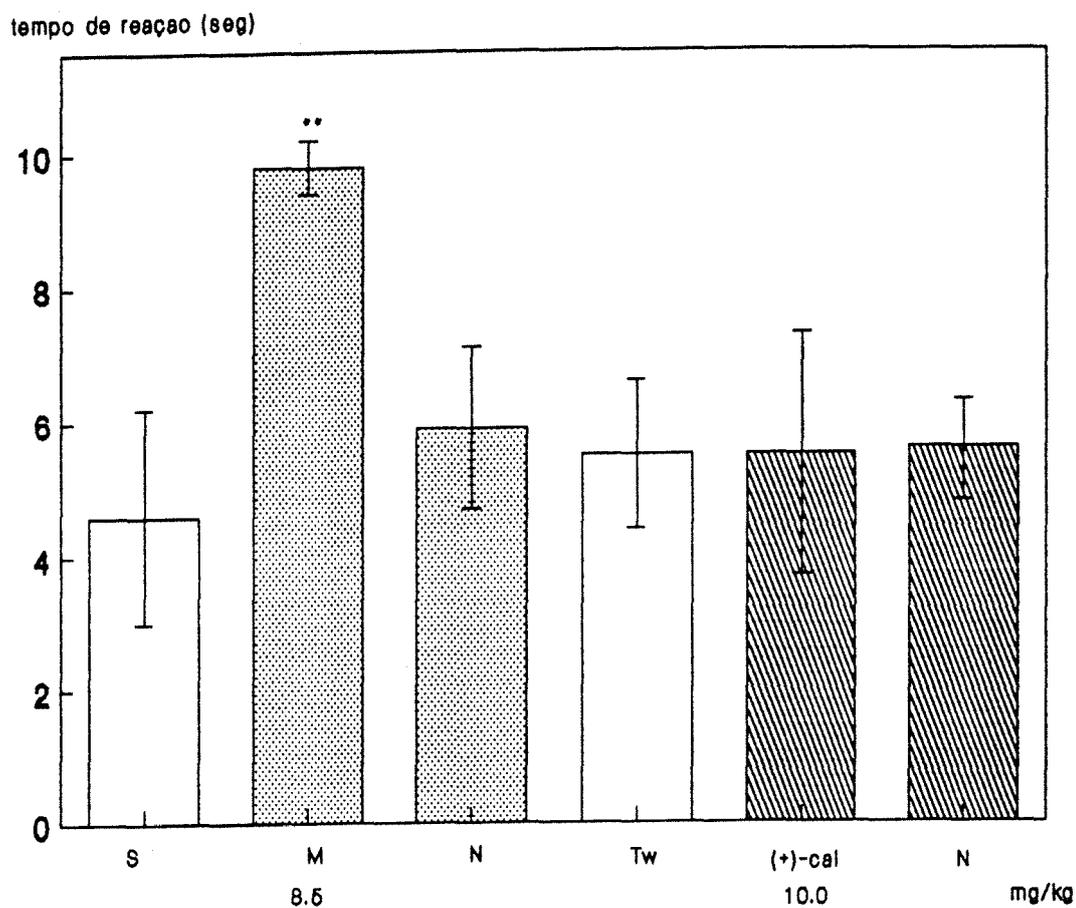


c. meso-chimonantina



d. hodkinsina

**Figura 11:** Fórmula estrutural de: a. (-)eserolina; b. (-)morfina; c. meso-chimonantina; d. hodkinsina



**Figura 12:** Comparação dos efeitos de morfina com o alcalóide (+)-calicantina no teste de Tail Flick. Salina n = 6; Morfina n = 8; Tween n = 6; (+)-calicantina n = 9; Naloxone n = 6. As barras representam o EPM. \* =  $p < 0.05$  - ANOVA/DMS comparação com salina  
S = salina; M = morfina; N = naloxone; Tw = tween; (+)-cal = (+)-calicantina.

## **V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## V.1. Conclusões

A busca de novos compostos bioativos que tenham potencial utilidade na clínica médica, ou que sirvam de modelos para a síntese de novos compostos úteis terapeuticamente, ou ainda, como ferramenta para estudos que levem à compreensão dos sistemas fisiológicos, cumpre um papel importante dentro das ciências biológicas. A otimização desta procura, através de metodologias que direcionem corretamente a pesquisa, é de fundamental importância, principalmente dentro das universidades brasileiras. O método etnofarmacológico têm apresentado resultados positivos neste contexto, já que facilita a seleção de espécies e a orientação da pesquisa.

O conhecimento popular pode ser testado e os resultados químicos, farmacológicos e neuroquímicos apresentados neste trabalho reafirmam a relevância deste conhecimento para direcionar esse tipo de pesquisa.

