

MIRIAM ELIZABETH MENDES ANGELUCCI

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA PLANTA TÓXICA**  
*Pseudocalymma elegans* (VELL.) KUHLM.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de "Doutor em Ciências", área de concentração em Odontologia e sub-área de Farmacologia.

Piracicaba  
1999

3916247



MIRIAM ELIZABETH MENDES ANGELUCCI

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA PLANTA TÓXICA**  
*Pseudocalymma elegans* ( VELL.) KUHLM.

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 21/06/99

  
Assinatura do Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de "Doutor em Ciências", área de concentração em Odontologia e sub-área de Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen - FOP - UNICAMP

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha - UFPR

Piracicaba  
1999

### Ficha Catalográfica

An43c

Angelucci, Miriam Elizabeth Mendes.

Caracterização farmacológica da planta tóxica *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhm. / Miriam Elizabeth Mendes Angelucci. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.

183f. : il.

Orientadores : Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Prof. Dr. Cláudio da Cunha.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Plantas venenosas. 2. Memória. I. Rosalen, Pedro Luiz. II. Cunha, Cláudio da. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.



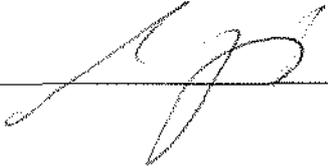
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



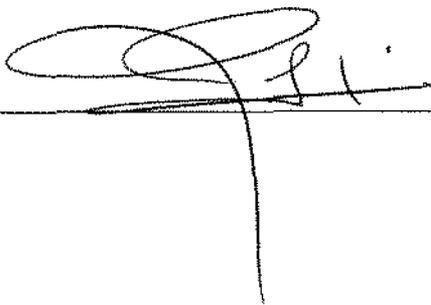
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 10 de Fevereiro de 1999, considerou a candidata MIRIAM ELIZABETH MENDES ANGELUCCI aprovada.

1. Prof. Dr. PEDRO LUIZ ROSALEN 

2. Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO LEITE 

3. Profa. Dra. SILVANA LIMA GORNIAC 

4. Prof. Dr. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO 

5. Prof. Dr. JOSE RANALI 

## RESUMO

Neste trabalho estudamos os efeitos farmacológicos do extrato bruto e de alguns compostos isolados da planta tóxica *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhl. Verificamos que vários dos sintomas observados no gado bovino intoxicado com a planta, como: inquietude, tremores e convulsões, foram também vistos em camundongos, onde a DL<sub>50</sub> do extrato foi estimada em 1,8 g / kg. Em camundongos, doses elevadas do extrato foram convulsivantes e doses subletais melhoraram a memória para algumas tarefas de aprendizagem, reduziram o comportamento exploratório, aumentaram o tempo de catatonia e causaram efeitos ansiogênicos. Foram estudados os efeitos de frações e compostos isolados da planta. Observamos que os efeitos estimulantes sobre o SNC se concentram nas frações mais polares do extrato. Porém, o efeito convulsivante e letal da planta só foi observado com a administração conjunta destes compostos polares, sugerindo um sinergismo entre eles. Com o objetivo de melhor caracterizar a farmacologia da planta estudamos também outros compostos anteriormente isolados da planta. Entre eles a alantoína e a triumboídina não apresentaram os principais efeitos característicos do extrato. Um outro composto, a sorbarina, um flavonóide glicosilado, melhorou a memória de ratos quando administrada diretamente no hipocampo dorsal (bilateral) de ratos. O núcleo flavonóide deste composto conhecido como escutelareína, segundo a literatura apresenta os mesmos efeitos celulares que as metilxantinas, ou seja, são antagonistas dos receptores da adenosina e inibem a fosfodiesterase, mecanismos importantes na fisiologia da inibição de longa duração (LTD) um modelo celular de aprendizagem e memória. A metilxantina cafeína foi, portanto, estudada como um modelo de droga com mecanismo semelhante ao da sorbarina. A cafeína causou uma melhora na consolidação da memória quando estudada nas tarefas de habituação, esquiava inibitória e labirinto aquático de Morris. Ela também causou uma melhora na evocação da segunda tarefa e uma piora na aquisição das duas primeiras. Concluímos que a planta *P. elegans* causa uma estimulação do SNC de mamíferos por uma ação conjunta de compostos polares, podendo também melhorar a memória por uma ação de compostos que, como a sorbarina, interferem com os mecanismos celulares da formação e evocação de memórias.

## ABSTRACT

In the present investigation we studied the pharmacological effects of the crude extract and some compounds isolated from the toxic plant *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhl. Most of the signs observed in cattle intoxicated with the plant: excitement, tremors, and seizures were reproduced in mice receiving an extract of the plant. The LD<sub>50</sub> of the ethanolic extract to mice was estimated as 1.8 g/kg. Doses near the LD<sub>50</sub> induced seizures in mice while lower doses improved memory, reduced exploratory behavior, increased catalepsy time and caused anxiogenic effects. The toxic compounds of the plant were concentrated in the most polar fractions of the plant extract. The convulsant and lethal effects of the plant were observed only when a pool of these polar compounds was administered to mice, suggesting a synergistic interaction between them. We also studied the pharmacological effect of compounds that were previously isolated from the plant. Beside these compounds, allantoin and tryumboidin did not present any effect. Another compound, the glycosylated flavonoid sorbarin, proved to cause a memory improving effect when administered into the dorsal hippocampus of rats. The aglicone of sorbarin, scutelarein, has the same mechanisms of action as the methyl-xanthines, acting as an adenosine receptor antagonist and inhibiting the phosphodiesterase enzyme, effects proved to be important in a cellular substrate of memory called long-term depression (LTD). Caffeine, a methyl-xanthine, was studied as a model of drug with the same mechanism of action as sorbarin. Caffeine improved memory consolidation of the Morris water maze (MWM) task, inhibitory avoidance (IA) and habituation to a new environment (HAB). Caffeine also improved the evocation of MWM and IA and impaired the acquisition of IA and HAB. In summary, our results suggest that the plant *P. elegans* has CNS stimulant effects as a result of a conjunct effect of polar compounds. These compounds, as well as sorbarin may also modulate memory processing.

Dedico este trabalho ao meu Deus e Pai  
Celestial.

Pela vida plena e abundante.

Pelas pessoas criadas por Ele que me  
acompanharam nesta jornada.

Pela natureza, entre as quais a  
*Pseudocalymma elegans*.

Pelos animais, dentre eles os de  
experimentação.

Pela Ciência, que se multiplicará.

Por tudo isto e muito mais...

Aos meus pais Neusa e Mário,  
dádivas de Deus,  
pelo amor, incentivo e carinho.  
À amiga e irmã Hilda Maria,  
pela ajuda, apoio, carinho e amizade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, pela orientação e amizade sincera em Cristo Jesus.

Ao Prof. Dr. Cláudio da Cunha, pela inestimável orientação, ensino, trabalho conjunto, amizade e pelo seu precioso tempo, bem como de sua família.

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do Magnífico Reitor: Prof. Dr. Hermano de Medeiros Ferreira Tavares.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba por meio de seu Diretor: Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP, por meio de seu chefe Prof.<sup>a</sup> . Dr.<sup>a</sup> Maria Cristina Volpato e demais colegas, pelo grande incentivo e amizade.

À Coordenação Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP, por meio de sua coordenadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Altair Antoninha Del Bel Cury.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de Farmacologia, por meio de seu coordenador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen.

Às colegas de curso Elisabeth Maria Lúcio e Elisabete Míriam Corrêa pelo companheirismo, auxílio constante e amizade construída no decorrer do curso.

À família Santos que com tanto carinho me hospedou em Piracicaba, pela colaboração e amizade.

À Sra. Izaura Boemgen pela hospedagem carinhosa em São Paulo e amizade.

À Maria Elisa dos Santos pela amizade e colaboração no decorrer de todo o curso.

À Marilene Girello, bibliotecária da FOP - UNICAMP, pela ficha catalográfica.

À Universidade Federal do Paraná, por meio do Magnífico Reitor: Prof. Dr. Carlos Roberto Antunes do Santos.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação, por meio do Pró-Reitor Prof. Dr. Waldemiro Gremski e da funcionária Jussara do Rego Elias por seu atendimento sempre pronto.

Ao Setor de Ciências Biológicas, por meio do Diretor Prof. Dr. Oldemir Carlos Mangili e Vice - Diretor Dr. Marcelo Jacomini.

Ao Departamento de Farmacologia, por meio de seu chefe Profa. Dra. Roseli Boerngen de Lacerda e demais colegas pela compreensão, companheirismo e apoio constante.

Aos professores do Setor de Ciências Biológicas: Anete Curte Ferraz, Estela M. Arruda Muñoz, Dr. Hidevaldo B. Machado, Nelson de Mello, Roberto Andreatini e Dra. Maria A. B. F. Vital pela preciosa ajuda nos testes comportamentais, estatística, bibliografia, além do estímulo e companheirismo.

Aos biólogos Ilza R. Batista e Clerson Cesário e aos acadêmicos Reinaldo H. Hiroi, Gefferson A. Freitas e Patricia M. Reder, pela grande ajuda nos testes comportamentais e solidariedade.

À farmacêutica Sílvia N. Cordazzo e a laboratorista Lindacir R. do Nascimento, que além da amizade, foram responsáveis, respectivamente, pelo preparo de soluções e ajuda nos testes comportamentais.

Aos professores da UFPR Dra. Tomoe Nakashima, Dr. Brás H. de Oliveira, Dra. Fany Reicher, pela ajuda na análise fitoquímica, fracionamento e determinação de açúcares, respectivamente, além da amizade crescente.

Aos pesquisadores Dr. Jürgen Döbereiner e Dr. Carlos H. Tokarnia pela preciosa colaboração na escolha, coleta e envio do material botânico *P. elegans*.

Ao Dr. H.C. Krebs pelo envio dos princípios isolados da planta *P. elegans*: sorbarina, triumfoidina e alantoína e ao Dr. Bruce Kassels pela tentativa de isolar os princípios ativos do extrato de *P. elegans*.

Às bibliotecárias do Setor de Ciências Biológicas, especialmente Ruth L. dos Santos, Isabela E. Fernandes e Telma T.S. de Assis, pelo auxílio na bibliografia e amizade.

À CAPES, PICDT, devido a bolsa recebida.

À minha querida família pelo estímulo.

Aos queridos irmãos da Comunidade Evangélica de Curitiba pela solidariedade.

A todos aqueles que, de alguma forma, ajudaram nesta caminhada.

“Junto ao rio, às ribanceiras, de um e de outro lado, nascerá toda sorte de árvore que dá fruto para se comer; não fenecerá a sua folha, nem faltará o seu fruto; nos seus meses, produzirá novos frutos, porque as suas águas saem do santuário; o seu fruto servirá de alimento, e a sua folha de remédio.”

Ezequiel 47:12

## SUMÁRIO

	P
Lista de tabelas.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de anexos.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xv
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	7
3. Proposições.....	23
4. Materiais e Métodos.....	24
5. Resultados.....	46
6. Discussão .....	137
7. Conclusões.....	145
8. Anexos.....	146
9. Referências Bibliográficas.....	163

## LISTA DE TABELAS

	P
Tabela i: Esquema de administração de drogas.....	37
Tabela 01: Atividade biológica de extratos de planta <i>P.elegans</i> .....	47
Tabela 02: Rendimento do fracionamento do extrato bruto da planta <i>P.elegans</i> em uma coluna de sílica gel e efeitos de cada fração.....	48
Tabela 03: Rendimento e efeitos comportamentais do fracionamento da fração J da planta <i>P.elegans</i> em uma coluna de Sephadex LH-20.....	57
Tabela 04: Análise fitoquímica do extrato etanólico 20% de <i>P.elegans</i> .....	58
Tabela 05: Análise fitoquímica do extrato aquoso 20% de <i>P.elegans</i> .....	59
Tabela 06: Caracterização química da fração J-III.....	60
Tabela 07: Alterações comportamentais induzidas pela administração do extrato bruto II da planta <i>P.elegans</i> em camundongos.....	67
Tabela 08: Alterações neurológicas, autonômicas e toxicológicas induzidas pela administração do extrato bruto II da planta <i>P.elegans</i> em camundongos.....	69
Tabela 09: Alterações induzidas pela administração da fração J-III da planta <i>P.elegans</i> em camundongos.....	70
Tabela 10: Efeitos de compostos isolados da planta <i>P.elegans</i> sobre o comportamento de camundongos e ratos.....	73

## LISTA DE FIGURAS

	P
Figura 01: <i>Pseudocalymma elegans</i> .....	3
Figura 02: Brotação roxa <i>Pseudocalymma elegans</i> .....	5
Figura 03: Cromatografia em sílica gel dos extratos da planta <i>P. elegans</i> .....	49
Figura 04: Cromatografia da fração polar da planta <i>P. elegans</i> (fração J) em Sephadex LH-20.....	53
Figura 05: Recromatografia da fração J-III da planta <i>P. elegans</i> em Sephadex LH-20	55
Figura 06: Cromatografia bidimensional da fração J-III .....	61
Figura 07: Espectro de ultra-violeta da fração J-III da planta <i>P. elegans</i> .....	65
Figura 08: Dose letal mediana do extrato bruto da planta <i>P. elegans</i> .....	72
Figura 09: Efeito da administração i.p. do extrato de <i>P. elegans</i> após as sessões de treino na tarefa da habituação a um ambiente novo - levantar.....	77
Figura 10: Efeito da administração i.p. do extrato de <i>P. elegans</i> após as sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo - ambulacão.....	79
Figura 11: Efeito da administração i.p. do extrato bruto da planta <i>P. elegans</i> imediatamente após a sessão de treino sobre a retenção da tarefa de esquiva inibitória.....	83
Figura 12: Efeito da administração i.p. da fração J-III da planta <i>P. elegans</i> , imediatamente após a sessão de treino, sobre a retenção da tarefa de esquiva inibitória.....	85
Figura 13: Efeito da administração i.p. de alantoína 30 min. antes das sessões de treino na tarefa da habituação a um ambiente novo - ambulacão.....	87

Figura 14: Efeito da administração i.p. alantoína 30 min antes das sessões de treino na tarefa da habituação a um ambiente novo - levantar.....	89
Figura 15: Efeito da administração de 7 µg/lado de sorbarina, alantoína, triumboídina ou veículo no hipocampo dorsal de ratos, após a sessão de treino, sobre a habituação a um ambiente novo - levantar.....	93
Figura 16: Efeito da administração de bilateral de 7 µg/lado de sorbarina, alantoína, triumboídina ou veículo no hipocampo dorsal de ratos, após a sessão de treino, sobre a habituação a um ambiente novo - ambulação.....	95
Figura 17: Efeito da administração bilateral de 7 µg/lado de sorbarina, alantoína ou veículo no hipocampo dorsal de ratos, após a sessão de treino, sobre a retenção da tarefa da esquiava ativa de duas vias.....	97
Figura 18: Efeito da administração i.p. da cafeína após as sessões de treino na tarefa da habituação a um ambiente novo - ambulação.....	99
Figura 19: Efeito da administração i.p. de cafeína após as sessões de treino na tarefa da habituação a um ambiente novo - levantar.....	103
Figura 20: Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes das sessões de treino na tarefa da habituação a um ambiente novo - ambulação.....	105
Figura 21: Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes das sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo - levantar.....	107
Figura 22: Efeito da administração i.p. da cafeína 30 min antes da sessão de treino sobre a retenção da tarefa de esquiava inibitória.....	111
Figura 23: Efeito da administração i.p. da cafeína imediatamente após a sessão de treino sobre a retenção da tarefa de esquiava inibitória.....	113

Figura 24: Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de teste sobre a retenção da tarefa de esquiiva inibitória.....	<b>115</b>
Figura 25: Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de treino e 30 min antes da sessão de teste sobre a retenção da tarefa de esquiiva inibitória.....	<b>117</b>
Figura 26: Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de treino na tarefa do labirinto aquático de Morris - latência.....	<b>119</b>
Figura 27: Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de treino na tarefa do labirinto aquático de Morris - distância.....	<b>123</b>
Figura 28: Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de treino na tarefa do labirinto aquático de Morris - velocidade de natação.....	<b>125</b>
Figura 29: Efeito da administração i.p. de cafeína imediatamente após a sessão de treino na tarefa do labirinto aquático de Morris - latência.....	<b>127</b>
Figura 30: Efeito da administração i.p. de cafeína imediatamente após a sessão de treino na tarefa do labirinto aquático de Morris - distância.....	<b>131</b>
Figura 31: Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de teste na tarefa do labirinto aquático de Morris - latência.....	<b>133</b>
Figura 32: Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de teste na tarefa do labirinto aquático de Morris - distância.....	<b>135</b>

## LISTA DE ANEXOS

	P
Anexo 01: Extração fracionada com Solventes.....	146
Anexo 02: Preparação do Extrato Bruto II.....	147
Anexo 03: Protocolo do Teste Hipocrático de Malone.....	149
Anexo 04: Protocolo do Teste Hipocrático de Irwin.....	150
Anexo 05: Efeito da administração do extrato bruto II da planta <i>P. elegans</i> sobre o comportamento de camundongos em um campo aberto...	153
Anexo 06: Efeito da administração do extrato bruto II da planta <i>P. elegans</i> sobre o comportamento de camundongos em um labirinto em cruz elevado.....	154
Anexo 07: Efeito da administração do extrato bruto II da planta <i>P. elegans</i> sobre o comportamento de camundongos na atividade locomotora espontânea.....	155
Anexo 08: Efeito da administração do extrato bruto II da planta <i>P. elegans</i> sobre o tônus muscular de camundongos.....	156
Anexo 09: Efeito da administração de compostos isolados da planta <i>P.</i> <i>elegans</i> sobre o comportamento de camundongos em um campo aberto.....	157
Anexo 10: Efeito da administração de compostos isolados da planta <i>P.</i> <i>elegans</i> sobre o comportamento de camundongos em um labirinto em cruz elevado.....	158
Anexo 11: Efeito da administração de compostos isolados da planta <i>P.</i> <i>elegans</i> sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos.....	159
Anexo 12: Efeito da administração de compostos isolados da planta <i>P.</i> <i>elegans</i> sobre o tônus muscular de camundongos.....	160
Anexo 13: Efeito da administração de compostos isolados da planta <i>P.</i> <i>elegans</i> sobre o teste de catatonía em camundongos.....	161

Anexo 14: Alguns compostos purificados da planta *P. elegans*..... 162

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ach = acetilcolina

AMPA = ácido propiônico  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol

AP5 = ácido aminofosfoaléico

B.M. = banho maria

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = diclorometano

CPA = N6-ciclopentiladenosina

dB = decibéis

DPCPX = 3-dipropilxantina

EPM = erro padrão da média

EtOH = álcool etílico

FeCl<sub>3</sub> = cloreto férrico

Fig. = figura

GABA = ácido  $\gamma$ -aminobutírico

g = grama

h = hora (s)

