

Avaliação da atividade analgésica de extratos alcaloídicos de espécies de *Psychotria*

Both, F. L.¹, Farias, F. M.², Nicoláo, L. L.¹, Misturini, J.¹, Henriques, A. T.², Elisabetsky, E. E.¹

¹Laboratório de Etnofarmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500 Porto Alegre/RS CEP 900450-170, Brasil. ²Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752 Porto Alegre/RS CEP 90610-000, Brasil, elisasky@vortex.ufrgs.br.

RESUMO: Os estudos etnofarmacológicos abrangem 10% das espécies de *Psychotria* conhecidas e foram realizados com plantas de diferentes origens geográficas, mostrando que elas são utilizadas na medicina tradicional para uma grande variedade de indicações terapêuticas, incluindo tratamento de dores de ouvido e calmante de dores abdominais. Dando continuidade ao estudo do gênero *Psychotria* quanto a seus aspectos fitoquímicos e atividade biológica, extratos alcaloídicos de diferentes espécies de *Psychotria* (*P. pubigera*, *P. nuda* e *P. myriantha*), foram avaliados quanto a atividade analgésica em camundongos, através da análise da resposta ao estímulo térmico no aparelho da placa quente. O único extrato que apresentou atividade analgésica foi o de *P. myriantha* Müell. Arg. na dose de 200 mg/kg. O extrato alcaloídico de *P. pubigera* mostrou-se altamente tóxico, com 100% de letalidade nas doses de 50 e 150 mg/kg. O dado é de interesse por sugerir forte atividade biológica, indicando a conveniência de se isolar os compostos para melhor avaliação de seu perfil farmacológico. Os dados são discutidos no contexto da associação de etnofarmacologia com quimiotaxonomia na busca de novos analgésicos que unam eficácia e menores efeitos adversos.

Palavras-chave: Rubiaceae, analgesia, alcalóides, plantas medicinais

ABSTRACT: Evaluation of analgesic activity of alkaloid extracts of *Psychotria* species. Ethnopharmacological studies cover 10% of the *Psychotria* species known, and were carried out with plants of different geographic origins, showing that they are used in traditional medicine for a great diversity of therapeutic indications, including treatment of earache and for calming abdominal pain. In this study of the genus *Psychotria* with regard to its phyto-chemical aspects and biological activity, alkaloid extracts of various species of *Psychotria* (*P. pupigera*, *P. nuda*, and *P. myriantha*) were evaluated for analgesia with the hot plate model. The only extract presenting analgesic activity was that of *P. myriantha* Müell. Arg., at the dose of 200mg/kg. The alkaloid extracts from *P. pupigera* were highly toxic, with 100% lethality with doses of 50 and 150 mg/kg. These data are interesting because they suggest strong biological activity, indicating the convenience of isolating the compounds for better evaluation of its pharmacological profile. The data are discussed in the context of associating the ethno-pharmacology and the chemo-taxonomy in the search for new analgesics.

Key words: alkaloids, analgesic activity, medicinal plants.

INTRODUÇÃO

Psychotria (Rubiaceae) é um dos maiores gêneros das angiospermas. Sua delimitação é incerta, incluindo, segundo alguns autores, até 2000 espécies (Nepokroeff *et al.*, 1999), distribuídas nos extratos arbustivos das matas tropicais (Roth *et al.*, 1985). Com base em suas características morfológicas, *Psychotria* foi dividida em 3 subgêneros: *Psychotria* (pantropical), *Tetrameræ* (incluindo espécies Africanas e de Madagascar) e *Heteropsychotria* (incluindo as espécies restantes de *Psychotria*, neotropical).

O gênero é caracterizado principalmente pela presença de alcalóides polindolínicos derivados da condensação de várias unidades N-metiltriptamina. Este grupo de metabólitos caracteriza o subgênero *Psychotria*. Diversas espécies nativas do sul do Brasil, do subgênero

Heteropsychotria, foram analisadas e apresentam alcalóides indólicos monoterpênicos (Lopes, 1998; Kerber, 1999; Lopes, 2000).