A espécie *Psychotria colorata*, como outras espécies deste gênero, se mostrou uma fonte de alcalóides que podem ser aproveitados para as pesquisas de opióides, visto que os alcalóides desta planta apresentam atividade analgésica reversível por naloxone e que os dados neuroquímicos preliminares, indicaram que eles inibem a união específica de [<sup>3</sup>H]Naloxone e parcialmente a atividade de AC, o que provavelmente constitui a base neuroquímica para a atividade *in vivo*.

## V.2. Perspectivas

Os parâmetros neuroquímicos avaliados neste trabalho precisam ser melhor padronizados com a obtenção das constantes de afinidade e "binding" máximo. Em relação ao ensaio da união específica de opióides, há necessidade do uso de agonistas marcados radioativamente.

Os demais parâmetros relacionados a atividade opióide (atividade de AC, união específica de GMP-PNP) necessitam ser padronizados especificamente para a pesquisa de opióides.

O isolamento dos alcalóides proporcionará a possibilidade de conhecer qual(is) de fato é(são) os alcalóides responsável(is) pela atividade analgésica e o seu mecanismo de ação, através da inibição da união específica opióide com os agonistas de subtipos de receptor ( $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ ).

## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABBOTT, F. V. and YOUNG, S. N. Effect of 5-hydroxytryptamine precursors on morphine analgesia in the formalin test. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 31, n. 4, p. 855-860, 1988.
- ACKERNECTT, E. H. Primitive medicine and culture pattern. *Bull. Hist. Med.*, v. 12, n. 4, p. 545-574, 1942.
- ADJIBADÉ, Y.; KUBALLA, B.; CABALION, P. and ANTON, R. A new alkaloid from *Psychotria forsteriana*. *Planta Medica*, v. 6, p. 523, 1986.
- ADJIBADÉ, Y. Pharmacognosie du *Psychotria forsteriana* A. Gray (RUBIACEAE) - Aspects Botanique, Chimique et Essais Pharmacologiques Preliminares. Université Louis Pasteur de Strasbourg I, Paris, *Tese de Doutorado*, 1989.
- ADJIBADÉ, 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.
- ADJIBADÉ, Y.; WENIGER, B.; QUIRION, J. C.; KUBALLA, B.; CABALION, P. and ANTON, R. Dimeric alkaloids from *Psychotria forsteriana*. *Phytochemistry*. v. 31, n. 1, p. 317-319, 1992.
- AMARASINGHAM, R. D.; BISSET, N. G.; MILLARD, A. H.; WOODS, M. C. A phytochemical survey of Malaya. Part III. Alkaloids and Saponins. *Econom. Bot.*, p. 270-278, 1964.

AMOROZO, C. and GELY, A. Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo Amazonas, Barcarena, PA, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, Série Botânica, v. 4, p. 47-132, 1988.

ARBAIN, D.; CANON, J. R.; AFRIASTINI; KARTAWINATA, K.; DJAMAL, R.; BUSTARI, A.; DHARMA, A.; ROSMAWATY; RIVAL, H.; ZAHERMAN; DASRIL, B.; SJAFAR, M.; SJAIFUL; NAWFA, R. and KOSELA, S. Survey of some west Sumatran plants for alkaloids. *Econom. Bot.*, v. 43, n. 1, p. 73-78, 1989.

BARREIRO, E. J. Produtos Naturais Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Fármacos. *Química Nova*, v. 13, n.1, p. 29-30, 1990.

BERETZ, A.; ROTH-GEORGER, A.; CORRE, G.; KUBALLA, B.; ANTON, R. and CAZENAVE, J. P. Polyindolinic alkaloids from *Psychotria forsteriana* potent inhibitors of the aggregation of human platelets. *Planta Medica*, v. 4, p. 300-303, 1985.

BROWNSTEIN, M.J. Neuropeptides. IN: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W. and Molinoff, P. B. (Eds.). *Basic Neurochemistry*, 5ª ed., Raven Press, New York, p. 341-366, 1994.

BRUHN, J. G. The use of natural products in modern medicine. *Acta Pharm. Nord*, v. 1, n. 3, p. 117-130, 1989.

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

CHILDERS, S. R.; Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sci.*, v. 48, p. 1991-2003, 1991.

CORDELL, G. A.; SHAMA, M.; SAXTON, J. E.; SMITH, G. F. IN: *Dictionary of alkaloids*. Southon, I. W. and Buckingham, J. (Eds.), New York, v. 4, 1989.

CORRÊA, M. P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, v. 2, p.420, 1931.