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = ácido sulfúrico

HCl = ácido clorídrico

i.h. = intrahipocampal

i.p. = intraperitoneal

KHz = quilohertz

KOH = hidróxido de potássio

l = litro

LTD (“*long term depression*”) = depressão de longa duração

LTM (“*long term memory*”) = memória de longa duração

LTP (“*long term potentiation*”) = potenciação de longa duração

$\mu$ g = micrograma

$\mu$ l = microlitro

M = molar  
Mg = magnésio  
min = minuto (s)  
ml = mililitro  
NMDA = N-metil-D-aspartato  
N = normal  
NaCl = cloreto de sódio  
NaOH = hidróxido de sódio  
 $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  = sulfato de ferro amoniacal  
 $\text{NH}_4\text{OH}$  = hidróxido de amônio  
*P. elegans* = *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhlmann  
PTX = picrotoxina  
PTZ = pentilenotetrazol  
R-PIA = N6-(R-fenlisopropil)adenosina  
seg. = segundo (s)  
sol. = solução  
SNC = Sistema Nervoso Central  
STM (“*short term memory*”) = memória de curta duração  
tab. = tabela  
v.o. = via oral

## INTRODUÇÃO

A planta *Pseudocalymma elegans* (Vell) Kuhlmann é uma Bignoneaceae que ocorre na Mata Atlântica do Rio de Janeiro (fig.1). Ela tem uma distribuição geográfica restrita e é pouco conhecida pelos habitantes da região, razão pela qual não tem uma denominação popular. A brotação roxa desta planta (fig.2) provou ser tóxica para o gado bovino (MELLO & FERNANDES<sup>101</sup>,1941) e outras espécies de mamíferos, nas quais produz uma série de sintomas como a inquietude, tremores e convulsões (TOKARNIA et al.<sup>148</sup>, 1969; TAVARES et al.<sup>146</sup>, 1974; TOKARNIA et al.<sup>149</sup>, 1993). A excessiva mortalidade do gado bovino da região serrana do estado do Rio de Janeiro devido a intoxicação com a *P. elegans* (MELLO & FERNANDES<sup>101</sup>,1941) é a possível causa do processo de extinção da planta, além do fato dela requerer condições ideais para seu crescimento e multiplicação. Os sinais da intoxicação com a planta sugerem a presença de compostos estimulantes do sistema nervoso central (SNC) (MELLO & FERNANDES<sup>101</sup>,1941; TAVARES et al.<sup>146</sup>, 1974; TOKARNIA et al.<sup>149</sup>, 1993; SCHÜTZ et al.<sup>135</sup>,1996), sendo que existem muitas evidências na literatura de que estes compostos estimulantes melhoram a memória (SARTER<sup>132</sup>,1991; DA CUNHA<sup>27</sup>,1992; IZQUIERDO et al.<sup>59</sup>,1992; CASTELLANO et al.<sup>22</sup>,1993; CRUZMORALES et al.<sup>26</sup>,1993). Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório foram observados vários desses sintomas em camundongos intoxicados com o extrato da planta (SCHÜTZ et al.<sup>135</sup>,1996). Nestes estudos observou-se que estes animais apresentaram uma atividade exploratória em campo aberto reduzida, uma menor movimentação espontânea e também catatonias. Quando testados no labirinto em cruz elevado, os animais que receberam o extrato exploraram menos os braços abertos do labirinto. Estes resultados foram interpretados como indicativos de um possível efeito ansiogênico do extrato, típico de estimulantes do SNC ou, alternativamente, como um efeito sedativo (SCHÜTZ et al.<sup>135</sup>,1996). É possível que, dada a natureza complexa do extrato ele contenha compostos com ambas as atividades farmacológicas. Estudos realizados neste laboratório, demonstraram que os animais intoxicados com o extrato da planta morrem com parada respiratória e que este efeito letal é atenuado por drogas que

melhoram a respiração, como a teofilina, mas não por drogas que antagonizam o efeito convulsivante do extrato, como as benzodiazepinas (dados não publicados). Assim sendo, é provável que os compostos estimulantes do SNC presentes na planta não sejam seus principais compostos tóxicos.

**KREBS** (<sup>80</sup>1987, <sup>81</sup>1991) isolou desta planta o glicosídeo de iridóide alantoina e os glicosídeos de flavonóides sorbarina e triumboidina como seus principais constituintes. No presente trabalho os efeitos farmacológicos destes e de outros compostos, foram estudados, com um enfoque especial sobre o comportamento e a memória de roedores.

Tendo em vista as investigações já realizadas com a planta *P. elegans* (Vell) Kuhl e as hipóteses suscitadas por elas, o presente trabalho tem por objetivo geral avaliar os efeitos farmacológicos e toxicológicos gerais do extrato e compostos isolados da *P. elegans*, os efeitos comportamentais, especialmente sobre a memória, além de isolar e caracterizar química e farmacologicamente alguns compostos extraídos, comparando-os com fármacos estruturalmente relacionados.



Figura 1. Detalhe da planta *Pseudocalymma elegans* (Vell) Kuhl, flores e folhas maduras. Distrito de Seropédica, região serrana do Rio de Janeiro, Brasil.



**Figura 2.** Detalhe da planta *Pseudocalymma elegans* (Vell) Kuhl, folhas jovens (broto roxo). Distrito de Seropédica, região serrana do Rio de Janeiro, Brasil.

## REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão da literatura é uma abordagem dos últimos 50 anos de produção científica envolvendo aspectos de botânica, toxicologia e farmacologia da planta *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhl., de fármacos que melhoram a memória além dos estudos sobre neurobiologia da memória, que fazem parte dos objetivos deste trabalho, a fim de fornecer subsídios para análise dos resultados obtidos.

### **BOTÂNICA E TOXICOLOGIA E FARMACOLGIA DA PLANTA *Pseudocalymma elegans* (VELL.) KUHLM**

*Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhl., é uma planta tóxica encontrada nas encostas da Serra do Mar, entre Belém e Bonfim, no estado do Rio de Janeiro. Pertence à família Bignoniaceae e já foi classificada como *Adenocalymma elegans* Bur, nome constante hoje em sua sinonímia, e como *Pseudocalymma elegans* (Bur) Kuhl (KULHMANN<sup>82</sup>,1941). O gênero *Pseudocalymma* foi criado pelos botânicos J. Geraldo Kuhlmann e A. J. de Sampaio devido as características do fruto, que a colocava fora do genero *Adenocalymma* no qual havia sido classificada anteriormente. O gênero *Pseudocalymma* está assim descrito: “*Facies Adenocalymmae, pollinia granula trifurcata, calyce eglandulosos, capsula elongata, plana; ovula2- seriata per loculo, semina alata, coetera at Adenocalymma laevigatum* Bur et Schm in fl. Martii”(MELLO & FERNANDES<sup>101</sup>,1941).

A espécie é descrita como uma liana (trepadeira lenhosa, geralmente de tamanho grande, semelhante a um cipó) nativa da mata atlântica do Rio de Janeiro que conserva suas folhas verdes e frescas, mesmo no rigor da época da seca, quando também ocorre sua floração. Nesta época, na falta de outras espécies, principalmente forrageiras, o gado bovino encontra nela um alimento atrativo, razão pela qual ocorrem as mortes dos animais

por intoxicação (KULHMANN<sup>82</sup>,1941). O arbusto é constituído de sarmentos vigorosos na parte superior, brevemente tomentosos, ramos adultos dilatados nos nós e só aí pilosos, cilíndricos. As folhas, brevemente pecioladas, conjugadas, terminam por uma gavinha simples com que se fixa a outras plantas. Pecíolo com 10 a 12 mm de comprimento, robusto, achatado na face inferior, tomentoso, com tamanho semelhante ao pecíolo com canalículo da face anterior. A lâmina foliolar apresenta variações de comprimento (12 a 13, 10 a 15 cm) e largura (6 a 7, 5 a 7,5 cm), pouco acima do meio, oblonga ou oval oblonga terminada em acumem obtuso e guarnecida de um mucron, obtusa ou subcordata na base, glabérrima em ambas as faces. Os nervos laterais, oito aproximados na base, são promínulos na face anterior e concrecidos com os nervos transversais, na posterior, formando retículo proeminente. No ângulo das nervuras da face posterior com domácias brevemente pilosas, coriácea, concolor, as folhas simulam estípulas com 5 a 6 mm de comprimento são falsiformes, rígido-coriáceas (MELLO & FERNANDES<sup>101</sup>,1941). As folhas maduras são coriáceas; as jovens são roxas e posteriormente verdes, tenras, o que provavelmente as tornam apetitosas para o gado bovino. São exatamente estas brotações roxas que se apresentam mais tóxicas ao animais (TOKARNIA et al.<sup>148</sup>,1969).

Ramos florescentes com 35 cm de comprimento e na base 5 mm de diâmetro revestidos de indumentos de pelos simples formados de poucas células, de cor parda-escura; adultos revestidos de casca acastanhada ou cinamônea e cobertos de lentículos mais claros nos de maior revestimento e glandulosos. Inflorescência em panícula lateral subcorimbosa menor que as folhas, raquis do racimo subtomentoso com 8-10 cm de comprimento; brácteas e bractéolas mal atingindo 1 mm de comprimento, brevemente oval triangulares e pouco pilosas, de coloração parda ferrugínea: flores pediceladas, pedicelos com 5-10 mm de comprimento. Cálice tubuloso fendido em um ou outro ponto, truncado com 5 dentículos mal atingido 0,5 cm de comprimento inserido abaixo da margem ou bordo, principalmente piloso no ápice com escassas glândulas e escamas; quando seco rubescente escuro, sub-coriáceo, com 1,3 a 1,5 cm de comprimento. Corola toda amarela afunilada insensivelmente afinando-se em tubo basilar de 5 a 5,5 cm de comprimento, segmentos subtomentosos, abaixo da inserção dos estames densamente pilosos com 1,7 a 1,8 cm de comprimento. Estames salientes, sub iguais, inseridos 9-10 mm acima da base do

tubo, os menores com 3,2-3,5 cm e os maiores com 3,7-3,9 cm, estaminódio com 3-4 mm de comprimento. Disco brevíssimo de aproximadamente 0,5 mm de altura; ovário subquadrangular glabro, seco negro com 3 a 3,5 mm de comprimento (MELLO & FERNANDES<sup>101</sup>,1941). A flor da espécie é decorativa, sendo notável o contraste entre o cálice purpurescente e a corola em tom amarelo alaranjado, com estames fortemente salientes da corola (KULHMANN<sup>82</sup>,1941).

O fruto é linear, muito longo e achatado e a semente é envolta em uma asa membranácea. Foram os elementos decisivos na inclusão do novo gênero *Pseudocalymma*. As dimensões, aproximadas, do fruto são: 30-60 cm de comprimento por 2-3 de largura e 3-10 mm de espessura; as sementes têm 6-7 cm de comprimento, 1,5-2 cm de largura e 12-30 mm de espessura (KULHMANN<sup>82</sup>,1941).

A toxicidade da Planta *P. elegans* foi verificada primeiramente por MELLO & FERNANDES<sup>101</sup> em 1941, que observaram a ocorrência de óbitos de bovinos na região de Vassouras, RJ. Estes pesquisadores notaram os sinais de intoxicação em bois, cobaios e coelhos nas doses entre 0,8 a 1 g/kg do macerado da planta e os seguintes sinais que antecediam à morte: olhos angustiantes, anorexia, andar cambaleante, paraplegia, convulsões violentas e morte súbita. A toxicidade desta planta para o gado bovino foi demonstrada também por TOKARNIA et al.<sup>148</sup> em 1969. Estes autores observaram os seguintes sinais adicionais da intoxicação: andar duro com os membros posteriores abertos e instabilidade (o animal caía em posição esternal com os membros esticados para trás, convulsão iniciada com barulho ou exercícios leves, opistótono, olhos virados, nistagmo, taquicardia, respiração irregular e fezes ressequidas. Os exames histopatológicos revelaram as alterações leves e inconsistentes: degeneração vacuolar das células epiteliais dos túbulos uriníferos contornados distais, vacuolização do parênquima hepático, pequenas áreas de degeneração vacuolar e hialina incipientes e pequenos infiltrados linfo-histiocitários no miocárdio, congestão e edema das meninges. A planta apresentou-se tóxica também para coelhos, com predominância de taquipneia, e também em cobaios, com tremores musculares, movimentos de pedalagem e excitação para todos os animais. Nos achados de necrópsia do cobaios, as únicas lesões constantes foram pequenas hemorragias pulmonares, intra-alveolares (TAVARES et al.<sup>146</sup>,1974). Em caprinos também foi

verificada a toxicidade da planta, sendo os animais jovens mais sensíveis e desenvolvendo os sinais de intoxicação e morte após exercício. Os achados de necrópsia foram poucos e inconsistentes, semelhantes aos observadas em bovinos (TOKARNIA et al.<sup>149</sup>,1993). Os sinais gerais de intoxicação observados com a planta foram: dispnéia, instabilidade, relutância para andar, decúbito lateral, excitação, tremores musculares, movimentos de pedalagem e morte (TOKARNIA et al.<sup>148</sup>,1969;<sup>149</sup>1993; TAVARES et al.<sup>137</sup>1974). Foi verificado também que a planta é tóxica tanto no estado fresco quanto dessecada, sendo que esta última, pode ser mantida armazenada pelo período de seis anos sem perder significativamente suas características tóxicas (TAVARES et al.<sup>146</sup>1974).

Outras propriedades farmacológicas do extrato da planta *P. elegans* são relativamente desconhecidas, pois nos últimos vinte anos não foram encontradas demais publicações desta planta.

Segundo pesquisa realizada na literatura, o único autor que antecedeu a este trabalho e se ocupou do isolamento dos compostos presentes nesta planta foi KREBS<sup>80</sup> (1987) que isolou a alantoina, o glicosídeo de iridoide lamiide e os flavonóides sorbarina e triumboídina do extrato metanólico, como os principais compostos presentes na planta *P. elegans*. Posteriormente o mesmo autor isolou um novo iridoide glicosídeo, pseudocalymmosídeo, lamiide e durantosídeo II também do extrato metanólico (KREBS<sup>81</sup>, 1991).

A escutelareína, aglicona da sorbarina (Krebs<sup>80</sup>,1987), tem sido encontrada também em muitas plantas (GIL et al.<sup>46</sup>,1994; SANZ et.al.<sup>131</sup>,1994), e apresenta algumas propriedades semelhantes à cafeína, ou seja, antagoniza competitivamente receptores A<sub>1</sub> da adenosina (JI et al. <sup>74</sup>,1996; KARTON et al. <sup>77</sup>,1996; HASRAT et al. <sup>53</sup>,1997) e, em altas doses, inibe a enzima fosfodiesterase, além de inibir também a atividade da xantina oxidase (SANZ et.al.<sup>131</sup>,1994) e da fosfolipase A<sub>2</sub>, apresentando potente efeito antiinflamatório (GIL et al. <sup>46</sup>,1994).

A alantoina, 5-ureído-hidantoina, ricamente encontrada em plantas (PARK et al.<sup>118</sup>,1990; NAZARIO & LOVATT<sup>113</sup>,1993; WU et al.<sup>165</sup>,1994; RAJAVELU et al. <sup>125</sup>,1994) acha-se presente também no líquido alantóico, na urina do feto e outros locais (STEDMAN D.M. <sup>144</sup>,1979). É o produto de oxidação do ácido úrico e produto final do

metabolismo da purina em animais, exceto nos primatas (STEDMAN D.M. <sup>144</sup>,1979). Usada topicamente para promover a cicatrização (STEDMAN D.M. <sup>144</sup>,1979) é encontrada em muitos cosméticos (GEISE et al. <sup>45</sup>,1994).

## DROGAS QUE PODEM MELHORAR A MEMÓRIA

Existem evidências na literatura de drogas com ações excitatórias sobre o SNC que podem melhorar a memória (YONKOV & ROUSSINOV<sup>167</sup>,1983; YONKOV<sup>166</sup>,1985; SARTER<sup>132</sup>,1991; DA CUNHA<sup>27</sup>,1992; IZQUIERDO et al.<sup>59</sup>,1992; CASTELLANO et al.<sup>22</sup>,1993; CRUZMORALES et al.<sup>26</sup>,1993) porém, como estimulantes, também podem propiciar o aparecimento de convulsões (MELDRUM,<sup>100</sup>1995; BLOOM,<sup>10</sup> 1996; MELLO et al.<sup>102</sup>1986; TURSKI et al.,<sup>153</sup>1983a.; <sup>154</sup>1983b.; <sup>151</sup>1984; <sup>152</sup>1985). Convulsões são alterações transitórias do comportamento devido a ativação desordenada, sincrônica e ritmada de populações de neurônios cerebrais (McNAMARA<sup>99</sup>,1996).

Muitas drogas convulsivantes atuam como antagonistas de receptores GABAérgicos. O GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) é o principal neurotransmissor inibitório no SNC. (BLOOM<sup>10</sup>,1996). No neocórtex, hipocampo e outras estruturas límbicas e também na medula espinhal existe uma alta densidade de receptores para o GABA. Os neurônios GABAérgicos, em sua maioria interneurônios, formam nestas estruturas uma rede que exerce um efeito tônico inibitório sobre a atividade cerebral. O bloqueio deste sistema pode ser a gênese de muitas crises convulsivas (MELDRUM,<sup>100</sup>1995), sendo que também pode promover uma facilitação da memória (IZQUIERDO et al.<sup>59</sup>, 1992). A bicuculina, a picrotoxina e o pentilenotetrazol são drogas que inibem as sinapses GABAérgicas. A primeira, é antagonista competitivo do receptor GABA<sub>A</sub>. A segunda é um antagonista não-competitivo do mesmo receptor ligando-se ao seu canal de Cl<sup>-</sup> de forma direta ou em um sítio próximo a ele (BLOOM,<sup>10</sup> 1996). O pentilenotetrazol também tem seu mecanismo de ação convulsiva relacionado a uma interação com sinapses

GABAérgicas, e tem sido usado como um modelo de crise convulsiva em testes onde se avalia o potencial de drogas anticonvulsivantes para bloquear as crises por ele induzidas (MELLO et al.<sup>102</sup>1986). A bicuculina e a picrotoxina injetadas nos ventrículos cerebrais ou na amígdala são bons modelos de epilepsia de longa duração, causando, no entanto, dano cerebral (TURSKI,<sup>152</sup> et al.1985). Estas drogas quando administradas, após o treino em tarefas de habituação, em estruturas cerebrais como hipocampo, amígdala e septo medial produzem uma facilitação da memória, sugerindo uma interferência no mecanismo de consolidação (IZQUIERDO et al.<sup>59</sup>, 1992).

Outras drogas convulsivantes atuam sobre sinapses glutamatérgicas. O glutamato e o aspartato são os principais neurotransmissores excitatórios do SNC. O glutamato atua sobre receptores ionotrópicos (canais iônicos operados por ligantes) e metabotrópicos (receptores ligados à proteína G). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são classificados em receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores AMPA (ácido propiônico  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol) e receptores para cainato (BLOOM,<sup>10</sup> 1996). A capacidade do glutamato e seus análogos em produzir convulsões quando injetado no neocórtex ou em núcleos subcorticais foi descrito por Hayashi (MELDRUM,<sup>100</sup>1995). Lucas & Newhouse (MELLO et al.<sup>102</sup>1986) verificaram também que injeção sistêmica de agonistas de receptores ionotrópicos do glutamato podem causar degeneração neuronal, um fenômeno conhecido como excitotoxicidade (OLNEY et al., 1972 in MELLO et al.<sup>102</sup>1986). O ácido cáinico, quando administrado intra-ventricularmente, produz uma crise comportamental, acompanhada por um padrão de alterações eletroencefalográficas semelhante ao da epilepsia do lobo temporal. O ácido ibotênico é um outro agonista de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, porém produz lesões mais discretas e circunscritas, comparadas às lesões produzidas com o ácido cáinico (MELLO et al.<sup>102</sup>1986). IZQUIERDO et al.<sup>59</sup>.(1992) observaram que a administração intrahipocampal de glutamato, na tarefa de esquivar melhora a memória, ao passo que o antagonista do receptor NMDA, AP5 tem efeito amnésico.