A única espécie brasileira que apresentou alcalóides do grupo pirrolidínico foi *Psychotria colorata* Müell. Arg. (Verotta *et al.*, 1998), tradicionalmente usada como analgésica por caboclos da Amazônia (Elisabetsky & Castilhos, 1990; Elisabetsky *et al.*, 1995). Estudos *in vivo* (placa quente e retirada da cauda ao estímulo térmico) e *in vitro* (*binding*) demonstraram que a hodgkinsina, alcalóide isolado de *P. colorata*, apresenta atividade analgésica com duplo mecanismo de ação, envolvendo a ativação de receptores opiáceos e o antagonismo de receptores glutamatérgicos NMDA (Amador *et al.*, 2000). Outro alcalóide da mesma espécie, a psychotridina, também tem atividade analgésica, porém destituída de atividade opióide e mantendo a interação com receptores NMDA glutamatérgicos

Recebido para publicação em 24/08/01 e aceito para publicação em 12/06/02.

(Amador *et al.*, 2001). Esses dados justificaram a continuidade da busca por novos compostos analgésicos em espécies de *Psychotria*, numa abordagem que associa etnofarmacologia com quimiotaxonomia na busca de novos compostos analgésicos (Elisabetsky *et al.*, 1997).

Espécies de *Psychotria* nativas do Estado do Rio Grande do Sul (*P. leiocarpa*, *P. myriantha*, *P. suterella*, *P. brachyceras*, *P. umbellata* e *P. carthagenensis*) foram investigadas quanto a toxicidade e ao efeito analgésico de seus extratos etanólicos em camundongos. Na avaliação da analgesia, na qual foi utilizado o ensaio da retirada da cauda ao estímulo térmico, o extrato de *P. umbellata* foi o único a apresentar atividade dose-dependente e reversível pela prévia administração de naloxona, enquanto *P. leiocarpa*, *P. myriantha*, *P. suterella* e *P. brachyceras* demonstraram uma atividade não dose-dependente e não reversível por naloxona (Leal, 1994; Leal & Elisabetsky, 1996). Estudos fitoquímicos posteriores com *P. umbellata* demonstraram a presença de quatro alcalóides indol-monoterpênicos, sendo umbelatina a substância majoritária (Kerber, 1999). Atividade analgésica dose-dependente e parcialmente reversível por naloxona foi encontrada com umbelatina utilizando modelos de dor com estímulos térmicos (placa quente e teste da retirada da cauda ao estímulo térmico) e químicos (capsaicina e formalina), sugerindo a ativação de receptores opióides e a participação do sistema glutamatérgico (Both, 2001, Both *et al.*, 2001).

Dando continuidade a esta linha de pesquisa, e considerando os estudos preliminares com extratos etanólicos brutos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade analgésica dos extratos alcaloídicos de *P. pubigera*, *P. nuda* e *P. myriantha*.

MATERIAL E MÉTODO

Material Vegetal

Partes aéreas de *P. nuda* e *P. pubigera*, foram coletadas no município de Blumenau (SC) e *P. myriantha*, na reserva florestal do Turvo, município de Derrubadas (RS) ambas em março de 2000, e identificadas por Marcos Sobral sob número de coleta 8911 para *P. pubigera*, 8913 para *P. nuda* e 9044 para *P. myriantha*. Uma exsicata de cada espécie foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ainda sem número).

Extração de alcalóides

As folhas secas e trituradas de *P. nuda*, *P. myriantha* e *P. pubigera* foram maceradas em uma mistura de etanol/amônia 2% até o

esgotamento do material vegetal e os extratos etanólicos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório (Rotavapor) a temperatura de 40° C. Para *P. myriantha* e *P. nuda*, os extratos foram concentrados e, então, retomados em ácido clorídrico a 5%, obtendo-se os alcalóides na forma de cloridrato, os quais foram extraídos com diclorometano para a remoção das impurezas. As fases orgânicas foram desprezadas e as fases aquosas alcalinizadas a pH=10 com hidróxido de amônio para liberar os alcalóides na forma de base. Posteriormente as fases aquosas foram extraídas com diclorometano. Os extratos orgânicos obtidos foram concentrados até a secura (40°C) para a obtenção dos alcalóides totais. Para *P. pubigera*, o macerado etanólico foi acidificado e, posteriormente, extraído em extrator líquido-líquido com diclorometano, devido à formação de uma emulsão persistente após a alcalinização.