CRUCIANI, R. A.; DVORKIN, B.; MORRIS, S. A, CRAIN, S. M. and MAKMAN, M. H. Direct coupling of opioid receptors to both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding proteins in F-11 neuroblastoma-sensory neuron hybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, p. 3019-3023, 1993.

De MELLO, J. E. B. Deflagrando a produção de matéria prima. *Rev. Bras. de Tecnol.*, v. 18, p. 32-33, 1987.

De SMET, P. A. G. M. and RIVER, L. A general outlook on ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.*, v. 25, p.127-138, 1989.

EISNER, T. Chemical prospecting: A proposal for action. IN: Borman, F. H. and Kellert, S. R. (eds). *Ecology Economics and Ethics: The Broken Circle*, Yale University Press, New Haven, CT, p. 196-202, 1992.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. IN: *Suma Etnológica Brasileira*, Darcy Ribeiro (ed.), v. Etnobiologia, c. 8, p. 135-140, 1985.

ELISABETSKY, E. New directions in Ethnopharmacology. *J. Ethnobiol.*, v. 6, n. 1, p. 121-128, 1986.

ELISABETSKY, E. e POSEY, D. A. Pesquisa etnofarmacológica e recursos naturais no trópico úmido: o caso dos índios Kayapo do Brasil e suas implicações para a ciência médica. IN: EMBRAPA/CPAT (Eds.). *Anais do I Simpósio do Trópico Úmido, Documentos*, v. 36, p. 85-94, 1986.

ELISABETSKY, E. and GELY, A. Plantes médicinales utilisées en Amazonie comme fond pontential de nouveaux agents thérapeutiques dans les cas d'allergie, thrombose, et inflammation. *J. d'Agricult. Tradit. et de Botan. Appliq.*, v. 36, p. 143-151, 1987.

ELISABETSKY, E. and CASTILHOS, Z. C. Plants used as analgesics by Amazonian Caboclos as a basis for selecting plants for investigation. *Int. Crude Drug Res.*, v. 28, n. 4, p. 309-320, 1990.

ELISABETSKY, E. and SHANLEY, P. Ethnopharmacology in the brazilian Amazonian. *Pharmacol. Therap.*, v. 64, p. 201-214, 1994.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; ALBUQUERQUE, R. R.; NUNES, D. S. and CARVALHO, A. C. T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. *J. Ethnopharmacol.*, v. 48, p. 77-83, 1995.

FARNSWORTH, N. R. and MORRIS, R. W. Higher plants - the sleeping giant of drug development. *Am. J. Pharmacol. Educ.*, v. 148, p. 46-52, 1976.

FARNSWORTH, N. R. and PEZZUTO, J. M. Regional approaches to the development of plant derived drugs. **Anais do Segundo Simpósio Nacional de Farmacologia e Química de Produtos Naturais**, Editora Universitária, João Pessoa, Brasil, p. 35-64, 1983.

FERREIRA, S. H. Aspirinas X Dor. Como funcionam estas drogas. **Ciência Hoje**, v.3, p.57-62, 1985.

FLOWER, R. J.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Substâncias Antiinflamatórias e Analgésicas- Antipiréticas; Drogas Empregadas no Tratamento da Gota. IN: Gilman, A. G.; Goodman, L. S.; Rall, T. W. e Murad, F. (Eds.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 7 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 443-469, 1987.

FONG, H. H. S.; TROJANKOVA, M.; TROJANEK, J.; FARNSWORTH, N. R. Alkaloid screening II. **Lloydia**, v. 35, n.2, p. 117-149, 1972.

FÜRST, S.; FRIEDMANN, T.; BARTOLINI, A.; BARTOLINI, R.; AIELLO-MALMBERG, P.; GALLI, A.; SOMOGYI, G. T. and KNOLL, J. Direct evidence that eseroline possesses morphine-like effects. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 83, p. 233-241, 1982.

FÜRST, S.; GYIRES, K. and KNOLL, J. Analgesic profile of Rimazolium as compared to different classes of pain killers. **Drug Res.**, v. 381, n. 4, p. 552-557, 1988.

GALLI, A.; RENZI, G.; GRAZZINI, E.; BARTOLINI, R.; AIELLO-MALMBERG, P. and BARTOLINI, A. Reversible inhibition of acetylcholinesterase by eseroline, an agonist structurally related to physostigmine (eserine) and morphine. **Biochem. Pharmacol.**, v. 31, n. 7, p. 1233-1238, 1982.

GERETTI, G. The Pharmaceutical Industry and Dependence in the Third World. **Princeton University Press**, XIV, Princeton, New Jersey, 1983.