A administração de altas doses de acetilcolina na região cortical do cérebro causa um aumento da excitabilidade neuronal que pode produzir convulsões. A microinjeção local de colinomiméticos na amígdala ou hipocampo, ou sistêmica de pilocarpina, pode

promover desordens convulsivas e amplas lesões cerebrais. As crises produzidas por altas doses sistêmicas de pilocarpina foi adotado como um modelo de crise do lobo temporal, sendo um dos poucos modelos de epilepsia que mimetiza o aspecto recorrente das crises (TURSKI et al.,<sup>153</sup> 1983a.;<sup>154</sup>1983b.;<sup>151</sup>1984). Evidências recentes indicam que os receptores muscarínicos colinérgicos, juntamente com outros já mencionados, glutamatérgico (NMDA) e GABAérgico (GABA-A), e ainda os beta noradrenérgicos, da amígdala, septo medial e hipocampo estão envolvidos na consolidação da memória. Os dois primeiros relacionados com eventos excitatórios inerentes a formação da memória e os últimos como moduladores do processo, sendo o GABA-A através da inibição e labilidade no processo de consolidação (IZQUIERDO<sup>59</sup>,1992). A oxotremorina, um agonista colinérgico muscarínico, quando administrada por via intrahipocampal, apresenta efeitos benéficos sobre a memória, já o antagonista muscarínico escopolamina causa amnésia (IZQUIERDO et.al.<sup>59</sup>,1992). É crescente o estudo da função cognitiva dos agonistas colinérgicos (SARTER & BRUNO<sup>133</sup>,1997), bem como o seu uso em demências, como no caso da doença de Alzheimer (WEINSTOCK,<sup>164</sup>1995).

A adenosina um nucleotídeo purinérgico, além de suas funções periféricas, está presente em várias áreas do SNC. Sua família de receptores, divide-se em quatro subtipos, com base nas ações agonistas da adenosina. Os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> são antagonizados pelas xantinas, enquanto que as A<sub>3</sub> e A<sub>4</sub> não o são (CAVALHEIRO et al.<sup>24</sup>, 1987; BLOOM,<sup>10</sup> 1996). Os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> inibem a adenilato ciclase, ao passo que os A<sub>2</sub> promovem a sua ativação. Os receptores A<sub>1</sub> (largamente distribuídos no SNC) ainda ativam os canais de K<sup>+</sup>, inibem os canais de Ca<sup>++</sup> e podem aumentar ou diminuir a atividade da fosfolipase C (LINDEN<sup>86</sup>,1994). A teofilina, uma das metilxantinas antagonistas do receptor adenosinérgico A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> é capaz de produzir convulsões em pessoas que a usam como broncodilatadora (HOWELL et al.<sup>55</sup>,1997). A ação depressora central da adenosina tem sido verificada, tanto com a administração central como sistêmica. Estudos eletrofisiológicos mostram que as células do hipocampo são particularmente sensíveis a esta ação depressora da adenosina e de seus análogos tendo sido proposta como um agente antiepiléptico endógeno (CAVALHEIRO et al.<sup>24</sup>, 1987). Os agonistas seletivos do receptor A<sub>1</sub> tem sido propostos para o tratamento de derrames e isquemias cerebrais, pois

diminuem a lesão das regiões do hipocampo, córtex e estriado (VON LUBITZ et al.<sup>160</sup>,1996b).

Outra metilxantina antagonista dos receptores adenosinérgicos é a cafeína. Ela está presente em muitas bebidas comuns e é a droga psicoestimulante mais consumida no mundo (HOWELL et al.<sup>55</sup>,1997). Juntamente com os efeitos estimulantes da cafeína no coração e aparelho respiratório, ela produz numerosos efeitos estimulantes sobre o comportamento. Ela possui uma fraca propriedade de reforço que induz a auto-administração tanto em humanos como em primatas não humanos (GRIFFITHS & WOODSON<sup>51</sup>,1988). Doses moderadas de cafeína induzem efeitos comportamentais que sugerem a estimulação do SNC, porém, doses altas podem suprimir atividade comportamental (GLOWA & SPEALMAN<sup>47</sup>,1994, HOWELL et al.<sup>55</sup>,1997, KATZ & GOLDBERG<sup>78</sup>,1987, SPEALMAN<sup>140</sup>,1988). Existem muitos casos relatados na literatura mostrando que a cafeína pode melhorar a amnésia em humanos, principalmente nos casos relacionados com a idade, (RIEDEL & JOLLES<sup>126</sup>,1996), induzida pela escopolamina (RIEDEL et al.<sup>127</sup>,1995), e na terapia eletroconvulsiva (CALEV<sup>17</sup>,1994, POLLINA & CALEV<sup>121</sup>,1997). Muitos destes estudos com humanos não são específicos para questões de memória (CALEV<sup>17</sup>,1994, LINDE<sup>85</sup>,1994, SMITH et al.<sup>138</sup>,1994, WARBURTON<sup>163</sup>,1995) e as interpretações dos resultados pode ser dificultada pela dúvida da interferência do hábito prévio de consumo de cafeína ou pela heterogeneidade das amostras. O estudo com animais, entretanto, pode contribuir para aclarar a efetividade da cafeína como uma droga que melhora a memória e o mecanismo pelo qual ela interfere nos processos de memória. No entanto, uma revisão cuidadosa destes trabalhos mostra que existem controvérsias a este respeito. Enquanto muitos estudos sobre a cafeína sugerem uma melhora da aprendizagem e memória tanto em modelos animais (ANGELUCCI et al.<sup>4</sup>,1998; CESTARI & CASTELLANO<sup>25</sup>,1996; FLOOD et al.<sup>41</sup>,1978; FLEXNER & FLEXNER<sup>40</sup>,1975; HOWELL et al.<sup>55</sup>,1997; MOLINENGO et al.<sup>105</sup>,1995; ROUSSINOV & YONKOV,<sup>129</sup>,1976; VALZELLI et al.<sup>156</sup>,1986; YONKOV & ROUSSINOV<sup>167</sup>,1983) como em humanos (CALEV<sup>17</sup>,1994; POLLINA & CALEV<sup>121</sup>,1997; RIEDEL et al.<sup>127</sup>,1995; RIEDEL & JOLLES<sup>126</sup>,1996), outros estudos reportam que a cafeína não afeta a memória (LOKE et al.<sup>90</sup>,1985; LOKE<sup>89</sup>,1988; FURUSAWA<sup>42</sup>,

1991; HUDZIK & WENGER<sup>56</sup>, 1993; SMITH et al.<sup>138</sup>, 1994) ou até mesmo a prejudica (BARTUS<sup>6</sup>, 1979; IZQUIERDO et al.<sup>66</sup>, 1979; ERIKSON et al.<sup>33</sup>, 1985; TERRY & PHIFER<sup>147</sup>, 1986; KANT<sup>76</sup>, 1993; SANSONE et al.<sup>130</sup>, 1994; PAN<sup>117</sup>, 1995; FISHER et al.<sup>38</sup>, 1997). Em muitas destas pesquisas o efeito da cafeína sobre a memória não é o objetivo principal mas uma observação em paralelo juntamente com outros itens.

Alguns autores explicam o efeito da cafeína sobre a memória pela liberação de acetilcolina no hipocampo causado pelo antagonismo da cafeína sobre os receptores adenosinérgicos A<sub>1</sub> (ROUSSINOV & YONKOV<sup>129</sup>, 1976; CARTER et al.<sup>21</sup>, 1995;). O decréscimo da acetilcolina no hipocampo e áreas cerebrais relacionadas tem sido há muito tempo invocado para explicar o prejuízo da memória na doença de Alzheimer na idade senil (SCHELTENS & VAN GOOL<sup>134</sup>, 1997). Mais recentemente alguns autores têm contestado a participação da acetilcolina nos processos de memória argumentando que toxinas específicas que lesam neurônios colinérgicos cerebrais não prejudicam a memória em muitas tarefas animais (EVERITT & ROBBINS,<sup>34</sup> 1997).

## NEUROBIOLOGIA DA MEMÓRIA

Muitas das características da planta *P. elegans* descritas acima sugerem, para estudiosos da memória, que ela possui compostos que, como a maioria dos estimulantes do SNC conhecidos, podem melhorar a memória de mamíferos (SARTER<sup>124</sup>, 1991; DA CUNHA et al.<sup>27</sup>, 1992; IZQUIERDO et al.<sup>59</sup>, 1992; CASTELLANO et al.<sup>22</sup>, 1993; CRUZMORALES et al.<sup>26</sup>, 1993). Memória é uma das características fundamentais dos seres vivos. É a habilidade de adquirir, reter e evocar conhecimentos adquiridos pelas experiências. A palavra memória está intimamente ligada ao termo aprendizagem, a etapa da interação do sujeito com a situação comportamental da qual ele extrai informações para o estabelecimento da memória (TOMAZ,<sup>150</sup> 1993).

Após o grande avanço da ciência na descoberta do mecanismo da transmissão da informação genética, esperava-se que a elucidação dos processos de memória fossem estabelecidos da mesma maneira, ou seja, fosse codificada por ácidos nucleicos

(SQUIRE<sup>141</sup>,1987). Após muita polêmica sobre o tema, voltou-se ao pensamento dos neurofisiologistas de que a memória estaria codificada pelo padrão de conexões entre os neurônios (sinapses), tendo como base a “plasticidade neural”(WANG et al.<sup>162</sup>,1997).

Muitos modelos de memória que têm como base a plasticidade neuronal são possíveis. Um deles, o das redes neurais, afirma que a conexão entre os neurônios forma uma rede plástica onde a plasticidade de suas conexões (sinapses) lhe confere a capacidade de armazenar memória de forma duradoura, sem necessidade de que novas sinapses sejam destruídas ou geradas (FUSTER<sup>43</sup>, 1997). Este modelo, proposto inicialmente pelos físicos, encontrou seu embasamento biológico no fenômeno da potenciação de longa duração (“*long-term potentiation*”- LTP), uma propriedade das sinapses descoberta por eletrofisiólogos e neuroquímicos segundo a qual a intensidade de transmissão de um sinal por uma sinapse se torna potencializada em função de uma ativação intensa (tetânica) daquela sinapse (SQUIRE<sup>141</sup>,1987; BLISS & DOLPHIN<sup>9</sup>,1984). Um fenômeno semelhante, a depressão de longa duração (“*long-term depression*” - LTD) estabelece que uma sinapse ativada com uma frequência muito baixa permanece deprimida, ou seja, com a sua capacidade de transmitir um estímulo diminuída, por um longo período de tempo. Vários pesquisadores demonstraram que existe uma grande coincidência entre o efeito de drogas que estimulam ou inibem a LTP ou LTD em estudos eletrofisiológicos e seus efeitos facilitadores ou inibidores sobre a memória em animais e sujeitos humanos (SQUIRE<sup>141</sup>,1987;IZQUIERDO<sup>57</sup>,1994; IZQUIERDO & MEDINA<sup>61</sup>, 1995; WANG et al<sup>162</sup>,1997). Entre estes trabalhos, IZQUIERDO & MEDINA<sup>62</sup>, (1997) realizaram estudos sistemáticos sobre o efeito de drogas, que afetam os mecanismos sinápticos que sustentam a LTP, quando administradas logo após o treino de ratos na tarefa de esquiva inibitória (passiva). Eles concluíram que tal como seria esperado caso a LTP estivesse sustentando as memórias formadas neste aprendizado, primeiramente ocorre uma ativação dos receptores glutamatérgicos, seguidos de alterações de segundos mensageiros e eventos bioquímicos, como o aumento das atividade das proteínas cinases A, C, G e II cálcio-calmodulina-dependente em estruturas límbicas destes animais. Após, ocorrem mudanças nas subunidades de receptores glutamatérgicos, alterando suas propriedades de ligação aos neurotransmissores e também um aumento na expressão de

fatores de transcrição. Logo após o treino estes fatores são regulados por mecanismos hormonais e neuro-humorais relacionados com o estado de alerta, ansiedade e estresse, modulação esta, mediada localmente por sinapses GABAérgicas, colinérgicas e noradrenérgicas e por mensageiros retrógrados da LTP tais como o óxido nítrico, o monóxido de carbono e o fator ativador de plaquetas (PAF). A modulação tardia, 3 - 6 h após o treino, é regulada por vias relacionadas ao humor e ao afeto, envolvendo receptores dopaminérgicos  $D_1$ ,  $\beta$  adrenérgicos e serotoninérgicos 5HT1A (IZQUIERDO & MEDINA<sup>62</sup>, 1997). Além disso, a LTP partilha de muitas propriedades da memória: rápida indução, grande labilidade no período de indução, estímulo específica, manutenção por longo período na ausência de estimulação e rápida evocação.

Estas evidências a favor do envolvimento da LTP na formação de memórias não excluem, entretanto, outros mecanismos propostos para a formação e/ou estabelecimento da memória. Acredita-se também, que além das alterações funcionais nas sinapses, ocorram também alterações estruturais que suportam o processo de armazenamento da memória (SQUIRE<sup>141</sup>,1987; AGRANOFF<sup>1</sup>,1989). Estes processos envolvem a expressão gênica com síntese de proteínas relevantes que irão resultar em alterações morfológicas, como aumento na densidade de “*spines*”, no número de sinapses e vesículas sinápticas (ROSE<sup>128</sup>,1991; BAUNDRY & LYNCH<sup>7</sup>,1984).

O processo da formação de memória, do ponto de vista fisiológico e farmacológico, pode ser dividido em etapas distintas conhecidas como *aquisição*, *consolidação* e *evocação*. Este processo inicia-se com a *aquisição* da informação que chega aos sistemas sensoriais (visual, tátil, auditivo, olfativo e gustativo) sob a forma de estímulos. Uma vez elaboradas estas informações são processadas em paralelo formando vários registros de memória de duração diferente: memórias de curta duração (“*short-term memory*” - STM) e memórias de longa duração (“*long-term memory*” - LTM) (IZQUIERDO et al.<sup>64</sup>,1998). As primeiras são lábeis, icônicas e de capacidade limitada. Um exemplo de memória de curta duração é a memória operacional formada, por exemplo, para armazenar um número de telefone que se vê, se disca e depois se esquece (BADLEY in SQUIRE et al.<sup>142</sup> 1993). As segundas, são mais estáveis, duradouras e podem ser evocadas a qualquer momento, por estímulos a ela relacionados, aqueles gerados durante a situação de aprendizagem

(TOMAZ<sup>150</sup>,1993; JAMES<sup>71</sup>,1890). Há necessidade destas memórias de longa duração, que não são estáveis desde o momento em que são geradas, passarem por um processo de *consolidação*. Nele ocorrem vários processos bioquímicos, nas sinapses, que resultam em uma seleção das informações que serão armazenadas de forma duradoura e também na exclusão ou enfraquecimento de informações consideradas não relevantes. Os processos bioquímicos e fisiológicos que sustentam a modulação das memórias em fase de consolidação são sensíveis a quase todos os hormônios e neurotransmissores que sinalizam o estado fisiológico e mental do indivíduo. Por esta razão, nesta fase da formação das memórias, elas podem ser moduladas por drogas que se ligam a estes receptores hormonais ou neurorreceptores, bem como por experiências cognitivas e emocionais as quais o sujeito estiver submetido (IZQUIERDO et al.<sup>64</sup>,1998; IZQUIERDO & MEDINA,<sup>67</sup>,1993,<sup>66</sup>,1997). Uma vez que uma informação está armazenada em um dos tipos de memória, ela pode ocorrer a sua *evocação* por estímulos semelhantes aos vivenciados pelo sujeito durante a aquisição. A expressão da evocação da memória pode se dar de forma explícita ou consciente, ou de forma implícita ou inconsciente, as quais podem ser comunicadas a outros indivíduos através de um comportamento (falar, gesticular, fazer, etc.) (MILNER, et al.<sup>103</sup>, 1998).

A modulação da memória através de injeções de drogas no período pós-treino é um fenômeno que tem sido muito estudado (IZQUIERDO,<sup>63</sup>,1992; IZQUIERDO et al.<sup>59</sup>,1992; <sup>64</sup>1998; IZQUIERDO & MEDINA,<sup>67</sup>,1993; <sup>65</sup>1995; <sup>66</sup>1997). Por interferirem com os neurotransmissores centrais (IZQUIERDO,<sup>61</sup>,1994) ou com hormônios periféricos, porém de ações centrais (MCGAUGH et al.<sup>98</sup>,1984; IZQUIERDO,<sup>58</sup>,1989; IZQUIERDO et al,<sup>64</sup>1988) estas drogas moduladoras têm sido usadas como ferramentas para a descoberta dos mecanismos neuro-humorais e endócrinos participantes da consolidação da memória. Um exemplo disto é que memórias formadas durante situações de estresse moderado podem ser evocadas com maior facilidade do que aquelas consolidadas em situação de indiferença ou mesmo sonolência (MCGAUGH et al.<sup>98</sup>,1984). Além de drogas, alguns tratamentos podem induzir a liberação de neurotransmissores e hormônios que interferem com a consolidação da memória. O choque eletroconvulsivo foi o primeiro tratamento descrito com a propriedade de perturbar o armazenamento de memórias

recentemente adquiridas (IZQUIERDO,<sup>58</sup>,1989; MCGAUGH et al.<sup>98</sup>,1984). Posteriormente, foi verificado que este choque induz a liberação central de  $\beta$ -endorfina (CARRASCO et al.<sup>20</sup>,1982b). Com a injeção de  $\beta$ -endorfina intracerebral, ou opióides sistemicamente, no período pós-treino, obtêm-se uma amnésia, ao passo que o naloxone, um antagonista opióide tem efeito facilitador (IZQUIERDO<sup>60</sup>,1979; IZQUIERDO<sup>58</sup>,1989) e anula o efeito amnésico do choque (CARRASCO et al.<sup>19</sup>,1982a).

Nem sempre uma amnésia é uma perda definitiva de informação (memória) (IZQUIERDO<sup>58</sup>,1989). No caso a  $\beta$ -endorfina ela estaria atuando como uma informação adicional às memórias em fase de consolidação. A futura evocação seria facilitada pela reapresentação de parte do contexto no qual elas foram formadas (IZQUIERDO<sup>58</sup>,1989; IZQUIERDO et al.<sup>68</sup>,1988). Haveria a necessidade de um “estado neuro-humoral” durante o período da evocação semelhante ao da consolidação, fenômeno conhecido como de dependência de estado (IZQUIERDO<sup>58</sup>,1989; <sup>63</sup>1992; IZQUIERDO et al.<sup>68</sup>,1988).

A consolidação das memórias é coordenada inicialmente pelo hipocampo sendo que a dependência de uma estrutura cerebral coordenadora deste processo migra posteriormente para o córtex entorrinal e, em alguns tipos de memórias estudadas, migra posteriormente para o córtex parietal (IZQUIERDO et al.<sup>69</sup>,1997). Para alguns autores, estas estruturas cerebrais fariam o processo de coordenar o armazenamento e a reconstituição de traços de memória envolvendo mais de uma modalidade de informação sensorial, cognitiva e emocional, que seriam armazenados em diferentes partes do córtex cerebral (SQUIRE et al.<sup>142</sup>1993).