Os extratos alcaloídicos resultantes foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando um cromatógrafo Alliance, constituído por módulo de separação Waters 2690 e detector PDA (Photodiode Array) Waters 996. Para a análise do perfil cromatográfico de *P. nuda* e *P. pubigera*, foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (5µm, 150 x 3.9mm – Waters Nova Pak) eluída com uma mistura de metanol:água e metanol, de acordo com a Tabela 1. Para *P. myriantha*, empregou-se uma coluna C8 (5µm, 250 x 4mm – Merck), com o mesmo sistema eluente variando gradativamente de 100% de A a 100% de B em trinta minutos.

TABELA 1: Sistema gradiente para a análise de espécies de *Psychotria*.

Fluxo (ml/min)	tempo (min)	A %	B %
1	0	100	0
1	5	100	10
1	15	0	100
1	20	0	100

Eluente A = metanol:água 40:60 V/V

Eluente B = metanol

Farmacologia

Animais

Foram utilizados camundongos albinos machos da cepa CF1 do FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em saúde). Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Farmacologia, após o desmame (21 dias) e usados com 2 a 3 meses (30-35 g). Os animais foram mantidos à 22±2°C, ciclo de luz de 12 horas (das 7 às 19 horas), e com água e comida *ad libitum*.

Quarenta e cinco minutos antes dos

experimentos, os animais foram individualmente colocados em caixas de acrílico (20 x 20 x 20 cm), as quais também serviram para observação. Este período de habituação visa reduzir o comportamento exploratório (aumento de movimento) e fator novidade, conhecido por liberar opióides endógenos (Netto *et al.*, 1987).

Teste da placa quente

A metodologia adotada foi adaptada de Woolfe e Mac Donald (1944) e Eddy *et al.* (1950). Os animais foram submetidos ao aparelho desligado (1 min para cada animal) durante habituação nas caixas de acrílico individuais. Foram realizadas duas medidas na placa quente ($55,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$), uma medida basal (pré-droga) e outra após administração das drogas (pós-droga). O teto máximo de resposta foi estabelecido como 30 seg e os animais que na medida pré-droga ultrapassaram 12 seg não foram usados no experimento. Os animais foram colocados sobre a placa quente e o tempo despendido entre a colocação do animal no aparelho e a lambida da pata traseira ou salto foram tomadas como latência de resposta. Os tratamentos (salina 0,9%, Tween 80, morfina 6mg/kg e extratos alcaloídicos de *P. pubigera* 25 mg/kg, *P. nuda* 50 e 100 mg/kg e *P. myriantha* 130 e 200 mg/kg) foram administradas i.p. imediatamente após a medida basal e 30min após foi feita a medida pós-droga. Os dados são apresentados com % de Efeito Máximo Possível (% EMP), obtido através da seguinte fórmula: $\% \text{ EMP} = \frac{T_1 - T_0}{T_2 - T_0} \times 100$, onde T_1 = média pós-droga, T_0 = média pré-droga, T_2 = teto máximo do experimento (10 seg) (Gardmark *et al.*, 1998). A análise estatística utilizada em todos os experimentos envolveu análise de variância (ANOVA), seguida de Student Newman Kewus (SNK).

RESULTADO

O rendimento dos extratos de alcalóides totais de *P. myriantha*, *P. nuda* e *P. pubigera* foi de 0.080%, 0.077% e 0.076%, respectivamente.

A análise por CLAE/PDA dos extratos das 3 espécies permitiu verificar a presença de diversos alcalóides que apresentaram cróforo característico para indóis terpênicos ou estendido para β - carbolínicos, grupo este já caracterizado anteriormente em espécies da região sul do Brasil (Lopes, 1998; De Santos, 1999; Kerber, 1999; Lopes, 2000). Nota-se a ausência total de cróforo característico para pollindolinas.

A análise de *P. myriantha* demonstrou a presença de alcalóides com grupamento cróforo indólico e β -carbolínico, sendo que foi

possível observar a presença de um alcalóide majoritário.

Na análise cromatográfica do extrato de *P. nuda* verificou-se somente a presença de alcalóides do tipo indólico.

A análise por CLAE/PDA de *P. pupigera* apresentou um alcalóide majoritário, e foram evidenciados cromóforos do tipo indólico e β -carbolínicos.