GEREZ, J. C. C. e PEDROSA, D. E. O. Produção de fármacos, questão de sobrevivência. **Rev. Bras. Tecnol.**, v. 18, p. 14-17, 1987.

GOTTLIEB, O. R. e KAPLAN, M. A. C. Amazônia: tesouro químico a preservar. **Ciência Hoje**, v. 11, n. 61, 1990.

GRENAND, P.; MORETTI, C. and JACQUEMIN, H. IN: **Pharmacopées traditionnelles en Guyane**. Edition de l'Orston, Paris, p. 379-382, 1987.

GRAEFF, F. G. **Drogas Psicotrópicas e seu Modo de ação**. Editora Pedagógica e Universitária, São Paulo, 2<sup>a</sup> ed., p. 85-99, 1989.

GUÉRITTE-VOEGELEIN, F.; SÉVENET, T.; PUSSET, J.; ADELIN, M. T.; GILLET, B.; BELOEIL, J. C.; GUÉNARD, D.; POTIER, P.; RASOLONJANAHARY, R. and KORDON, C. Alkaloids from *Psychotria oleoides* with activity on growth hormone release. **J. Nat. Prod.**, v. 55, n. 7, p. 923-930, 1992.

- HARTLEY, T. J.; DUNSTONE, E. A.; FITZGERALD, J. S. JOHNS, S. R. and LAMBERTON, J. A. A survey of New-Guinea plants for alkaloids. *Lloydia*, v. 36, n. 3, p. 217-239, 1973.
- HOLMSTEDT, B. and BRUHN, J. G. Ethnopharmacology - a challenge. *J. Ethnopharmacol.*, v. 8, n.3, p. 251-256, 1983.
- HOLMSTEDT, B. Historical perspective and future of ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.*, v. 32, p. 7-24, 1991.
- HUNSKAAR, S. and HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v. 30, p. 103-114, 1987.
- IZQUIERDO, I. and NETTO, C. A. The brain  $\beta$ - endorphin system and behavior: the modulation of consecutively and simultaneously processed memories. *Behav. and Neural Biology*, p. BNB2920/1 - BNB2920/17, 1985.
- JAFFE, J. H. and MARTIN, W. R. Opioid Analgesics and Antagonists. IN: Gilman, A. G.; Goodman, L. S.; Rall, T. W.; Nies, A. S. and Taylor, P. (Eds.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8<sup>a</sup> ed., Pergamon Press, New York, p. 485-521, 1990.
- JAROSZEWSKI, J. W. Natural products and drug development. *Pharmacy Int.*, v. 5, p. 27-28, 1984.
- KAWAKITA, K. and FUNAKOSHI, M. A quantitative study on the tail flick test in the rat. *Physiol. Behav.*, v. 39, p. 235-240, 1987.

- KIANG, A. K.; DOUGLAS, B. and MORSINGH, F. A phytochemical survey of Malaya, Part II. Alkaloids. *J. of Pharm. and Pharmacol.*, v. 13, p. 98-104, 1961.
- KIEFFER, B. L.; BELFORT, K.; GAVERIAUX-RUFF, C. and HIRTH, C. G. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 9, p. 12048-12052, 1992.
- KONKOY, C. S. and CHILDERS, S. R. Relationship between kappa1 opioid receptor binding and inhibition of adenylyl cyclase in guinea pig brain membranes. *Biochem. Pharmacol.*, v. 45, n. 1, p. 207-216, 1993.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. Hipnoanalgésicos. IN: *Química Farmacêutica*, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, p.159-180, 1988.
- LAJIS, N. H.; MAHMUD, Z. and TOIA, R. F. The alkaloids of *Psychotria rostrata*. *Planta Medica*, v. 59, p. 383-384, 1993.
- LASAGNA, L. Pain and its management. *Hospital Practice*, v. 15, p. 92C-92W, 1986a.
- LASAGNA, L. The management of pain. *Drugs*, v. 32, supl. 4, p. 1-7, 1986b.
- LEAL, M. B. Estudo psicofarmacológico de espécies de *Psychotria* (Rubiaceae) do Estado do Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, *Dissertação de Mestrado*, 1994.

LEE, C. Y.; AKERA, T.; STOLMAN, S. and BRODY, T. M. Saturable binding of dihydromorphine and naloxone to rat brain tissue in vitro. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 194, n. 3, p. 583-592, 1975.

LESLIE, F. M. Methods used for the study of opioid receptor function. *Endocrine Rev.*, v. 39, n. 3, p. 197-249, 1987.