A LTM é classificada em vários tipos de memórias, denominadas muitas vezes com termos diferentes, porém com significado até certo ponto equivalentes. A memória declarativa, também chamada explícita e relacional é aquela que depende da integridade do hipocampo e estruturas anatomicamente relacionadas ao lóbulo temporal médio e diencéfalo (SQUIRE & ZOLA MORGAN,1991 in SQUIRE et al.<sup>142</sup> 1993). Ela é rápida, nem sempre fidedigna e flexível (acessível a múltiplos sistemas de resposta). De acordo com TULVING (1983, 1991) in TOMAZ<sup>150</sup>,1993, a memória episódica e a semântica são dois tipos de memória declarativa. A primeira refere-se a memória autobiográfica, e a segunda ao conhecimento geral sobre o mundo. A memória não-declarativa, implícita ou

procedural é definida como uma coleção de habilidades (BUTTERS et al.,1990 in SQUIRE et al.<sup>142</sup>, 1993), independente das estruturas do lobo medial-temporal e diencefálicas. Ao contrário da memória declarativa, ela é lenta, fidedigna e inflexível (SQUIRE et al.<sup>142</sup>, 1993). Neste tipo de memória estão incluídas as habilidades e os hábitos. As habilidades são os procedimentos (motores, perceptuais e cognitivos) para operar no mundo e os hábitos são disposições e tendências, específicas para uma série de estímulos que guiam o comportamento. Além destes, estão relacionados à memória não-declarativa o condicionamento clássico Pavloviano e o “*priming*”. Foi verificado por CAUL et al.<sup>23</sup>, 1969 e SOLOMON & MOORE<sup>139</sup>,1975 que animais com a remoção completa do hipocampo apresentam aprendizado condicionado simples da musculatura esquelética ou respostas autonômicas. O “*priming*” refere-se à facilidade para detectar ou identificar estímulos de percepção ou “dicas” baseando-se em experiências recentes com eles. Um exemplo desta modalidade de memória é a lembrança da palavra MEMÓRIA quando são apresentadas as suas quatro primeiras letras.

Muitas das teorias vigentes sobre os processos de formação e evocação de memórias, bem como sobre as estruturas cerebrais envolvidas, foram desenvolvidos a partir de estudos com pacientes amnésicos. Amnésia é a incapacidade parcial ou total de reter e/ou evocar informações. Em muitos casos, pacientes que sofreram uma lesão cerebral parcial desenvolveram um tipo de amnésia que afetava apenas as memórias para acontecimentos ocorridos pouco antes da lesão. Eles se tornaram incapazes de formar novas memórias de longa duração para a maioria das informações. Desenvolviam uma **amnésia anterógrada** indicando que as estruturas afetadas não eram os sítios de ~~armazenamento~~ armazenamento da memória mas, provavelmente, aquelas envolvidas na consolidação da mesma. Existem também casos de **amnésia retrógrada** onde os pacientes são incapazes de recordar os acontecimentos ocorridos antes do estabelecimento do distúrbio, sendo também denominada de distúrbio de evocação (TOMAZ<sup>150</sup>,1993). Um caso de amnésia muito estudado é o do paciente H.M. que sofreu uma cirurgia para deter ataques epileptiformes generalizados, que não cediam com medicação. H.M. sofreu uma ressecção cirúrgica bilateral da região medial temporal do cérebro, incluindo o córtex entorrinal, o hipocampo e o complexo amigdalóide. Outros casos de intervenções cirúrgicas ou outros distúrbios na

região medial temporal em humanos ou de lesões produzidas em animais de laboratório, produziram as evidências mais fortes da participação desta região na consolidação da memória (MILNER et al.<sup>103</sup>,1998). O paciente R.B., que se tornou amnésico após uma isquemia da região CA1 do hipocampo, ajudou a confirmar que esta estrutura é necessária para a formação de novas memórias. Porém R.B. apresentava menor amnésia que H.M. presumindo-se o envolvimento de outras estruturas neste processo (SQUIRE et.al.<sup>132</sup>, 1987). MISHIN<sup>104</sup>, (1978) após várias pesquisas com primatas, reproduzindo amnésia semelhantes a observadas em humanos, postulou a necessidade conjunta do hipocampo e amígdala para formação de novas memórias. SQUIRE & ZOLA-MORGAN (1991) (in SQUIRE et al.<sup>142</sup> 1993) e ZOLA-MORGAN et al.<sup>170</sup> (1986) também concluíram, trabalhando com primatas, que a amígdala por si não é necessária para a consolidação, mas sim o hipocampo (especialmente a região CA1) e as regiões corticais relacionadas anatomicamente com o hipocampo (córtex parahipocampal, entorrinal e perirrinal). Estudos neuroanatomicos mostram que a maior parte das vias de conexão entre o hipocampo e outras regiões corticais envolvem sinapses que apresentam, também, conexões diretas com a amígdala e indiretas com o septo. IZQUIERDO et al.<sup>59</sup> (1992), em trabalho com microinjeções de drogas amnésicas em estruturas cerebrais de ratos, demonstraram que o córtex entorrinal é importante para uma fase posterior da consolidação, enquanto o hipocampo, amígdala e outras regiões límbicas (como o septo medial) atuam em uma etapa inicial da consolidação. Quando drogas amnésicas são administradas na amígdala ou hipocampo de animais imediatamente após o treino, eles se tornam amnésicos em relação a tarefa, acontecendo o mesmo com injeção destas drogas no córtex entorrinal entre 90-180 min. pós-treino, mas não imediatamente após o treino. Os autores acreditam que estas estruturas cerebrais são responsáveis pelo processamento da informação a ser armazenada na forma de LTM em etapas sucessivas.

A participação do septo medial e principalmente da amígdala nos processos de armazenamento da memória continua sendo um tema controverso. O consenso entre a maior parte dos pesquisadores é de que a amígdala não é propriamente um centro de armazenamento de memória, ou, em outras palavras, ela não faria parte do circuito de conexões sinápticas críticos para o armazenamento de memórias. Ela teria, por outro lado,

um papel modulador sobre o hipocampo, sendo ativada quando as situações de aprendizagem envolvessem aspectos emocionais tais como recompensas e punições, especialmente quando há um forte componente alertante ou aversivo (CAHILL & MCGAUGH<sup>16</sup>,1990; MCGAUGH, et al.<sup>97</sup>,1997). Outros autores atribuem a ela um papel importante no pareamento de estímulos relacionados a reforço ou punição durante um condicionamento, (DAVIS,<sup>10</sup> 1994).

## PROPOSIÇÕES

Considerando a falta de informação sobre a farmacologia e toxicologia da planta *Pseudocalymma elegans* propomos efetuar o “*screening*” farmacológico geral e das ações centrais do extrato da planta e de compostos isolados.

Considerando que a planta apresenta efeitos tóxicos descritos porém sem experimentos que esclareçam por quais mecanismos centrais a planta induz convulsões, propomos estudar os efeitos farmacológicos de extratos e compostos isolados da planta *Pseudocalymma elegans*.

Considerando que muitos agentes estimulantes do SNC podem afetar a consolidação da memória e que a planta apresenta sinais de estimulação em várias espécies animais, o presente trabalho tem como proposição, estudar o extrato e compostos isolados da planta *Pseudocalymma elegans* sobre a memória, bem como isolar e estudar novos compostos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### COLETA DE MATERIAL BOTÂNICO

As brotações roxas da planta tóxica *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhlman foram coletadas próximo a cidade de Itaguaí, distrito de Seropédica, região serrana do Rio de Janeiro, no período de agosto a outubro de 1994 a 1998. O material foi coletado anualmente pelos veterinários da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e Embrapa - Saúde Animal, respectivamente, Dr. Carlos H. Tokarnia e Dr. Jürgen Döbereiner. A classificação botânica da referida planta, assim como suas exsiccatas, foram feitas pelo botânico Dr. J. Geraldo Kuhlmann.

### PREPARAÇÃO DE EXTRATOS

O material botânico foi seco em estufa a 40-45<sup>o</sup> C com aeração e moído em moinho de Wiley com malha 60 e acondicionado convenientemente (TAVARES et.al.<sup>146</sup>,1974).

### EXTRAÇÃO FRACIONADA COM SOLVENTES

O pó da planta foi submetido a uma extração fracionada com solventes de polaridade crescente: hexana, acetato de etila, metanol e água. Todos os reagentes usados nos ensaios farmacológicos, fitoquímicos e químicos possuíam grau analítico. Cento e trinta gramas de planta moída e seca foi extraída com 1000 ml de cada solvente sob agitação com barra magnética por 12 h. Após este período realizou-se a filtração a vácuo com papel de filtro e funil de Büchner e a seguir foi feita a eliminação do etanol em evaporador rotativo (Suprilab Mod.8VA 810). Após a extração com cada solvente, o pó da planta foi seco à temperatura ambiente e repetiu-se o processo descrito anteriormente com o solvente seguinte. Estes extratos foram utilizados para rastrear a atividade farmacológica da planta.

## **EXTRATO BRUTO I: EXTRAÇÃO HIDROALCOÓLICA (30:70)**

Acrescentou-se 800 ml de água destilada e o mesmo volume de etanol a 200 g da planta moída e seca. A mistura foi fervida em banho-maria por 15 min. Agregou-se mais 800 ml de etanol e procedeu-se a agitação com barra magnética por 12 h. Após este período realizou-se a filtração a vácuo como descrito acima. Este extrato foi utilizado para o fracionamento em sílica gel. (Técnica de **MATOS<sup>95</sup>,1988** modificada (vide Anexo 1)).

## **EXTRATO BRUTO II**

O extrato bruto I foi dissolvido em 200 ml de água destilada e os compostos mais apolares foram removidos por partição em funil de decantação com éter de petróleo (200 ml, repetido por 5 vezes), seguido por partição com éter dietílico petróleo (200 ml, repetido por 5 vezes). Posteriormente a fração aquosa foi evaporada em rota-vapor, o extrato foi diluído com KOH 1,0 M e o pH foi ajustado para 7,0 com HCl. Com este extrato foram feitos os testes farmacológicos. (Técnica de **MATOS<sup>95</sup>,1988** modificada (vide Anexo 2)).

## **FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SÍLICA-GEL**

Dez gramas do extrato bruto I foi dissolvido em 10 ml de água:etanol (70:30) e aplicado em uma coluna (30x4cm) de sílica-gel (Merck 60 HR ART.7744) com saída conectada a um sistema de vácuo. A coluna foi eluída seqüencialmente com 50 ml das seguintes misturas de acetato de etila:metanol: 100:0; 95:5; 90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50; 0:100. Ao final, esta coluna foi eluída ainda com 50 ml de água (vide tab. 02). Cada fração foi evaporada em rota-vapor, conforme descrito anteriormente e dissolvida em Alkamuls EL-620 (Rhône-Poulenc), 20 % v/v em solução salina 0,9% p/v, tamponada com fosfato de sódio 10 mM, pH 7,3 (**VON LUBITZ et al.<sup>159</sup>,1996a**). As frações foram denominadas por B, C,D,E,F,G,H,I e J, respectivamente. A fração B, foi eluída com acetato de etila, sendo esta a mais apolar, e a fração J, mais polar, eluída com água (**MATOS<sup>95</sup>,1988**).

## FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX LH-20

Um extrato com compostos com polaridade próxima à da fração J foi obtido com a partição do extrato bruto II com butanol (200 ml, repetido por 5 vezes). Nove gramas deste extrato, dissolvido em 9 ml de água foi aplicado em uma coluna (30x3,5cm) de Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech), eluída com 300 ml de água, seguido por um gradiente linear de água:etanol (50 ml : 50ml) e 300 ml etanol com um fluxo de 7 ml/min. Foram coletadas frações de 10 ml no coletor de frações (Incibrás - FRACSIL - 100). O volume de vazio, determinado previamente pela eluição de azul de dextrana (Sigma) foi de 100 ml. A eluição do material foi monitorada pela  $A_{220 \text{ nm}}$  (U/V Visible Spectrophotometer - Ultrospec 2000 - Pharmacia Biotech), e as frações correspondentes aos picos foram agrupadas, identificadas como J-I a J-XV, respectivamente, e concentrados por liofilização (Liofilizador VIRTIS - Research Equipament -Gardiner, New York ) ou evaporação em rota-vapor. A fração J-III foi posteriormente recromatografada em coluna (100 x 2 cm) de Sephadex LH-20, eluída com 300 ml de água destilada, com um fluxo de 7 ml/min. Foram coletadas frações de 7 ml. O volume de vazio desta coluna foi estimado em 40 ml. Para administração nos animais as frações aquosas foram dissolvidas em solução salina 0,9 % (MATOS<sup>95</sup>,1988).

## ANÁLISES FITOQUÍMICAS

As análises fitoquímicas (MOREIRA,<sup>107</sup>1979 modificado por NAKASHIMA,<sup>112</sup>1993) foram realizadas com o pó da planta *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhlmann na forma de extrato etanólico 20%, extrato aquoso 20% e com a fração aquosa purificada J-III. Os extratos foram feitos através do método de maceração, chegando ao volume de 150 ml.

Após a obtenção dos referidos extratos e da fração purificada foram observados e determinadas a cor, odor, sabor e pH (NAKASHIMA,<sup>112</sup>1993).

## **DETERMINAÇÃO DE pH**

O pH das amostras foi determinado potenciométricamente com aparelho pHmetro (Cole Parmer, Microcomputer pH -vision, Model 05669-20).

## **PESQUISA DE GLICOSÍDEOS FLAVÔNICOS**

Uma amostra de 15 ml do extrato etanólico 20 % foi transferida para um tubo de ensaio, e foram adicionados 5 ml de éter de petróleo e agitado. Após ficar em repouso, foi separada a camada etérea com auxílio de uma pipeta. A solução restante foi extraída por 3 vezes com 5 ml de clorofórmio para a remoção da clorofila. A solução aquosa restante foi evaporada até a secura. O resíduo foi removido com 5 ml de metanol e utilizado como amostra nos seguintes testes:

A 2 ml da solução foi adicionado 50 mg de limalha de Mg + 0,5 ml de HCl fumegante. O aparecimento de coloração rósea a vermelho indica reação positiva.

Uma amostra de 1 ml da solução foi evaporada até a secura em tubo de ensaio. Ao resíduo foram adicionadas 5 gotas de acetona e 30 mg de uma mistura de ácido bórico + ácido oxálico (1/1) que foi submetida a agitação e evaporada à secura em banho-maria. Ao resíduo foram adicionados 5 ml de éter etílico e a mistura foi submetida a agitação. A solução etérea foi examinada sob a luz U.V. O aparecimento de fluorescência indica reação positiva para a presença de glicosídeos flavônicos.

## **PESQUISA DE ESTERÓIDES E/OU TRITERPENOS**

O volume de 20 ml do extrato etanólico 20 % foi evaporado à secura. O resíduo foi dissolvido com 5 ml de clorofórmio, filtrado e o volume completado para 5 ml.

Em três tubos de ensaio foram colocados respectivamente 0,1 ml, 0,25 ml e 0,5 ml da solução acima e completado o volume para 2 ml com clorofórmio. Foi adicionado (lentamente) 1ml de ácido sulfúrico concentrado em cada tubo. A formação da coloração rosa escuro ou azul esverdeado indica a presença de esteróides insaturados.

## PESQUISA DE ALCALÓIDES

Uma alíquota de 20 ml do extrato etanólico 20% foi evaporada até à secura e o resíduo tratado com gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (até pH 8-10), sendo então adicionado 1,0 ml de água destilada. A solução foi agitada com 10 ml de clorofórmio. A camada clorofórmica foi transvasada para um tubo de ensaio e agitada juntamente com 10 ml de uma solução aquosa de HCl 1%. A solução ácida foi separada com o auxílio de uma pipeta.

Os seguintes testes foram realizados com os reativos, abaixo relacionados, em 5 tubos de ensaio contendo 1 ml da solução ácida:

Tubo 1 - foram adicionadas 3 a 5 gotas do reativo de Mayer. A formação de precipitado branco indica a presença de alcalóides.

Tubo 2 - foram adicionadas 3 gotas do reativo de Dragendorf, de acordo com **MUNIER et al.**<sup>111</sup>(1952). A formação de precipitado alaranjado indica a presença de alcalóides.

Tubo 3 - foram adicionadas 3 gotas do reativo de Bertrand. A formação de precipitado branco indica a presença de alcalóides.

Tubo 4 - foram adicionadas 3 gotas do reativo de Bouchardat. A formação de precipitado vermelho tijolo (alaranjado) indica a presença de alcalóides.

Tubo 5 - foi usado como tubo de comparação em caso de reação positiva. Foi adicionada a solução etanólica de ácido tartárico (5%), gota a gota. A dissolução do precipitado confirma a reação positiva para alcalóides.

## PESQUISA DE AMINOGRUPOS

Foi concentrada uma alíquota de 10 ml do extrato etanólico 20% em rota-vapor. Com este extrato foram efetuadas duas manchas em uma cromatoplaca. Sobre uma das manchas foi gotejado o reativo de Ninhidrina segundo **FAHMY et al.**<sup>35</sup>(1961). O desenvolvimento de coloração róseo-violáceo indica a presença de aminogrupos.

## **PESQUISA DE GLICOSÍDEOS ANTRAQUINÔNICOS**

O volume de 50 ml do extrato etanólico 29% foi transferido para um balão de refluxo e adicionado 5 ml da solução aquosa de  $H_2SO_4$  10 %. O balão foi acoplado a um condensador e levado a refluxo por 30 min., logo após foi filtrado, ainda quente, em papel de filtro. Foram adicionados 30 ml de água destilada e a mistura foi transferida para um funil de separação e extraída por 3 vezes com 5 ml de  $CH_2Cl_2$ . A camada orgânica foi concentrada em rota-vapor até 5 ml e transferida para um tubo de ensaio, onde foi efetuada a reação de Borntrægger com a adição de 5 ml de  $NH_4OH$  SR. Após agitação lenta observou-se a reação. O aparecimento de coloração rósea indica a presença de antraquinonas.

## **PESQUISA DE CUMARÍNAS**

O volume de 50 ml do extrato etanólico 20% foi transferido para um becker e foram adicionados 5 ml de HCl 1 N. O volume foi reduzido para 10 ml em rota-vapor. Foram adicionados 5 ml de água destilada e a mistura foi extraída 5 vezes em funil de separação com éter dietílico. O volume foi novamente reduzido para 5 ml, em rota-vapor.

Em uma tira de papel de filtro, foram demarcados 3 pontos com grafite e colocado em cada ponto uma gota do extrato etéreo concentrado. Após a secagem foi adicionada 1 gota de NaOH 10% sobre a mancha 1 e 2. A mancha de número 1 foi coberta com uma moeda e foi observado o desenvolvimento de fluorescência na mancha 2, exposta à radiação UV. O aparecimento de fluorescência na mancha 2 indica a presença de cumarina.

O restante do extrato etéreo foi transferido para um tubo de ensaio e foram adicionados 2 ml de  $NH_4OH$  concentrado. Após agitação foi observada a fluorescência em UV, ondas longas (365 nm). O aparecimento de fluorescência amarelo esverdeado indica reação positiva.

## **PESQUISA DE GLICOSÍDEOS ANTOCIÂNICOS**

Foram transferidas 3 porções de 5 ml do extrato aquoso 20% para 3 tubos de ensaio.