Os resultados da avaliação dos extratos alcaloídicos de *P. myriantha*, *P. nuda* e *P. pubigera* no teste da placa quente são apresentados como % EMP (Figura 1). O único extrato que apresentou atividade analgésica na dose de 200 mg/kg (i.p.), comparável à morfina 6 mg/kg (i.p.) foi o de *P. myriantha*. Complementando dados preliminares de nosso laboratório obtidos com extrato etanólico bruto, o extrato alcaloídico de *P. myriantha* apresentou atividade analgésica, aparentemente dose-dependente e ganho de atividade já que o extrato etanólico bruto desta espécie só apresentou atividade no teste de retirada ao estímulo térmico com a dose de 350 mg/kg.

O extrato de *P. nuda* não apresentou atividade no modelo da placa quente. O extrato alcaloídico de *P. pupigera* mostrou-se altamente tóxico, com 100% de letalidade nas doses de 50 e 150 mg/kg.

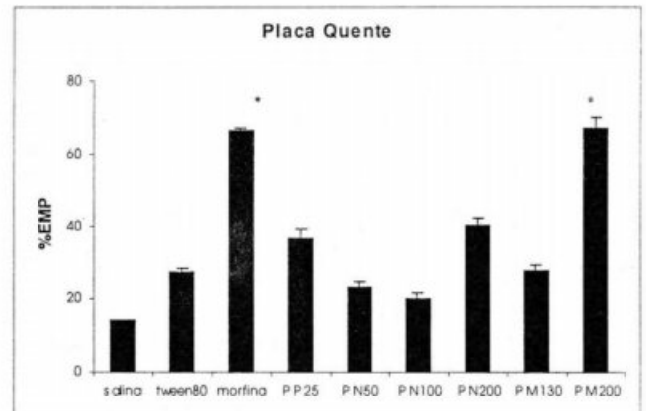


FIGURA 1: Efeito de extratos alcaloídicos de *P. pubigera* (PP), *P. nuda* (PN) e *P. myriantha* (PM) no teste da placa quente em camundongos. PP25 = *P. pubigera* 25 mg/kg, PN50 e PN100 = *P. nuda* 50 e 100 mg/kg e PM130 e PM200 = *P. myriantha* 130 e 200 mg/Kg. Colunas representam % EMP (média \pm EP, N = 6-7). * = $p < 0,05$, ANOVA/SNK.

DISCUSSÃO

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 da morfina motivou a descoberta de outros compostos farmacologicamente ativos como a codeína. Uma série de outros compostos podem ser citados para reforçar a importância da pesquisa de produtos naturais como fonte de novos compostos terapêuticos: quinina, ácido acetil salicílico, atropina e os alcalóides vimblastina e vincristina (Svendsen e Scheffer, 1982).

Os opióides continuam sendo a classe mais importante dentre estes fármacos, e diversos compostos com propriedades farmacológicas semelhante a estes foram desenvolvidos nestes últimos anos. A busca foi centralizada principalmente na possibilidade de se encontrar analgésicos que mantivessem a mesma eficácia no tratamento da dor com menos efeitos indesejáveis (Prado, 1999).

A espécie *Psychotria myriantha*, como outras espécies deste gênero, se mostrou uma fonte de alcalóides que podem ser aproveitados para as pesquisas de opióides, incentivando a busca de novos compostos bioativos que tenham potencial utilidade na clínica médica ou ainda que sirvam de modelos para a síntese de novos compostos, que venham ser aproveitados terapêuticamente.

Novos estudos com *P. myriantha* são necessários para definir a reversão por naloxona e melhor definir o perfil de atividade analgésica. Estes resultados justificam o isolamento dos alcalóides para realização de novos experimentos.

A elevada toxicidade encontrada com o extrato alcaloídico de *P. pupigera* é um dado de interesse por sugerir forte atividade biológica, indicando a conveniência de se isolar os compostos para melhor avaliação de seu perfil farmacológico.

A metodologia etnofarmacológica, bem direcionada e coerentemente interpretada, aliada a quimiotaxonomia têm dado provas de que pode ser a mais eficaz estratégia na procura de novas drogas de origem vegetal (Gottlieb, 1982). Diversas espécies do gênero *Psychotria*, um gênero botânico rico em plantas usadas tradicionalmente na medicina popular, tem se mostrado importante fonte de compostos bioativos (Elisabetsky *et al.*, 1997).