LIBOT, F.; MIET, C.; KUNESCH, N. POISSON, J. E.; PUSSET, J. and SÉVENET, T. Rubiacées D'Océanie: alkaloids de *Psychotria oleoides* de Nouvelle-Calédonie et de *Calycodendron milnei* du Vanatu (Nouvelle-Hébrides). *J. Nat. Prod.*, v. 50, n. 3, p. 468-473, 1987.

LORD, J. A. H.; WATERFIELD, A. A.; HUGHES, J. and KOSTERLITZ, H. W. Endogenous opioid peptides: Multiple agonist and receptors. *Nature*, v. 267, p. 495-499, 1977.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. and RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAHMUD, Z.; MUSA, M.; ISMAIL, N. and LAJIS, N. H. Cytotoxic and bacteriocidal activities of *Psychotria rostrata*. *Int. J. Pharmacog.*, v. 31, n. 2, p. 142-146, 1993.

MALAISSÉ, F.; GREGOIRE, J.; NYEMBO, L. and ROBBRECHT, E. A propos D'Une recherche d'alkaloïds dans les Rubiaceae du Shaba Méridional (Zaire). *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.*, v. 49, p. 165-177, 1979

- MALONE, M. H. The pharmacological evaluation of natural products - general and specific approaches to screening ethnopharmacologicals. *J. Ethnopharmacol.*, v. 8, p. 127-147, 1983.
- MARTIN, W. R.; EADES, C. G.; THOMPSON, J. A.; HUPPLER, R. E. and GILBERT, P. E. The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 197, p. 517-532, 1976.
- McEWEN, B. S. Endocrine Effects on the Brain and Their Relationship to Behavior. IN: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W. and Molinoff, P. B. (Eds.). *Basic Neurochemistry*, 5<sup>a</sup> ed., Raven Press, New York, p. 1003-1024, 1994.
- MENENDEZ, L.; ANDRES-TRELLES, F.; HIDALGO, A. and BAAMONDE, A. Involvement of spinal k opioid receptors in a type of footshock induced analgesia in mice. *Brain Res.*, v. 611, p. 264-271, 1993.
- NETTO, C. A.; SIEGRIED, B. and IZQUIERDO, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effects of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav. and Neural Biology*, v. 48, p. 304-309, 1987.
- NUNES, D. S. Chemical approaches to the study of ethnomedicines. IN: Balick, M. J.; Elisabetsky, E and Laird, S. A. (Eds.) *Medicinal Resources of the tropical forest - Biodiversity to human health*. Columbia University Press, New York, p. 41-47, 1995.

OLSON, G. A. OLSON, R. D. and KASTIN, A. J. Endogenous Opiates: 1992. *Peptides*, v. 14, p. 1339-1378, 1993.

PARIS, R. and NOTTHIS, A. *Sur quelques plantes de Nouvelle-Calédonie dans Matière médicale et phytothérapie*. Tome III, v. 4, p. 274-287, 1969.

PAZ, M. M.; RAMOS, M.; RAMIREZ, G. and SOUZA, D.O. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum. *FEBS Lett.*, v. 355, p. 205-208, 1994.

PERT, C. B. and SNYDER, S. H. Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science*, v. 179, p. 1011-1014, 1973.

PHILLIPSON, J. D. and ANDERSON, L. A. Ethnopharmacology and western medicine. *J. Ethnopharmacol.*, v. 25, p. 61-72, 1989.

PRINCIPE, P. P. The economics and significance of plants and their constituents as drugs. IN: Wagner, H., Hikino, H. and Farnsworth, N. R. (Eds.). *Economic and Medicinal Plant Research*, Academic Press, New York, v. 3, p. 1-17, 1989.

RAMABADRAN, K.; BANSINATH, M. TURDORF, H. PUIG, M. M. Tail immersion test for the evaluation of a nociceptive reaction in mice. Methodological considerations. *J. Pharmacol. Meth.* v. 21, p. 21-23, 1989.

- RIVIER, L. and LINDGREN, J. E. "Ayahuasca", the South American hallucinogenic drink: an ethnobotanical and chemical investigation. *Econom. Bot.*, v. 26, p. 101-129, 1972.
- ROTH, A.; KUBALLA, B.; CABALION, P. and ANTON, R. Preliminary study of the alkaloids of *Psychotria forsteriana*. *Planta Medica*, v. 3, p. 289, 1985.
- SCHONENBERGER, B.; JACOBSON, A. E.; BROSSI, A.; STREATY, R.; KLEE, W. A.; FLIPPEN-ANDERSON, J. L. and GILARDI, R. Comparison of (-)eseroline with (+)eseroline and dihidroseco analogs in antinociceptive assays: confirmation of rubreserine structure by X-ray analysis. *J. Med. Chem.*, v. 29, n. 11, p. 2268-2273, 1986.
- SCHULTES, R. E. and RAUFFAUF, R. F. In: *The Healing forest medicinal and toxic plants of the Northwest Amazonia*. Dioscorides Press (ed.), Portland, 1990.
- SIMON, E. J.; HILLER, J. M. and EDELMAN, I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic 3H-etorphine to rat brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 70, p. 1947-1949, 1973.
- SIMON, E. J. and HILLER, J. M. Opioid Peptides and Opioid Receptors. IN: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W. and Molinoff, P. B. (Eds.). *Basic Neurochemistry*, 5<sup>a</sup> ed., p. 321-339, Raven Press, New York, 1994.
- SIMONDS, W. F. The molecular basis of opioid receptor function. *Endocrine Rev.*, v. 9, n. 2, p. 200-212, 1988.