Tubo1 - foi acidificado com HCl N ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N ( pH 1).

Tubo2 - foi alcalinizado com NH<sub>4</sub>OH ( pH 10).

Tubo3 - foi neutralizado (pH7).

O aparecimento de coloração vermelha no tubo1, de azul no tubo 2 e violácea no tubo 3 indicam reação positiva para glicosídeos antociânicos.

### **PESQUISA DE GLICOSÍDEOS SAPONÍNICOS**

Os 3 tubos de ensaio anteriores foram agitados vigorosamente por 1 minuto. A espuma formada foi medida e os tubos foram deixados em repouso por 30 min. A presença de espuma persistente indica a presença de glicosídeos saponínicos.

### **PESQUISA DE GLICOSÍDEOS CIANOGENÉTICOS**

O volume de 5 ml do extrato aquoso 20% foi transferido para um tubo de ensaio, sem contudo umedecer as paredes do tubo e foi acrescentado 1 ml da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 N. Uma tira de papel picro-sódico , foi suspenso no tubo de ensaio com a ajuda de uma rolha de cortiça, sem tocar no extrato aquoso. O tubo foi levado a rota-vapor a 60<sup>o</sup>C por 30 min. A coloração avermelhada no papel, indica a presença de glicosídeos cianogenéticos, pela formação de isopurpurato de sódio.

### **PESQUISA DE TANINOS**

a) Reações com sais de ferro:

1. Reação com FeCl<sub>3</sub> 1% - uma amostra de 5 ml do extrato aquoso 20% foi transferida para um tubo de ensaio e adicionado 3 a 5 gotas de FeCl<sub>3</sub> 1%. O desenvolvimento da coloração azul, ou verde, ou a mistura de cores, ou a precipitação de compostos indicam a presença de taninos.

2. Reação com  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  - uma amostra de 5 ml do extrato aquoso 20 % foi transferida para um tubo de ensaio e foram adicionadas 3 a 5 gotas de sulfato de ferro amoniacal. O desenvolvimento de coloração ou a precipitação indica a presença de taninos.

b) Reação com solução de gelatina 2,5% em NaCl 0.9%:

Em 3 tubos de ensaio foram transferidos respectivamente: 0,5 ml, 1 ml e 2 ml do extrato aquoso 20%. A cada tubo foram adicionados 2 ml da solução de gelatina 2,5% (p/v). A obtenção de precipitado indica a presença de taninos.

c) Reação com sais de Chumbo:

Uma amostra de 5 ml do extrato aquoso 20% foi transferida para um tubo de ensaio e foram adicionados 5 ml de ácido acético (10%) e 5 ml de solução de acetato de chumbo (10%), gota a gota. A formação de precipitado indica a presença de taninos.

d) Reação de formol-clorídrico (Reação de Stanishy)

Uma amostra de 50 ml do extrato aquoso 20% foi transferida para um balão de 100 ml e foram adicionados 6 ml de formaldeído e 4 ml de HCl concentrado. O balão foi acoplado a um condensador com bolas de vidro, levado a refluxo por 1 hora e, após o esfriamento, a solução concentrada foi filtrada. O filtrado foi reservado .

O resíduo, do papel de filtro, foi lavado com EtOH 70% (v/v) e sobre ela foi gotejada uma solução aquosa de NaOH (5%). O desenvolvimento de coloração esverdeada indica a presença de taninos condensados.

Ao filtrado foi adicionado acetato de sódio em excesso e gotas da solução aquosa de  $\text{FeCl}_3$  1%. O desenvolvimento de coloração azul, indica a presença de taninos hidrolisáveis.

## **PESQUISA DE AMINOGRUPOS**

Uma amostra de 20 ml do extrato aquoso 20% foi concentrado em rota-vapor ( $60^{\circ}\text{C}$ ) até chegar o volume de 5 ml. Em seguida, o concentrado foi depositado em tira de papel de filtro (comum), em dois pontos determinados, 5 gotas do extrato concentrado em cada ponto. Após secagem do papel foi nebulizado com Ninhidrina (FAHMY et al.<sup>35</sup>, 1961), aquecido em estufa a  $100^{\circ}\text{C}$  por 15 min. O aparecimento de coloração rósea ou azul-violácea indica a presença de amino grupos.

## **PESQUISA DE ÁCIDOS FIXOS**

Uma amostra de 50 ml de extrato aquoso 20% foi transferida para um balão, ao qual foram adicionados 5 ml de NaOH 1,0 N. O balão foi acoplado ao condensador de bolas de vidro e levado a refluxo durante 30 min. Após o esfriamento foi adicionado  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,0 N gota a gota, até a acidificação, a mistura foi extraída 3 vezes com 10 ml éter. Os extratos etéreos foram reunidos, sendo a mistura tratada com carvão ativado, filtrada e evaporada em rota-vapor. Os resíduos foram aquecidos em estufa a  $100^{\circ}\text{C}$ . Após esfriar, foram adicionados 5 ml de solução aquosa de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 N e a mistura foi filtrada. Três gotas do extrato amoniacal foram transferidas para papel de filtro, em dois pontos previamente determinados, obtendo-se uma mancha de 1 cm de diâmetro. Após a secagem por 10 min. em estufa a  $100^{\circ}\text{C}$ , a mancha foi tratada com reagente de Nessler. O desenvolvimento de coloração marrom indica a presença de ácidos fixos.

## **PESQUISA DE ÁCIDOS VOLÁTEIS**

Uma amostra de 5 ml de extrato aquoso 20% foi transferida para um tubo de ensaio e foi adicionado a ela 1 ml de solução aquosa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,0 N. Uma tira de papel indicador de pH, foi suspensa no tubo de ensaio, sem tocar no extrato aquoso. O tubo foi levado a

banho-maria a 60°C por 30 min. A mudança na coloração do papel foi observada para indicação de ácidos voláteis.

## **ANÁLISES QUÍMICAS**

### **CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA EM SÍLICA (MONODIMENCIONAL)**

As cromatografias de camada delgada em sílica foram realizadas com amostras do extrato bruto I e das frações B , C , D , E , F , G, H , I e a J. Amostras de 2 µl foram aplicadas com capilar de vidro sobre a placa de sílica (Cromatofolhas Merck , AL Silicagel 60 ART 5553,7 x 7 cm) e eluídas com clorofórmio:metanol (7:3). Amostras de sorbarina e escutelareína foram colocadas como padrão e usadas como marcadores. O tempo médio de eluição foi de 5 min. As placas foram posteriormente reveladas com ácido sulfúrico a quente (MATOS<sup>95</sup>,1988).

### **CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA EM CELULOSE (BIDIMENCIONAL)**

A Cromatografia bidimensional foi realizada em cromatoplaça Marca Merck Art. 5552 , com espessura de 0,1 mm. Na primeira dimensão foi utilizado como fase móvel a mistura butanol:ácido acético:água (80:20:20); na segunda dimensão a fase móvel utilizada foi clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio ( 40:20:20 ). Foi aplicada uma amostra de 8 mg da fração JIII em 2 µl de água destilada. As eluições foram feitas em cuba retangular não saturada, com desenvolvimento de 8,5 cm e o procedimento durou em torno de 24 horas. Posteriormente a placa foi revelada com ninhidrina (FAHMY et al.<sup>35</sup>,1961).

## ESPECTRO DE UV

O espectro de ultravioleta da fração J-III foi traçado a partir de valores de absorbância na faixa de 190 a 900 nm, com intervalos de 10 nm (U/V Visible Spectrophotometer - Ultrospec 2000 - Pharmacia Biotech). As amostras foram diluídas de forma que as leituras estivessem no intervalo de 0,2 a 0,7.

## TESTE PARA CARBOIDRATOS (FENOL-SULFÚRICO)

A 0,5 ml da fração J-III (80 µl/ml) ou padrão (glucose 20,40,60,80 e 100 µl/ml) ou branco (água destilada) juntou-se 0.5 ml de fenol a 5% e 2,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, procedeu-se agitação em vórtex (Genie 2 - Scientific Industries) e após 20 min. foi realizada leitura em triplicata, no espectrofotômetro A<sub>490</sub> nm (U/V Visible Spectrophotometer - Ultrospec 2000 - Pharmacia Biotech). A coloração amarela indica a presença de açúcares.(DUBOIS,<sup>31</sup> 1956).

## TESTES TOXICOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS

### ANIMAIS

Nos experimentos com administração estereotóxica de drogas para estudo da memória, bem como no labirinto aquático de Morris, foram utilizados 250 ratos Wistar, machos, adultos, com peso entre 250 a 310 g, do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (5 animais por caixa) (60 x 25 x 15 cm ), com o assoalho coberto com maravalha, sob temperatura constante ( 22 ± 3<sup>o</sup>C ). O ciclo claro/escuro foi mantido em 12/12 h, sendo as luzes acesas às 7:00 h. A água e a ração balanceada foram administradas *ad libitum*.

Nos demais experimentos foram usados 1050 camundongos Swiss, adultos, machos, com peso entre 18 a 23 g também provenientes do Biotério do Setor de Ciências

Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais (15 por caixa ) foram mantidos sob as mesmas condições descritas anteriormente.

## **VIAS DE ADMINISTRAÇÃO**

### **INTRAPERITONEAL (i.p.)**

Na grande maioria dos experimentos (com exceção nos experimentos com administração estereotáxica de drogas e nos testes preliminares de toxicologia) os animais receberam as substâncias pela via i.p., ou seja , no terço inferior da linha mediana da parede abdominal (CARLINI<sup>18</sup>,1973).

### **ORAL (v.o.)**

Nos testes toxicológicos preliminares os camundongos receberam o extrato bruto II por via oral, através de sonda, pelo método de gavagem. O volume máximo administrado foi de 0,50 ml. Os animais ficaram em jejum e sem água 12 horas antes da administração do extrato por esta via (VALLE<sup>155</sup>,1955).

### **INTRAHIPOCAMPAL (i.h.)**

Os ratos que realizaram as tarefas de esquiva ativa de duas vias e habituação a um ambiente novo, receberam os compostos isolados da planta *P. elegans*: sorbarina, triumfoidina, alantoina e veículo através da via intrahipocampal (DA CUNHA<sup>27</sup>, 1992).

Após anestesia geral com tionembutal (30 mg/kg, i.p.) os ratos foram imobilizados em estereotáxico (David Kopf Instruments , USA), e tiveram o crânio dissecado e perfurado com broca e duas cânulas de aço inoxidável (0,7 X 8 mm , 27-gauge), implantadas e fixadas com acrílico de auto-polimerização. As coordenadas estereotáxicas para a implantação de cânulas bilaterais no hipocampo foram obtidas do Atlas de PAXINOS & WATSON<sup>119</sup>,(1986) e adaptadas ao tamanho e formato dos ratos. As

coordenadas foram as seguintes : AP: - 4,2 mm do bregma ; ML:  $\pm$  3,0 mm da linha média ; DV: - 1,1 mm da duramáter ; barra nasal: alinhada com a linha interaural . As agulhas para as microinjeções (Gengibrás), estendiam-se 1,0 mm além da ponta dorsal das cânulas implantadas no hipocampo . A agulha era conectada a um tubo de polietileno ligado a uma microseringa (Hamilton 10  $\mu$ l), carregada com o fármaco a ser injetado.

Após a cirurgia os animais eram deixados sob uma lâmpada vermelha de 40 W até despertarem da anestesia e depois reconduzidos ao biotério. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais 5 a 10 dias após a cirurgia.

Após os testes comportamentais os animais eram decapitados e seus cérebros fixados em formol 2 % (p/v) e cortados em micrótomo com criostato e corados com violeta de cresila. A verificação histológica era realizada para a comprovação do acerto das coordenadas estereotáxicas de acordo com **PAXINOS & WATSON<sup>119</sup>**,(1986).

## **ESQUEMA DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS**

A tabela i detalha a administração das drogas e veículos utilizados em todo o trabalho, especificando a dose e a via de administração correspondente, bem como o teste e espécie animal.

**Tabela i: Esquema de administração de drogas.**

Testes	Animais	Drogas e Veículos	Doses	Vias
DL <sub>50</sub>	Camundongos	Extrato bruto II Veículo *DMSO 20%(v/v) em NaCl 0,09%(p/v)	0,6; 1,0; 1,4; 1,6; 1,8; 2; e 3g/kg	i.p.
DL <sub>50</sub>	Camundongos	Extrato bruto II Veículo *	3,5 - 9g/kg	v.o.
DL <sub>50</sub>	Camundongos	Alantoína Salina	10; 20; 30; 40 e 60mg/kg	i.p.
DL <sub>50</sub>	Camundongos	Fração J-III Salina	150; 300 e 500 mg/kg	i.p.
Hipocrático de Irwin	Camundongos	Extrato bruto II Salina	0,45; 0,90; 1,35; e 1,80g/kg	i.p.
Hipocrático de Irwin	Camundongos	Alantoína Salina	10; 20; 30; 40 e 60mg/kg	i.p.
Hipocrático de Irwin	Camundongos	Fração J-III Salina	150; 300 e 500 mg/kg	i.p.
Comportamentais: #Campo aberto, labirinto em cruz, at. Locomotora espontânea, tônus muscular.	Camundongos	Extrato bruto II Veículo *	1g/kg	i.p.
Comportamentais: # catatonía	Camundongos	Alantoína Triumboidina Sorbarina Veículo *	4 mg/kg	i.p.

...continuação Tabela i: Esquema de administração de drogas.

<b>Memória:</b> Habituação	Camundongos	Extrato bruto II Veículo *	0,6g/kg	i.p. pós-treino
Habituação	Camundongos	Alantoína Salina	20; 40 e 60 mg/kg	i.p. 30 min pré-treino
Habituação	Ratos	Alantoína Triumboidina Sorbarina Veículo *	7µg/lado hipocampo	i.h. pós-treino
Habituação	Camundongos	Cafeína Salina	3, 10, 30 e 100 mg/kg	i.p. pós-treino
Habituação	Camundongos	Cafeína Salina	30 mg/kg	i.p. pré-treino
Esquiva Inibitória	Camundongos	Extrato bruto II Salina	0,6 e 1,2g/kg	i.p. pós-treino
Esquiva Inibitória	Camundongos	Fração J-III Salina	0,05; 0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg	i.p. pós-treino
Esquiva Inibitória	Camundongos	Cafeína Salina	1, 3, 10, 30 e 100 mg/kg	i.p. 30 min pré-treino, pós-treino, pré-teste, pré-treino /pré-teste.
Esquiva Ativa de duas vias	Ratos	Alantoína Sorbarina Veículo *	7µg/lado hipocampo	i.h. pós-treino
Labirinto Aquático de Morris	Ratos	Cafeína Salina	0,3, 3, 10, 30 mg/kg	i.p. pré-treino, pós-treino, pré-teste.

## TESTES GERAIS E TOXICOLÓGICOS

### DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MEDIANA (DL<sub>50</sub>)

A dose letal mediana foi realizada pela verificação do número de camundongos mortos após administração i.p. de várias doses do extrato bruto II, alantoína e fração J-III e do cálculo desta porcentagem para cada dose. Para a determinação da DL<sub>50</sub> do extrato bruto II também foi utilizada a via oral tal como descrito acima. Os animais foram observados por 48 h. Os dados foram analisados estatisticamente através do log da dose e probitos (CARLINI<sup>18</sup>,1973).

### TESTE HIPOCRÁTICO DE MALONE

Os camundongos receberam várias doses dos fármacos em estudo por via i.p. e foram observados coletivamente, em intervalos de 5, 10, 15, 30 e 60 min. e de 2, 4, 6 e 24 h, no 2<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia. Todas as frações e extratos da planta *P. elegans* foram testados através deste protocolo. Os animais, devidamente identificados através de códigos (teste cego), eram colocados sobre uma mesa e observados. Todos os resultados eram anotados em uma tabela, para facilitar a avaliação, mesmo os negativos. Os animais mortos pela ação da substância eram necropsiados imediatamente. A causa da morte e as anormalidades verificadas macroscopicamente foram anotadas (MALONE E ROBICHAUD<sup>93</sup>, 1962 (vide Anexo 3).

### TESTE HIPOCRÁTICO DE IRWIN

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos, sendo 10 animais por grupo, identificados através de códigos (teste cego), e receberam várias doses dos fármacos, por via i.p. Logo após o tratamento os animais foram submetidos a uma bateria de testes (teste de IRWIN<sup>57</sup>,1968) com duração de 5 min, repetidos a cada 30 min por até 150 min.

Os animais foram ainda observados por 14 dias para acompanhamento da ocorrência de mortes. A bateria de testes realizada, 50 no total, envolveu observações comportamentais, neurológicas, autonômicas e de toxicidade, conforme tabelas 7 a 9. Os testes foram realizados no período da manhã e à tarde, sendo que as diferenças devidas ao período do dia foram também anotadas (vide Anexo 4).

## **AVALIAÇÃO DE SINERGISMO**

As frações que não causaram efeito excitatório máximo (B-J) foram adicionadas em conjunto, na mesma proporção que apareceram no extrato para avaliação de sinergismo entre os compostos. As observações foram realizadas de acordo com o protocolo de Malone descrito acima (MALONE E ROBICHAUD<sup>93</sup>, 1962).

## **TESTES COMPORTAMENTAIS**

### **COMPORTAMENTO EM CAMPO ABERTO**

Neste teste permitia-se que cada camundongo, 30 min. após o tratamento, explorasse livremente um campo aberto por cinco minutos. O campo aberto consistia de uma arena redonda (100cm de diâmetro), pintada de branco e dividida em 19 quadrantes separados por marcas de dois círculos concêntricos e linhas dividindo os espaços entre os círculos. Essa arena estava limitada por paredes brancas de 40cm de altura. Todo o aparato era coberto por uma cortina e iluminado com quatro lâmpadas de 60 W. Durante a sessão de observação era ligado um gerador de ruído branco (40 dB). Dois observadores registravam a frequência de cruzamentos pelas marcas do campo, do comportamento exploratório de levantar ("*rearing*"), tempo de auto-limpeza ("*grooming*"), tempo que o animal permanecia imóvel ("*freezing*") e, no final da sessão, o número de bolos fecais deixados pelo animal (LYNCH & BAUNDRY,<sup>91</sup>1984).

## **LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Este teste foi adaptado para camundongos por **LISTER<sup>87</sup>(1987)** que o validou como um teste sensível a droga ansiolíticas e ansiogênicas. Os animais eram observados individualmente por 5 min, 35 min após o tratamento, em um labirinto com dois braços opostos sem paredes laterais (30x5cm), chamados de braços abertos e por outros dois braços fechados (30x5x15cm). O labirinto ficava em uma sala iluminada por um lâmpada vermelha, suspenso 40 cm do solo. Durante o teste anotava-se o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos, fechados e no compartimento central do labirinto.

## **MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA**

Para o teste de movimentação espontânea, após 40 min do tratamento com a administração de substâncias ativas, camundongos eram colocados individualmente na caixa de movimentação espontânea por 5 minutos, sendo sua atividade motora registrada automaticamente toda vez que o animal passava pelos feixes de luz. O aparelho para o referido teste, consistia de uma caixa de alumínio (50x22x23 cm) com o chão em barras metálicas e que possui três feixes de luz apontados para células fotoelétricas distribuídas ao longo da parede de fundo (**LYNCH & BAUNDRY<sup>91</sup>,1984**).