AGRADECIMENTO

Este trabalho foi financiado pelo CNPq (bolsas EE, AH, JM, LN e FF), CAPES (bolsa FB), e FAPERGS (auxílio 00/0582.8).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AMADOR, T.A., VEROTTA, L., NUNES, D.S. *et al.* Antinociceptive profile of hodgkinsine. **Planta Medica**, v.66, p.770-2, 2000.
- AMADOR, T.A., VEROTTA, L., NUNES, D.S. *et al.* Involvement of NMDA receptors in the analgesic properties of psychotridine. **Phytotherapy**, v.8, p.202-6, 2001.
- BOTH, F.L. **Avaliação da atividade analgésica do alcalóide umbelatina isolado de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae)**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001, Porto Alegre.
- BOTH, F.L., KERBER, V.A., HENRIQUES, A.T. *et al.* Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata* (Vell.). **Pharmaceutical Biology**. *submitted*, 2001.
- EDDY, N.B., TOUCHBERRY, C.S., LIEBERMAN, J.E. Sintetyc analgesic. I. Methadone isomer and derivatives. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.98, p.121-37, 1950.
- ELISABETSKY, E., AMADOR, T.A., ALBUQUERQUE, R.R. *et al.* Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex r. & s.) M. Arg. alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**, v.48, p.77-83, 1995.
- ELISABETSKY, E., AMADOR, T.A., LEAL, M.B. *et al.* Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: an approach to unveil bioactive natural products. The case of *Psychotria* alkaloids as potential analgesics. **Ciência e Cultura**, v.49, n.5/6, p.378-85, 1997.
- ELISABETSKY, E., CASTILHOS, Z.C. Plants used as analgesics by Amazonian caboclos as a basis for selecting plants for investigation. **International Journal of Crude Drug Research**, v.28, n.4, p.49-60, 1990.
- GARDMARK, M., HÖGLUND, A., HAMMARLUND-UDENAES, M. Aspects on tail-flick, hot-plate and electrical stimulation tests for morphine antinociception. **Pharmacology & Toxicology**, v.83, p. 252-58, 1998.
- GOTTLIEB, O.R. Ethnopharmacology versus Chemosystematics in Search for Biologically active Principles in Plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.6, p.227-38, 1982.
- KERBER, V.A. **Análise dos alcalóides de *Psychotria brachyceras* Mull.Arg. e *P. umbellata* Vell., e o estabelecimento e caracterização de cultura de células de *P. umbellata* Vell.** 1999. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- LEAL, M.B. **Estudo psicofarmacológico de espécies de *Psychotria* (Rubiaceae) do Estado do Rio Grande do Sul**. 1994. p. 30-32. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- LEAL, M.B., ELISABETSKY, E. Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.54, n.1, p.37-40, 1996.

- LOPES, S.O. **Análise química e cultivo in vitro de Psychotria leiocarpa Cham. Et. Schlecht. E Psychotria carthagenensis Jacq. (Rubiaceae).** 1998, p.15-17 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- LOPES, S.O., MORENO, P.R.H., HENRIQUES, A.T. Growth Characteristics and Chemical Analysis of *Psychotria carthagenensis* Cell Suspension Cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.259-64, 2000.
- NETTO, C.A., SIEGRIED, B., IZQUIERDO, I. Analgesia Induced by exposure to a novel environment in rats: Effect of concurrent and post-training stressful stimulation. **Behavioral and Neural Biology**, v.48, p.304-9, 1987.
- PRADO, W.A., GRAEFF, F., GUIMARÃES, G.F.S. **Fundamentos de psicofarmacologia: medicamentos analgésicos de ação central.** São Paulo: Atheneu, 1999. p.175-95.
- SANTOS, L.V. **Psychotria suterella Müell. Arg.:** caracterização dos alcalóides, análise farmacológica e cultivo "in vitro" de calos e raízes. 1999. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SVENDSEN, A.B., 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.
- VEROTTA, L., PILATI, T., TATO, M. *et al.* Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Psychotria colorata*. **Journal of Natural Products**, v.6, n.3, p.392-6, 1998.
- WOOLFE, G., MAC DONALD, A.D. The evaluation of analgesic action of petidine hydrochloride (Bemerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.80, p.300-7, 1944.