- SMOLENKSZY, S. J.; SILINIS, H. and FARNSWORTH, N. R. Alkaloid screening VII. *Lloydia*, v. 37, n. 5, p. 411-441, 1975.
- SOUZA, D. O. and RAMIREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. *J. Mol. Neurosci.*, v. 3, p. 30-45, 1991.
- STEIN, C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Anesth. Analg.*, v. 76, p. 182-191, 1993.
- SVENDSEN, A. B. and SCHEFFER, J. J. C. Natural products in therapy: prospects, goals and means in modern research. *Pharmaceutish Weekblad Scientific Edition*, v. 4, p. 93-103, 1982
- SWEETNAM, P. M.; CALDWELL, L.; LANCASTER, J.; BAUER JR, C.; McMILLAN, B.; KINNIER, W. J. and PRINCE, C. H.. The role of receptor binding in drug discovery. *J. Nat. Prod.*, v. 56, n. 4, p. 441-455, 1993.
- TERENIUS, L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, v. 32, p. 317-320, 1973.
- TOVEY, K. C.; OLDHAM, K. G. and WHELAM, J. A.M. A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. *Clin. Chem. Acta*, v. 56, p. 221-234, 1974.

WAGNER, J. J. and CHAVKIN, C. I. Neuropharmacology of Endogenous Opioid Peptides. IN: Bloom, F. E. and Kupfer, D. J. (Eds.). ***Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress***, Raven Press, New York, p. 519-529, 1995.

WANNMACHER, L. e FERREIRA, M. B. Farmacologia Clínica da Dor. IN: Fuchs, F.D. e Wannmacher, L. (Eds.). ***Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional***, 1<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.133-148, 1992.

WILLAMAN, J. J. and SCHUBERT, B. G. Alkaloid bearing plants and their contained alkaloids. Washington, ARS, USDA, ***Supt. Documents, Govt Print Off, Tech Bull 1234***, 1961.

WOLLEMAN, M.; BENYHE, S. and SIMON, J. The Kappa-Opioid Receptor: Evidence for the Different Subtypes. ***Life Sci.***, v. 52, p. 599-611, 1993.

YASUDA, K.; RAYNOR, K.; KONG, H.; BREDER, C. D.; TAKEDA, J.; REISINE, T. and BELL, G. I. Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, v.90, p. 6736-6740, 1993.

## VI.1. Trabalhos Publicados

Elisabetsky, E.; Amador, T. A.; Albuquerque, R. R.; Nunes, D. S. and Carvalho, A. C. T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. S.) Muell. Arg. alkaloids. *Journal of Ethnopharmacol.*, v. 48, p. 77-83, 1995.

Amador, T. A.; Elisabetsky, E. and Souza, D. O. Effects of *Psychotria colorata* alkaloids in brain opioid system. *Neurochemical Research*, v. 21, (1), p. 97-102, 1996.

## APÊNDICE

## Evolução do Estudo Fitoquímico de *Psychotria colorata*

Com o objetivo de confirmar o uso tradicional e encontrar as substâncias responsáveis pelo efeito indicado, foi realizado um estudo fitoquímico aprofundado de *Psychotria colorata*.

As análises fitoquímicas preliminares foram feitas com extratos obtidos pela seguinte sequência de solventes de polaridade crescente: hexano, éter etílico, acetato de etila, etanol e água. Os extratos etanólico e aquoso apresentaram reação positiva para alcalóides com os reativos de Mayer, Dragendorff, Silicotunguístico e Bouchardat. Os resultados destes testes são apresentados na Tabela A1.