## **TÔNUS MUSCULAR**

Para o teste de tônus muscular camundongos eram colocados , individualmente, dependurados pelas patas em um arame esticado ( 45 min. após o tratamento) e o tempo de permanência no arame antes que o animal caísse era anotado (**PORSOLT et al.<sup>123</sup>,1993**

## **CATATONIA**

No teste de catatonía camundongos, após 50 min. do tratamento, eram colocados com as patas dianteiras sobre uma barra situada 4,5 cm acima do plano em que deveriam

ficar assentados sobre os membros posteriores. O tempo de permanência nesta posição era anotado. Repetia-se mais duas vezes o processo. O maior tempo obtido nas três tentativas é considerado como o desempenho do animal (LYNCH & BAUNDRY<sup>91</sup>,1984).

## **TESTES DE MEMÓRIA**

### **HABITUAÇÃO**

Neste teste foram utilizados camundongos que eram colocados, individualmente, no aparato de movimentação espontânea, idêntico ao descrito anteriormente, para que explorasse livremente o aparelho por 5 min. O teste também foi realizado com ratos, neste caso em uma caixa não automatizada (50x40x60 cm) com o assoalho quadriculado (3 listras horizontais e 3 verticais). Sua atividade motora era registrada automaticamente através de células fotoelétricas. Em todas as sessões de treino e teste os animais recebiam o tratamento 30 min antes ou 30 min. após o teste. O intervalo entre as sessões de treino e teste foi de 24 h. Durante as sessões as freqüências de cruzamentos e levantar eram anotadas. A habituação ao aparato era estimada pela redução no número de cruzamentos e levantar entre as sessões de treino e teste. (NETTO et al.<sup>114</sup>1986).

### **ESQUIVA INIBITÓRIA**

Neste teste foram utilizados camundongos treinados em uma caixa automatizada (Gemini Avoidance System, San Diego Instruments, USA) 23 X 50 X 23 cm, construída em acrílico de cor preta, com face frontal de acrílico transparente, dividida em dois compartimentos um claro e um escuro. O piso da caixa é formado por uma série de barras de aço inoxidável com calibre de 5 mm espaçadas de 15 em 15 mm. Na sessão de treino os camundongos foram colocados no compartimento claro e a latência de entrada no compartimento escuro foi anotada. O tempo máximo esperado para que o animal entrasse no compartimento escuro foi 30 s. Se o animal ultrapassasse este tempo era descartado.

Ao entrar no compartimento escuro ele recebia um choque nas patas de 0,25 mA por 3 s sendo então retirado do aparelho . Na sessão do teste, 48 horas após o treino, o animal era reconduzido à caixa de condicionamento como anteriormente e anotada a latência de entrada no compartimento escuro. A latência na sessão de teste foi tomada como medida de retenção (memória). Este procedimento foi adaptado de **JARVICK & KOPP**<sup>72</sup>(1967). A administração de drogas variou de acordo com o experimento, sendo em alguns casos 30 min. antes do treino, imediatamente após o treino , 30 min. antes do teste ou ainda 30 min. antes do treino e também 30 min. antes do teste.

### **ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS**

Neste experimento foram utilizados ratos que foram treinados em uma caixa automatizada (Gemini Avoidance System , San Diego Instruments , USA) com as mesmas características da caixa de esquiava inibitória descrita anteriormente . No teto de cada um dos lados há uma campainha que emitia uma série de 30 tons de 1,5 KHz , 60 dB durante 10 seg com intervalos aleatórios de 10-50 seg entre o início do soar de uma campainha e outra. Na sessão de treino o animal era colocado na caixa de condicionamento e, após um período de habituação de 3 min. começava a soar a campainha . Cada tom era seguido por um choque na patas de 0,5 mA por até 5 seg. (acompanhado da campainha), com varredura de 60 hz , caso o animal não cruzasse para o outro lado da caixa . O choque e o som eram mantidos até a emissão da resposta de cruzamento . Para evitar o choque o animal deveria emitir a resposta de esquiava (cruzamento) nos primeiros 5 seg. em que soava a campainha. A sessão de teste, 24 horas após o treino, era igual a sessão de treino com exceção do tempo de habituação , que era de 1 min. O desempenho dos animais (número de esquivas ao choque e latência de fuga ao choque) nas sessões de treino era tomada como medida de aquisição e o desempenho dos animais na sessão de teste era tomada como medida de retenção (memória). As drogas foram administradas logo após o treino (**CARRASCO et al.**<sup>19</sup>,1982).

## **LABIRINTO AQUÁTICO ESPACIAL DE MORRIS**

Neste teste ratos foram treinados em um labirinto aquático de Morris que consiste em uma piscina circular (170 cm de diâmetro, 70 cm de profundidade) com água a uma temperatura constante de 26°C e uma plataforma transparente, invisível para o animal, submersa a 2 cm, localizada no centro de um dos quadrantes da piscina. Este método avalia a memória espacial através de indícios fora do aparato. (MORRIS et al.<sup>108</sup>,1992). A sessão de treino consistia em 6 tentativas de nadar até a plataforma, onde o animal era colocado na água, voltado para a parede da piscina, liberado aleatoriamente de pontos de partida diferentes (Norte, Sul, Leste, Oeste). Quando o animal não conseguia achar a plataforma em até 120 s, ele era conduzido gentilmente pelo experimentador até a mesma, permanecendo ali por 10 s. Em cada prova o animal foi colocado no tanque em um quadrante diferente. Nos intervalos entre as tentativas o animal foi mantido por 20 seg em uma caixa plástica, fora da piscina. Na sessão de teste o animal foi submetido a três tentativas semelhantes ao treino. As sessões foram filmadas e posteriormente foi determinado tempo de latência da chegada a plataforma, a distância percorrida para achar a plataforma e a velocidade de natação. A memória é usualmente demonstrada pelo decréscimo do tempo de latência entre as sessões, pela menor distância percorrida e pela permanência de um maior tempo no quadrante da plataforma. Os animais receberam tratamento: solução de cafeína (RBI Research Biochemicals Incorporated) ou veículo em três esquemas diferentes: 30 min. antes do treino; imediatamente após o treino ou 30 min. antes do teste.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram classificados em paramétricos ou não paramétricos de acordo com a sua distribuição (normal ou não, teste de Kurtose, teste de Lilliefors e teste W de Shapiro-Wilk). Os dados obtidos com escores em escala não contínua ou valores unitários foram também considerados não-paramétricos. Os dados paramétricos foram expressos como

média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por ANOVA de uma via ou de duas vias (dados com medidas repetidas) seguidos por teste ad-hoc de Duncan. Os dados não-paramétricos foram expressos como mediana (Q25/Q75) e analisados por Kruskal-Wallis ANOVA de uma via seguido por teste de Mann-Whitney (ZAR,<sup>169</sup>1974; SIEGEL,<sup>136</sup>1975).

## RESULTADOS

A planta *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhlmann, na forma de extrato, frações e princípios isolados, apresentou vários efeitos sobre o SNC que são demonstrados nos resultados abaixo.

A tabela 1 ilustra a atividade biológica e o rendimento da extração do pó da planta com solventes de polaridade crescente. A partir de 130 g de pó da planta, obteve-se o extrato bruto, denominado extrato bruto I, com rendimento de 20 g. A partir deste extrato foi feita extração com hexano (rendimento de 1 g), acetato de etila (rendimento 1 g), metanol (rendimento 10 g) e água (rendimento 5 g). Após a extração, 1/20 de cada extrato foi administrado i.p. para 5 camundongos e o efeito sobre os animais foi observado por 4 horas, segundo a metodologia proposta por Malone (MALONE E ROBICHAUD<sup>93</sup>, 1962).

O extrato bruto, o extrato metanólico e o extrato aquoso apresentaram os efeitos de apnéia, convulsão e morte, sendo que os dois primeiros apresentaram efeitos mais intensos. As preparações obtidas com a extração com hexano e acetato de etila não demonstraram efeito. O extrato metanólico apresentou efeito mesmo com a administração de 1/50 desse extrato.

A tabela 2 apresenta o rendimento do fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico da planta *P. elegans* em uma coluna de sílica gel, bem como os efeitos de cada fração. Apenas o extrato bruto (fração A) e a fração extraída com água (fração J), apresentaram efeitos biológicos como: apnéia, convulsão e morte. As frações B,C,D,E,F,G,H e I não apresentaram qualquer efeito detectado pelo método de Malone. (MALONE E ROBICHAUD<sup>93</sup>, 1962).

A figura 3 ilustra as cromatografias de camada delgada em sílica, realizadas com amostras do extrato bruto I e das frações B, C, D, E, F, G, H, I, comparadas com as amostras padrão de sorbarina e escutelareína. Verifica-se a presença de bandas com o mesmo  $r_f$  da sorbarina na fração D e da escutelareína (metabólito da sorbarina) na fração B.

Um cromatograma da filtração da fração polar da planta *P. elegans* (Vell.) Kuhlmann (fração J) em Sephadex LH-20 é apresentado na figura 4. A cromatografia evidenciou 5

Tabela 01: Atividade biológica de extratos de planta *P. elegans*

EXTRAÇÃO (SOLVENTE)	RENDIMENTO	EFEITOS		
		APNEIA	CONVULSÃO	MORTE
Pó da planta	130 g			
⇓				
Extrato Bruto I	20 g	++	++	++
⇓				
Extração com hexano	1 g			
⇓				
Extração com acetado de etila	1 g			
⇓				
Extração com metanol	10 g	++	++	++
⇓				
Extração com água	5 g	+	+	+

Os resultados acima expressam o rendimento da extração do pó da planta *P. elegans* com solventes com polaridade crescente. Após a extração, 1/20 (+) de cada extrato foi administrado i.p. para 5 camundongos e seu efeito foi observado por 4 horas. O extrato metanólico também apresentou efeito com a administração de 1/50 do extrato (++)

Tabela 02: Rendimento do fracionamento do extrato bruto da planta *P. elegans* em uma coluna de sílica gel e efeitos de cada fração.

EXTRAÇÃO (SOLVENTE)	RENDIMENTO	EFEITOS		
		APNÉIA	CONVULSÃO	MORTE
Acetato de Etila : Metanol				
A: extrato bruto	10 g	++	++	++
⇓				
B= 100 : 0	680 mg			
⇓				
C= 95:5	220 mg			
⇓				
D= 90:10	350 mg			
⇓				
E= 80:20	210 mg			
⇓				
F= 70:30	260 mg			
⇓				
G= 60:40	540 mg			
⇓				
H= 50:50	680 mg			
⇓				
I= 100:0	2,55 g			
⇓				
J= ÁGUA	1 g	+	+	+

Os resultados acima expressam o rendimento do fracionamento em coluna de sílica gel (3 x 30 cm) do extrato bruto hidroalcoólico da planta *P. elegans*. Após o fracionamento, 1/20 de cada fração foi administrado i.p. para 5 camundongos e seu efeito foi observado por 4 horas.

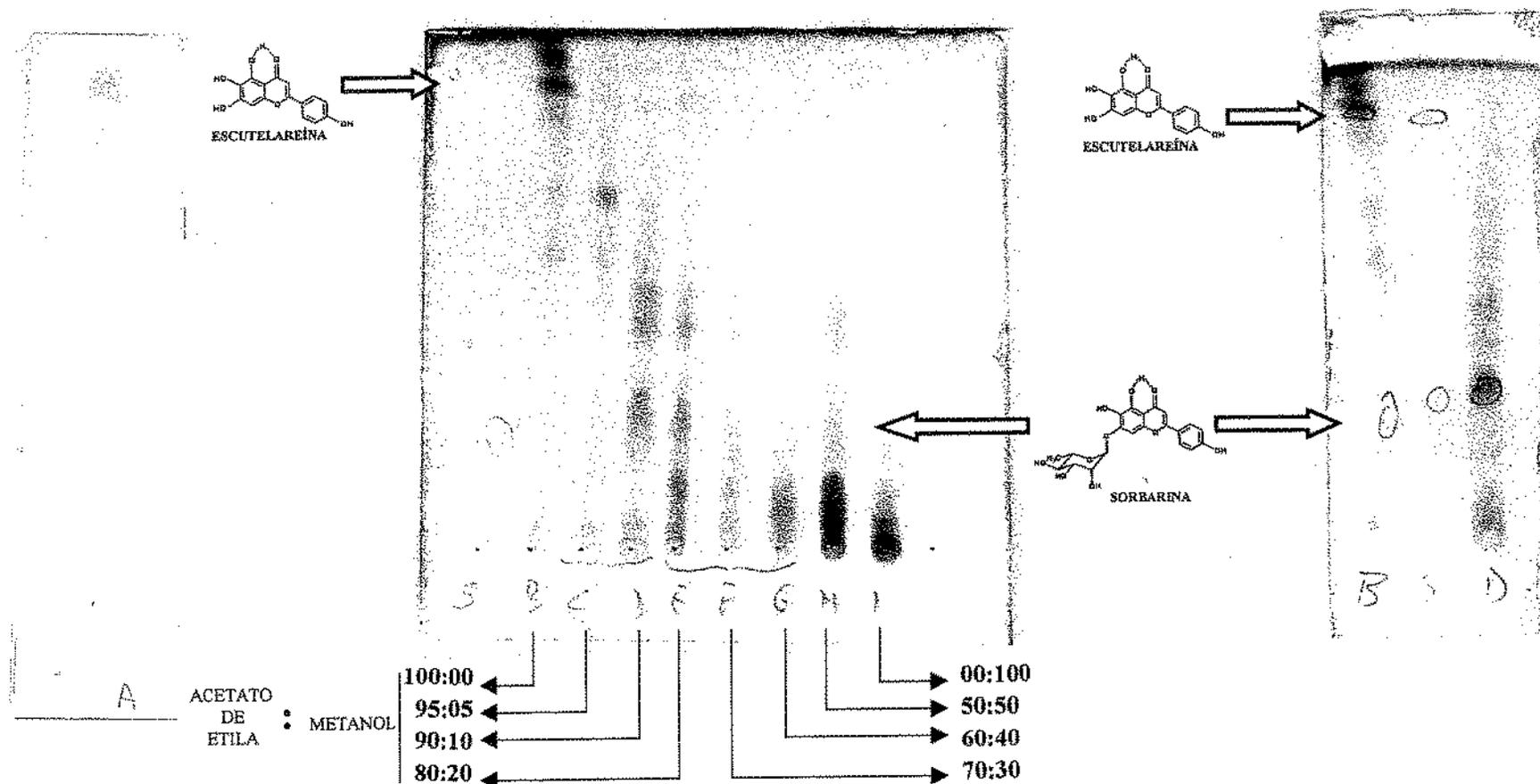


Figura 3. Extratos da planta *Pseudocalymma elegans*: Cromatografias em camada delgada de sílica eluídas com clorofórmio: metanol (7:3). A: extrato bruto, extração hidroalcoólica (70:30); B-I: fracionamento do extrato bruto em coluna de sílica gel eluída a vácuo com as misturas de acetato de etila: metanol descritas acima; S: padrão - Sorbarina.

picos relativos às frações eluídas em água, 3 frações eluídas num gradiente água/etanol e 6 eluídas em etanol absoluto.

A fração J-III, a mais abundante, foi recromatografada em coluna (100 x 2 cm) de Sephadex LH-20, e eluída apenas com água destilada, conforme representação na figura 5, onde se observa somente um pico, o que demonstra que esta fração é complexa e que seus eventuais componentes não podem ser fracionados por esta técnica.

Na tabela 3 pode-se verificar o rendimento e os efeitos comportamentais resultantes do fracionamento da fração J da planta *P. elegans* (Vell.) Kuhl in na coluna de Sephadex LH-20. Após a administração i.p. de 1/10 de cada fração a 5 camundongos e observação pelo método de Malone (MALONE E ROBICHAUD<sup>93</sup>, 1962), verificou-se que a administração das frações de I a X causou contorções abdominais, as frações de I a VIII e a X provocaram taquipnéia, as frações de I a VII provocaram tremores. Somente a administração concomitante das frações I a VII promoveram movimentos estereotipados e exoftalmia. As frações VIII e X resultaram em fechamento palpebral, e com administração conjunta de todas as frações I a XIV apareceram os sinais de contorção, piloereção, dificuldade de locomoção, elevação da pélvis, prostração, espasmos e morte. Estes resultados sugerem que os efeitos convulsivantes da planta são o resultado de um efeito de sinergismo de vários compostos individuais que, isoladamente, não causam estes efeitos se administrados nas mesmas concentrações de doses convulsivantes do extrato da planta.

As tabelas 4,5 e 6 apresentam os resultados da análise fitoquímica dos extratos etanólico e aquoso a 20% e também a caracterização química realizada com a fração J-III. Uma cromatografia bidimensional em camada delgada de celulose mostrou que a fração J-III é composta por 2 compostos majoritários (fig.6). As cromatografias de partição com solvente e filtração a vácuo em coluna de sílica ilustram que os compostos desta amostra são polares. O seu volume de eluição na cromatografia de filtração em Sephadex LH-10 sugere que os compostos do pico J-III tem um peso molecular entre 5.000 a 10.000 Daltons. Os resultados da análise fitoquímica, do extrato etanólico 20% de *P. elegans* (Vell.) Kuhl in, indicaram a presença de aminogrupos, esteróides e/ou triterpenos e glicosídeos flavônicos. As características organolépticas foram: cor, verde oliva; odor e sabor, mascarados pelo álcool e o pH de 5,5. O extrato aquoso, por sua vez, acusou a presença de aminogrupos, taninos e glicosídeos saponínicos. O pH foi também de 5,5 e as propriedades