Tabela A1: Testes preliminares fitoquímicos para classes de compostos presentes nos extratos aquoso e etanólico de *Psychotria colorata*

| Classes de Compostos    | Extrato Aquoso |        | Extrato Etanólico |        | Reativo usado   |
|-------------------------|----------------|--------|-------------------|--------|---|
|                         | Folhas         | Flores | Folhas            | Flores |   |
| ácidos orgânicos        | -              | -      | -                 | -      | Pascová   |
| açúcares redutores      | +              | +      | +                 | +      | Fehling   |
| alcalóides terciários   | +              | +      | -                 | +      | D, B, M, St   |
| alcalóides quaternários | +              | +      | +                 | +      | D, B, M, St   |
| catequinas              | -              | -      | -                 | -      | vanilina 1%, HCl conc.  |
| flavonóides             | -              | -      | -                 | -      | HCl conc., fita de Mg   |
| lactonas                | -              | -      | -                 | -      | cloridrato de hidroxilamina, KOH 10% em MeOH, HCl 1N e FeCl <sub>3</sub> 1% |

D=Dragendorff, B=Bouchardat, M=Mayer, St=Silicotunguístico

O passo seguinte foi a realização da marcha para obtenção dos extratos alcaloídicos iniciais, de flores e folhas nas faixas de pH 7 e 10, a partir do extrato etanólico. A marcha de obtenção está apresentada no Esquema n° 1.

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD), mostraram que os extratos alcaloídicos em pH 7 e pH 10 eram diferentes entre si, mas que não havia diferença qualitativa entre as substâncias dos extratos de folhas e flores. De posse deste resultado, optou-se por utilizar as folhas para o preparo dos extratos para os estudos mais aprofundados, visto que as flores não são encontradas durante todo o ano e quando o são não apresentam quantidade suficiente para a realização dos extratos.

Os testes de toxicidade aguda com estes extratos, indicaram uma alta toxicidade dos extratos obtidos a pH 10. Por este motivo, o extrato alcaloídico pH 7 de folhas (EA pH 7 FH) foi escolhido para as análises subsequentes.

Nesta etapa realizou-se o fracionamento de EA pH 7 FH, por cromatografia "flash" em sílica. Entretanto a técnica não se mostrou produtiva quanto ao rendimento das frações, o que levou a busca de um sistema mais adequado.

A solução encontrada para incrementar a extração dos alcalóides foi alcalinizar as folhas antes da extração com EtOH. O monitoramento em CCD, mostrou não haver alteração na composição em relação aos extratos anteriores.

A obtenção do extrato alcaloídico de folhas alcalinizadas e suas frações, está representada no Esquema n° 2, seguindo os passos abaixo:

- (a) extração com EtOH em Soxhlet.
- (b) marcha alcaloídica (como no Esquema n° 1).
- (c) CCPD em sílica gel.
- (d) CC em sílica gel.
- (e) CC em alumina  $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}:\text{MeOH}$ . CCPD em sílica gel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{NH}_4\text{OH}$ .
- (f) CC em sílica gel  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$

(g) CC em silica gel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH

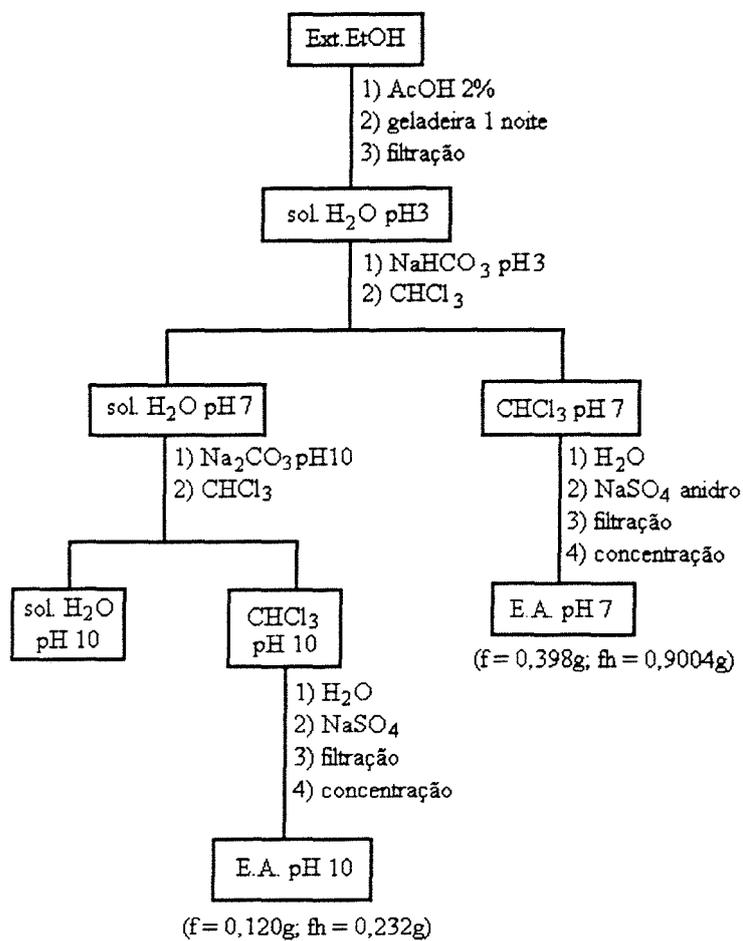
(h) CCPD em alumina 60 HF254 básica Et<sub>2</sub>O:hexano:MeOH