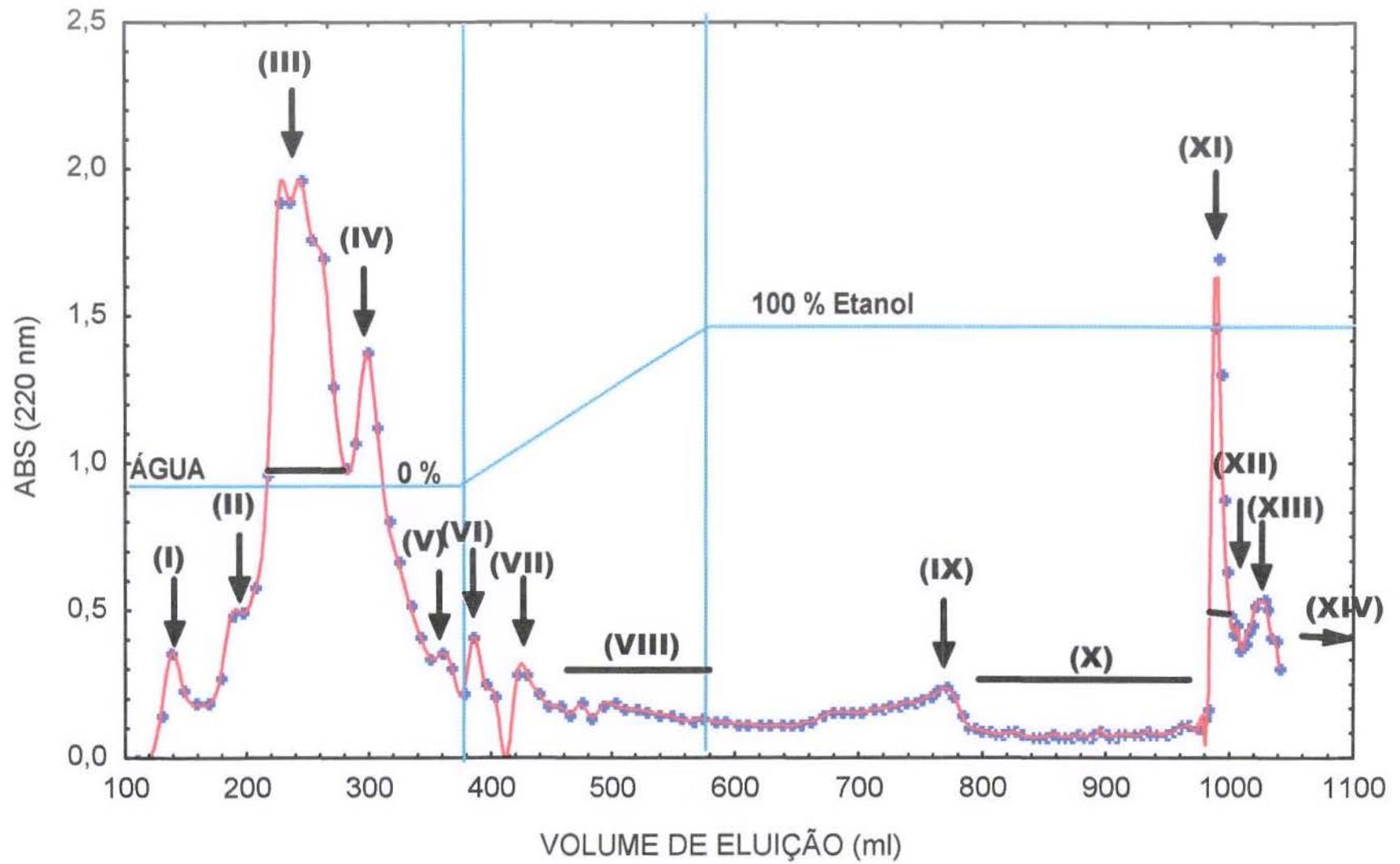


Figura 4. Cromatografia da fração polar da planta *P. elegans* (fração J) em Sephadex LH-20

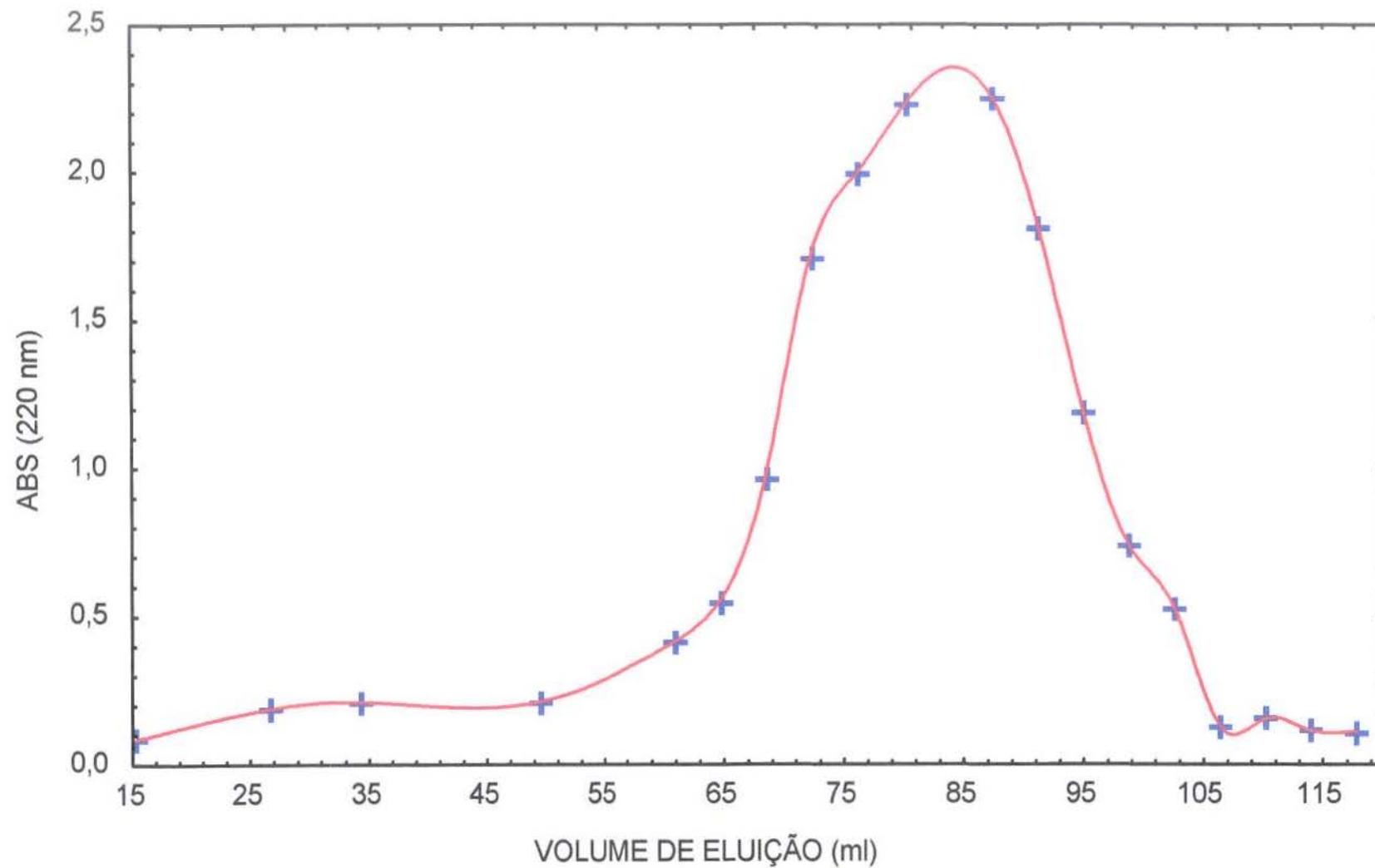


Figura 5. Recromatografia da fração J-III da planta *P. elegans* em Sephadex LH-20

Tabela 03: Rendimento e efeitos comportamentais resultantes do fracionamento da fração J da planta *P. elegans* em uma coluna de Sephadex LH-20.

Frações	I	II	III	IV	V	VI	VII	I-VII	VIII	IX	X	XI-XIV	I-XIV
Rendimento (mg)	132	198	1555	771	136	120	137	3049	179	456	242	571	4497
<u>Efeitos:</u>													
Contorções	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
Taquipnéia	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Tremores	X	X	X	X	X	X	X	X			X		
Estereotípias								X					
Exoftalmia								X					
Fechamento palpebral									X		X		
Piloereção													X
Dificuldade de locomoção													X
Elevação da pélvis													X
Prostração													X
Espasmos													X
Morte													X

Os resultados acima expressam o rendimento do fracionamento em coluna de filtração em gel (Sephadex LH-20, 4 x 30 cm) de 9 g da fração J que contém os compostos mais polares encontrados na planta *P. elegans*. Após o fracionamento, 1/10 de cada fração foi administrado i.p. para 5 camundongos e seu efeito foi observado por 4 horas. Para o agrupamento de frações I-VII e I-XIV foram administrados, respectivamente, 1/50 e 1/100 partes do total do material recuperado da coluna, que corresponde a aproximadamente ao valor proporcional da administração de cada fração isolada, por via i.p. a 5 camundongos cada.

Tabela 04: Análise fitoquímica do extrato etanólico 20% de *P.elegans*

---

PROPRIEDADE	RESULTADO
Organoléptica:	
Cor	Verde Oliva
Odor	Mascarado pelo álcool
Sabor	Mascarado pelo álcool
pH	5,5
Glicosídeos flavônicos	+
Esteróides e/ou Triterpenos	++
Alcalóides	-
Aminogrupos	++
Glicosídeos antraquinônicos	-
Pesquisa de Cumarinas	-

---

Tabela 05: Análise fitoquímica do extrato aquoso 20% de *P.elegans*

PROPRIEDADE	RESULTADO
Organoléptica:	
Cor	Castanho
Odor	Levemente adocicado
Sabor	Insípido
pH	5,5
Glicosídeos antociânicos	-
Glicosídeos saponínicos	++
Glicosídeos cianogenéticos	-
Pesquisa de taninos:	
com FeCl <sub>3</sub>	++
com NH <sub>4</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	++
com sol. de gelatina 2,5% em NaCl(0,09):	
com sais de chumbo	+
com formol-clorídrico	+
Pesquisa de aminogrupos	+
Pesquisa de ácidos fixos	-
Pesquisa de ácidos voláteis	-

Tabela 6: Caracterização química da fração J-III

PROPRIEDADE		MÉTODO
Polaridade	polar	solúvel em água e metanol
Peso molecular	5.000-10.000 Daltons	filtração em gel (Sephadex LH-20)
Número de componentes	2 majoritários	TLC bidimensional
Grupamentos aromáticos	-	espectro em UV
Grupo amina	++	reação com ninhidrina
Ácidos (fixos e voláteis)	++	
Carbohidratos	++ (6% do total)	fenol-sulfúrico
Heterosídeos antociânicos	-	
Heterosídeos flavônicos	-	
Saponina	-	
Taninos	+	cloreto férrico
	+	formol clorídrico
	-	gelatina

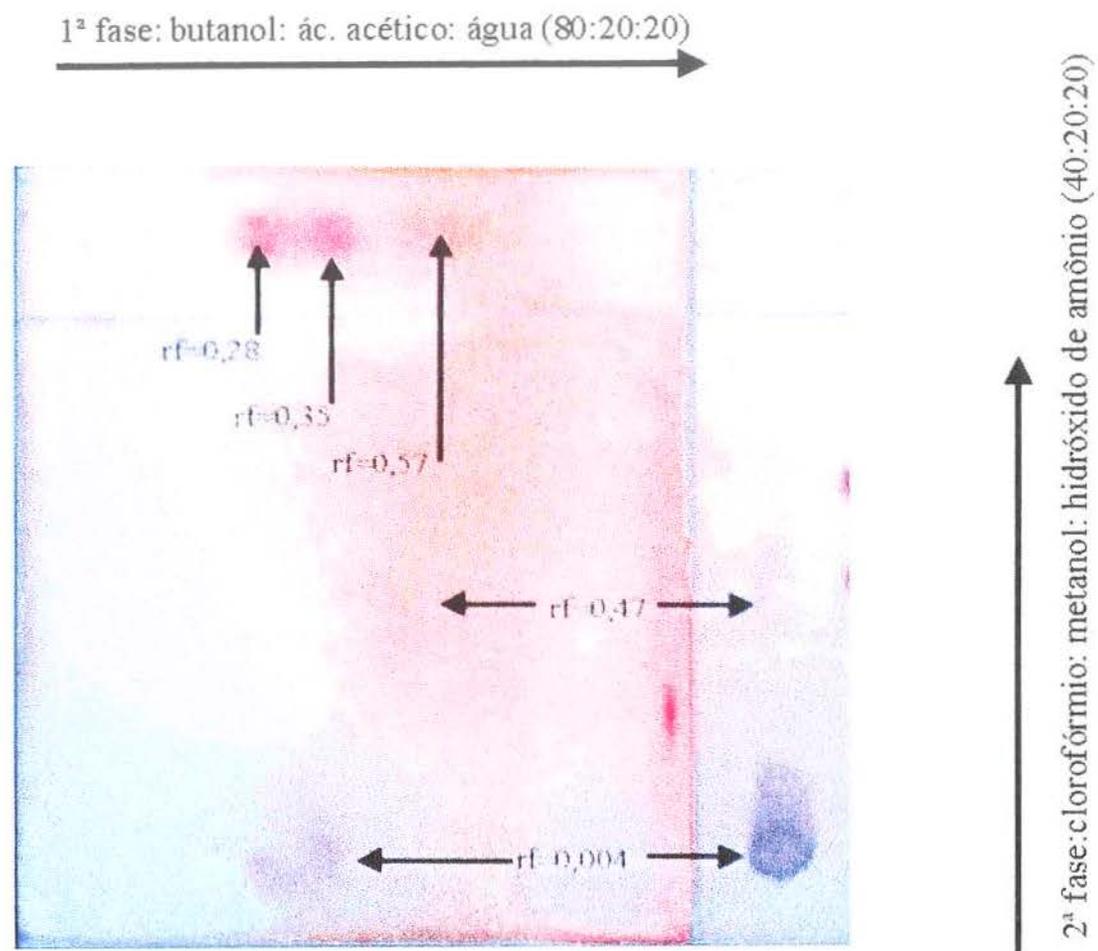


Figura 6. Cromatografia bidimensional da fração J-III em camada delgada de celulose.

organolépticas: cor castanho; odor levemente adocicado e sabor insípido. Entre os vários testes da marcha fitoquímica a fração J-III apresentou resultados positivos para o grupamento amina, para ácidos fixos e voláteis, para carboidratos e mostrou reação fracamente positiva para taninos. A figura 7, complementa as observações anteriores, mostrando as ausências de grupamentos aromáticos nesta fração em seu espectro de UV.

As tabelas 7 a 9 ilustram as alterações comportamentais produzidas pelo extrato bruto II e pela fração J-III da planta *P.elegans* (Vell.) Kuhlmann no teste Hipocrático de Irwin (IRWIN<sup>57</sup>,1968). A alantoína, também estudada com o mesmo protocolo não apresentou efeito significativo em nenhum dos 50 testes.

A tabela 7 ilustra as alterações comportamentais, significativas, induzidas pela administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* (Vell.) Kuhlmann em camundongos, sendo a maioria delas com a dose mais alta. Houve uma dificuldade de acomodação visual, com a maior dose do extrato, 1,80 mg/kg, no tempo 0, ou seja, na realização do teste logo após a administração do extrato, no tempo de 30 min e 60 min. Ocorreu fechamento palpebral nos tempos de 30, 90, 120 e 150 min com a dose de 1,80 mg/kg. A diminuição da atividade motora, da distância percorrida e da locomoção espacial ocorreu de maneira idêntica no tempo de 30 min. tanto com a dose de 1,35 como com a de 1,80 mg/kg, e no último teste ocorreu também no tempo de 0 min. com a maior dose. Os testes de reatividade, com diminuição das reações do animal foram: fuga ao toque, no tempo de 90 min., com a dose de 1,35 mg/kg e nos tempos de 30 e 150 min. com a dose de 1,80 mg/kg; aproximação do dedo do experimentador, no tempo de 0 min. nas doses de 0,45, 0,90 e 1,80 mg/kg.; retirada do dedo do experimentador, no tempo de 0 min. com as doses de 1,35 e 1,80 mg/kg e no tempo de 30 min. com a dose de 0,90 mg/kg.; beliscão na pata posterior no tempo de 60 min, nas doses de 0,90 e 1,80 mg/kg.; na transferência da 1ª para a 2ª bateria de experimentos nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min na dose de 1,8 mg/kg, e nos tempos 30 e 120 min. também na dose de 1,35 mg/kg. No teste de verificação do tônus muscular, através do manuseio do arame foram observadas alterações nos tempos 0 e 30 min. para as doses de 1,35 e 1,80 mg/kg, e na última dose, também nos tempos 60 e 90 min. A defecação foi diminuída nos tempos de 90 e 120 min, na dose de 0,45 mg/kg e no tempo de 150 min. nas doses de 0,90, 1,35 e 1,80 mg/kg.

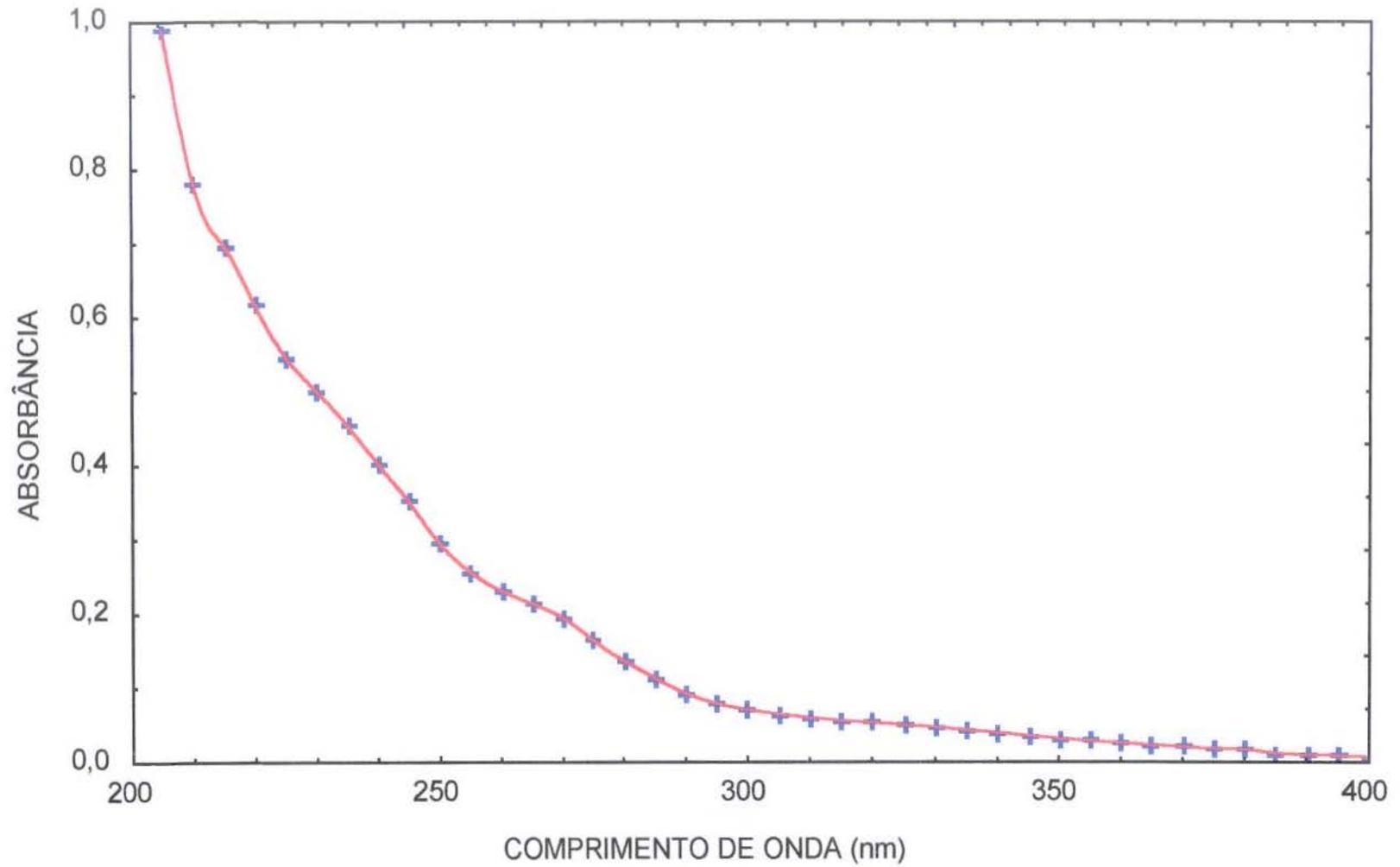


Figura 7. Espectro de ultra-violeta da fração J-III da planta *P. elegans*

Tabela 07: Alterações comportamentais induzidas pela administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* em camundongos

DOSE (g/kg)	ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS																								
	ACOMODAÇÃO VISUAL					FECHAMENTO PALPEBRAL					ATIVIDADE LOCOMOTORA					CORRIDA					FUGA AO TOQUE				
	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80
0 min	8	8	8	8	2*	0	0	0	0	0	6	6	5	6	6	70	70	68	26	70	4	5	4	3	4
30 min	8	8	8	8	2**	0	0	0	0	2*	6	5	4	2*	0*	56	70	60	16*	15*	4	5	4	4	2*
60 min	8	8	8	8	2*	0	0	0	0	1	4	4	4	0	0	55	37	55	23	14	4	4	5	4	2
90 min	8	8	8	8	8	0	0	0	0	3*	4	0	0	0	0	27	34	33	17	17	5	4	6	2*	2
120 min	8	8	8	8	8	0	0	0	0	3*	0	0	0	0	0	39	20	17	16	13	4	6	5	4	2
150 min	8	8	8	8	8	0	0	0	0	3*	0	0	0	0	0	28	20	29	13	15	4	5	5	4	2**
... continuação:																									
DOSE (g/kg)	LOCOMOÇÃO ESPACIAL					APROXIMAÇÃO DO DEDO					RETIRADA DO DEDO					TRANSFERÊNCIA					MANUSEIO DO ARAME				
	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80
	0 min	4	4	4	4	2**	2	2*	2*	2	2*	6	4	2	2*	0**	4	3,5	3	3	3	0	0	0	2**
30 min	4	4	2	2**	0**	2	2	2	2	1	4	4	5*	3	2	4	3	3,5	3***	0**	0	0	1	2**	3**
60 min	2	2	3	2	1	2	2	2	2	2	4	4	4	2	2	3,5	3,5	3	3	0**	0	0	1	1	4*
90 min	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	4	5	4	2	2	3	3	3	3	0,5*	0	0	0	1	4*
120 min	2	2	1	2	0	2	2	2	2	2	4	4	4	2	2	3	3	3	2*	0**	0	0	0	1	2
150 min	2	1	2	2	0	2	2	2	2	1	4	4	4	2	3	3	3	2	3	0	0	0	0	0	1
... continuação:																									
DOSE (g/kg)	BELISCÃO NA PATA POSTERIOR					DEFECAÇÃO																			
	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80															
	0 min	3	2	2	2	2	1	1	0	0,5	0														
30 min	4	2	2	2	2	0,5	0,5	0,5	0	0															
60 min	4	2	2*	2	1*	1	1	0	0,5	0															
90 min	4	2	2	2	1	1	0*	0	0	0															
120 min	3	2	2	2	2	1	0*	0	0	0*															
150 min	3	2	2	2	3	1	0	0*	0*	0*															

Grupos de 10 camundongos receberam por via i.p. solução salina (0 mg/kg) ou o extrato bruto (0,45-1,80 g/kg) e foram observados por 150 min de acordo com o protocolo de Irwin. Os valores representam as medianas dos escores. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , mostram a diferença significativa em relação ao grupo salina, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney.