Foram obtidos extratos alcaloídicos pH 7, pH10 e pH 10E (este obtido a partir da emulsão formada na extração). As diferenças entre os extratos pH 7 e pH 10 foram novamente confirmadas, enquanto que o extrato pH 10E continha componentes de ambos.

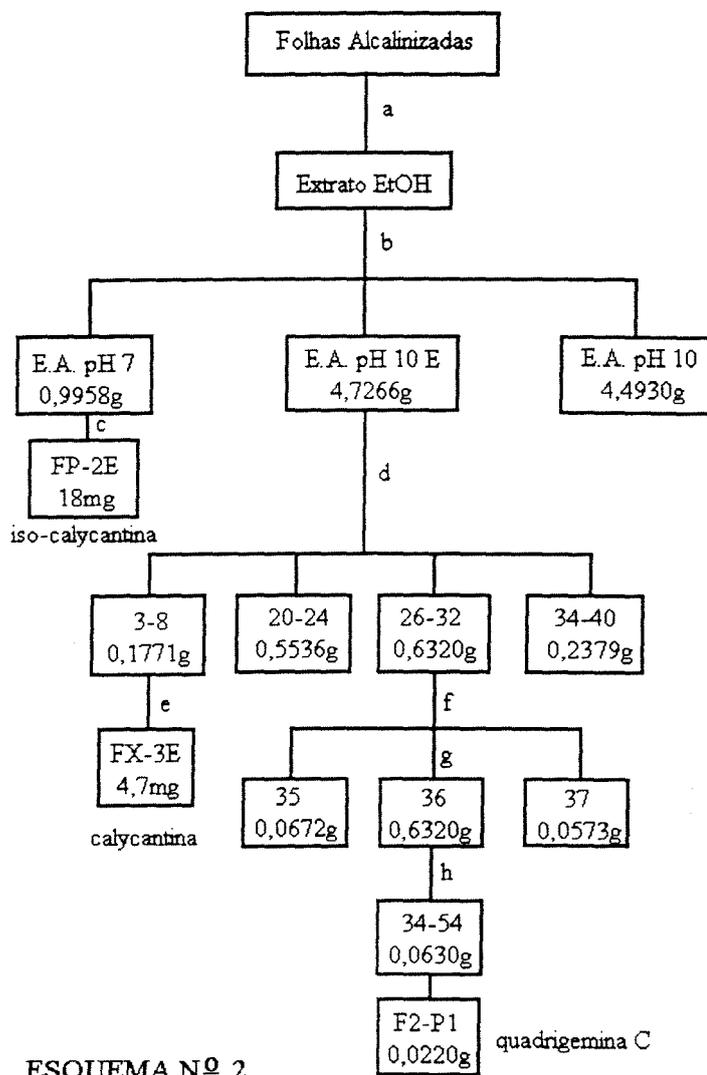
O extrato alcaloídico pH 10E foi fracionado com o seguinte sistema eluente: MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH. Este extrato foi selecionado para fracionamento com base na sua composição, visto que apresentava aproximadamente 50% dos mesmos componentes do EA pH 7 e por haver indícios analíticos que apontavam para uma razoável separação por métodos cromatográficos.

Das frações obtidas pelo Esquema n° 2, somente foram trabalhadas as frações 26-32, 36 e 34-54. As frações 20-24 e 26-32, mostraram-se idênticas quando analisadas por CCD, mas não quando submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fração 34-40 apresentou em CCD analítica, além dos componentes do extrato alcaloídico pH 7, componentes do extrato pH 10, o que conferiu um grau indesejável de toxicidade nos experimentos farmacológicos, além de baixo rendimento. Estes fatores determinaram a concentração dos estudos monitorados somente com as frações 20-24 e 26-32.

Entre as análises realizadas para a identificação dos compostos isolados de *Psychotria colorata*, foram feitas RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C. Segundo estas análises foram isolados quadrigemina C (F2-P1); iso-callicantina (FP-2E) e outro sugerido como sendo callicantina (FX-3E).



ESQUEMA N<sup>o</sup> 1



ESQUEMA Nº 2