A tabela 8 ilustra as alterações neurológicas, autonômicas e toxicológicas induzidas pela administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* (Vell.) Kuhl in camundongos. Nas alterações neurológicas houve um aumento na dificuldade de andar do animal: andar hipotônico, nos tempos 30 e 60 min. com a maior dose; andar atáxico, em todos os tempos com a dose de 1,80 mg/kg e nos tempos 30 e 60 min. com a dose de 1,35 mg/kg; e uma crescente dificuldade de andar (total incapacidade de andar), em todos os tempos nas doses de 1,35 e 1,80 mg/kg, nos tempos 0,90,120 e 150 min. com a dose de 0,90 mg/kg e tempo 0 min. na dose de 0,45 mg/kg; diminuição da força ao agarrar, no tempo 0 min. com a maior dose; na elevação da cauda, na dose de 1,80 mg/kg, nos tempos 30 e 60 min. e diminuição do tônus corporal, no tempo de 90 min nas dose de 1,35 e 1,80 mg/kg e no tempo de 0 min. para a última dose. A alteração autonômica ocorrida foi a hipotermia no tempo 0 min. com a dose de 0.90 mg/kg, e no tempo 60 min. nas doses de 1,35 e 1,80 mg/kg. As alterações toxicológicas, ocorrência de convulsão e morte, apareceram no tempo 30 min. com a maior dose (5) e 1 no tempo 0 min.

A tabela 9 ilustra as alterações comportamentais, neurológicas e autonômicas, significativas, induzidas pela administração da fração J-III da planta *P. elegans* (Vell.) Kuhl in camundongos. As alterações comportamentais se constituíram em diminuição a reação ao toque da córnea, nos tempos de 30 e 60 min. na dose de 300 mg/kg e no tempo de 60 min. com a maior dose de 500 mg/k; no aumento da imobilidade provocada nos tempos de 60, 90 e 120 min. nas doses de 150, 300 e 500 mg/kg; em aumento da dificuldade em permanecer no arame, nos tempos de 30, 60 e 90 min. para as dose de 150 e 500 mg/kg e nos tempos de 30 e 60 min para a dose de 300 mg/kg; e diminuição da micção no tempo 0 min. na dose de 500 mg/kg. As alterações neurológicas se traduziram pela diminuição da força ao agarrar, no tempo de 30 e 60 min. com a dose de 150 mg/kg, de 60 min. na dose de 300 mg/kg e no tempo de 30 min. com a dose de 500 mg/kg; diminuição do tônus abdominal nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. para as doses de 150,300 e 500 mg/kg, sendo esta última também afetada aos 150 min; diminuição do tônus corporal, em todos os tempos, com exceção do tempo 0 min. e para todas as doses da fração J-III. Como alteração autonômica verificou-se hipotermia nos tempos 30 e 60 min. para as doses de 150 e 500 mg/kg, nos tempos de 60 e 90 min. para a dose de 300 mg/kg e no tempo de 90 min. para a dose de 500 mg/kg.

Tabela 08: Alterações neurológicas, autonômicas e toxicológicas induzidas pela administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* em camundongos

DOSE (g/kg)	ANDAR HIPOTÔNICO					ANDAR ATÁXICO					ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS ELEVAÇÃO DA CAUDA					FORÇA AO AGARRAR					TOTAL INCAPACIDADE PARA ANDAR				
	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80
0 min	1	1	2	3	2	2	2	2	2	4**	3	4	4	2	4	6	6	4	6	3**	0	2*	2**	4**	4***
30 min	2	1	2	4	5*	2	2	2	2*	4**	2	2	3	2	0*	6	4	5	5	2	0	0	2	4**	8**
60 min	2	1	2	3	5*	2	2	2	2*	4**	2	2	3	2	0*	6	6	5	5	3	0	0	2	3*	6**
90 min	2	2	2	3	5	2	2	2	2*	4*	2	2	2	2	0	6	6	5	6	4	0	1	2*	4*	8*
120 min	2	1	2	3	5	2	2	2	2	4*	2	0	3	0	0	6	6	5	6	4	1	0	2*	4**	6*
150 min	2	2	2	3	5	2	2	2	2	4*	2	1	0	0	1	6	6	6	6	4	0	2	2**	4**	6*

... continuação:

DOSE (g/kg)	TÔNUS CORPORAL					ALTERAÇÃO AUTONÔMICA HIPOTERMIA					ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS CONVULSÃO E MORTE				
	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80	0	0,45	0,90	1,35	1,80
0 min	4	4	3	3	2**	0/10	2/10	5/10*	2/10	4/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10
30 min	2	2	2	2	2	3/10	6/10	5/10	6/10	2/4	0/10	0/10	0/10	0/10	5/10*
60 min	4	2	2	2	2	2/10	6/10	6/10	8/10*	4/4*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
90 min	4	2	3	2*	2*	2/10	4/10	5/10	7/10	3/4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
120 min	4	2	4	3	2	2/10	3/10	3/10	4/10	2/4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
150 min	4	4	4	3	2	2/10	3/10	3/10	3/10	2/4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Grupos de 10 camundongos receberam por via i.p. solução salina (0 mg/kg) ou o extrato (0,45-1,80 g/kg) e foram observados por 150 min de acordo com o protocolo de Irwin. Os valores representam as medianas dos escores, exceto para os escores de hipotermia, convulsão e morte onde está expresso o número de ocorrência/número total de casos observados. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , mostram a diferença significativa em relação ao grupo salina, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney, exceto para os valores de hipotermia, convulsão e morte, analisados pelo teste exato de Fisher.

Tabela 09: Alterações induzidas pela administração da fração J-III da planta *P. elegans* em camundongos.

DOSE (mg/kg)	ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS															
	REAÇÃO AO TOQUE DA CÔRNEA				IMOBILIDADE PROVOCADA				MANUSEIO DO ARAME				MICÇÃO			
	0	150	300	500	0	150	300	500	0	150	300	500	0	150	300	500
0 min	5	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	13/30	13/30	8/30	5/30*
30 min	4	2	2**	2	0	0	0	0	0	2***	2**	2**	12/30	10/30	15/30	11/30
60 min	4	2	2*	2**	0	1**	1**	1**	0	2**	2*	2***	16/30	15/30	8/30	9/30
90 min	4	2	3	2	0	1**	1**	1***	0	2*	0	2**	14/30	16/30	17/30	11/30
120 min	5	6	5	3	0	1*	1*	1**	0	0	0	0	14/30	14/30	10/30	10/30
150 min	4	5	3	2	0	0,5	0	0,5	0	0	0	0	18/30	13/30	16/30	11/30

...continuação:

DOSE (mg/kg)	ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS												ALTERAÇÃO AUTONÔMICA			
	FORÇA AO AGARRAR				TÔNUS ABDOMINAL				TÔNUS CORPORAL				HIPOTERMIA			
	0	150	300	500	0	150	300	500	0	150	300	500	0	150	300	500
0 min	6	6	5	6	4	4	4	4	4	4	4	4	0/10	0/10	0/10	0/10
30 min	6	4**	4	4***	4	2**	2*	2***	4	2***	2**	2***	0/10	7/10**	4/10	9/10***
60 min	6	4**	4**	4	4	2***	2***	2***	4	2***	2***	2***	0/10	9/10***	9/10***	10/10***
90 min	6	4	4	4	4	2***	2**	2***	4	2***	2***	2***	0/10	4/10	8/10***	9/10***
120 min	6	4	4	4	4	2**	2*	2***	4	2**	2*	2***	0/10	0/10	2/10	1/10
150 min	6	4	4	4	4	3	4	2***	4	2**	2*	2**	0/10	0/10	0/10	0/10

Grupos de 10 camundongos receberam por via i.p. solução salina (0 mg/kg) ou a fração J-III (150-300 mg/kg) e foram observados por 150 min de acordo com o protocolo de Irwin. Os valores representam as medianas dos escores, exceto para os escores de micção e hipotermia onde está expresso o número de ocorrência/número total de casos observados. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , mostram a diferença significativa em relação ao grupo salina, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney, exceto para os valores de micção e hipotermia analisados pelo teste exato de Fisher.

A figura 8 ilustra a DL<sub>50</sub> (dose letal mediana) do extrato bruto II da planta *P. elegans* (Vell.) Kuhl. A DL<sub>50</sub> encontrada foi de 1,82 g/kg. Após a administração i.p. de doses de 1,6; 1,8; 2,0 e 3,0 g/kg. Os animais corriam em suas gaiolas, muitas vezes esticando as patas traseiras e andando com elevação pélvica. Poucos minutos após o recebimento das doses maiores do que 1,6 g/kg alguns animais apresentavam convulsões e morriam. As convulsões consistiam de movimentos orais e faciais seguidos de estiramento de todo o corpo. A duração das convulsões não era maior do que 2 min. e na maioria dos casos, seguidas de morte. A morte ocorria, em quase todos os casos, 8 min. após a administração do extrato e esta latência independia da dose. Apenas 3 casos, das 25 mortes ocorreram 1 a 2 dias após a administração do extrato.

Experimento paralelo foi realizado com 14 camundongos que receberam 3,5 a 9,0 g/kg do extrato por via oral. Os mesmos sinais de intoxicação foram observados, porém 10 a 60 min. após a administração. A dose letal mediana foi 3 vezes maior comparada com a administração i.p.

A tabela 10 resume as principais características farmacológicas dos compostos encontrados na planta *P. elegans*. O extrato apresentou efeitos significativos sobre diferentes testes, quando administrado i.p. 1g/kg: diminuiu em 31% a movimentação espontânea, em 50% o tônus muscular, em 80% a atividade exploratória de levantar em campo aberto, em 31% do número total de entradas nos braços abertos e fechados e 47% na permanência de tempo no braço aberto do labirinto em cruz elevado. Por outro lado, aumentou em 62% o tempo no braço fechado, neste mesmo teste bem como o tempo parado, 400% no campo aberto. Nos testes de memória, quando administrado logo após o treino, aumentou os escores de retenção, ou seja, melhorou a consolidação da memória em 72% no teste de habituação a um ambiente novo e em 150% na tarefa de esquiiva inibitória. A fração I-III na dose de 0,5 g/kg via i.p. diminuiu em 35% o tônus muscular e não apresentou resultados significativos em relação a movimentação espontânea e a tarefa de esquiiva passiva. A alantoina não apresentou alterações significativas em nenhum dos testes citados anteriormente para o extrato. A triumboídina e a sorbarina, apresentaram um aumento de 28 e 30 % sobre o tempo de catatonía, respectivamente, sendo que a última

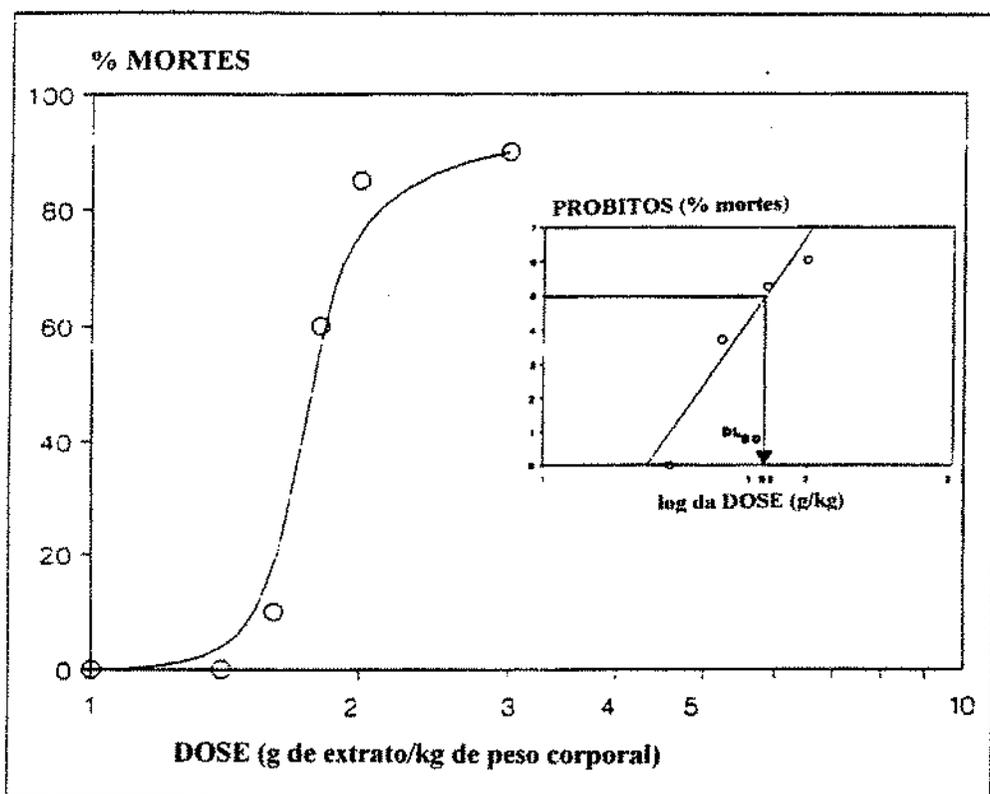


Figura 8. Dose letal mediana do extrato bruto da planta *P.elegans* . Os dados se referem a grupos de 10 a 14 camundongos por grupo. DL50 = 1,82 g/kg.

Tabela 10: Efeitos de Compostos Isolados da Planta *P. elegans* sobre o comportamento de camundongos e ratos

EFEITOS	SUBSTÂNCIAS ADMINISTRADAS					
	Extrato	J-III	Alantoína	Triumboidina	Sorbarina	Cafeína +
Movimentação espontânea	↓ 31%	NS	NS	NS	NS	-
Teste de tônus muscular	↓ 50%	↓ 33%	NS	NS	NS	-
Tempo de catatonia		-	NS	↑ 28%	↑ 30%	-
Comportamento em um campo aberto						
Atividade locomotora	NS	-	NS	NS	NS	-
Levantar	↓ 80%	-	NS	NS	NS	-
Tempo parado	↑ 400%	-	NS	NS	NS	-
Labirinto em cruz elevado						
Número total de entradas nos braços abertos + fechados	↓ 31%	-	NS	NS	NS	-
% entradas nos braços abertos	↓ 31%	-	NS	NS	NS	-
% tempo no braço aberto	↓ 47%	-	NS	NS	NS	-
% tempo no braço fechado	↑ 62%	-	NS	NS	NS	-
Testes de memória						
Habituação a caixa de movimentação espontânea	↑ 72% *	-	NS	-	-	↑ 80% *
Habituação a um campo aberto	-	-	NS #•	NS #•	NS #•	-
Esquiva ativa	-	-	NS #•	-	↑ 43 % *#•	-
Labirinto aquático espacial de Morris	-	-	-	-	-	↑ 50% *•
Esquiva passiva	↑ 150% *	NS	-	-	-	357%*

Grupos de 18 a 20 camundongos receberam veículo ou extrato bruto 1 g/kg, J-III 0,5 g/kg, alantoína 40 mg/kg, sorbarina 4 mg/kg ou triumboidina 4 mg/kg, e foram submetidos a diferentes testes comportamentais. A cafeína (+) foi estudada como um modelo de droga que têm os mesmos mecanismos de ação da aglicona da sorbarina. Para cada teste foram utilizados animais diferentes. A tabela apresenta o percentual de aumento (↑) ou redução (↓) significativa nos escores de cada teste comparado com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , teste de Kruskal Wallis ANOVA seguido pelo teste de Mann-Whitney). (NS) efeito não significativo; (-) teste não realizado; (\*) escore de retenção com drogas administradas logo após a sessão de treino. Todos as drogas foram administradas por via i.p. com exceção do teste de esquiva ativa para alantoína, sorbarina e tribundoina (#) onde foram administrados 7 ug da droga no hipocampo dorsal (bilateral) de rato (•).

apresentou um aumento de 43% no escore de retenção do teste de habituação a um campo aberto, quando injetada a dose de 7 µg no hipocampo dorsal (bilateral) de rato. A cafeína, estudada como modelo de droga com os mesmos mecanismos da aglicona da sorbarina, aumentou os escores de retenção nas tarefas de memória: em 80% na habituação a um ambiente novo (caixa de movimentação espontânea), 50% no labirinto aquático de Morris, em ratos, e em 357% na esquivia inibitória.

Os resultados de alguns testes comportamentais realizados com o extrato da planta *P.elegans* bem como com alguns princípios ativos que foram expressos resumidamente na tabela 10 estão apresentados com maiores detalhes em anexos.

O anexo 5 ilustra o efeito da administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* sobre o comportamento de camundongos em um campo aberto. Os camundongos receberam i.p. 1g/kg do extrato da planta ou veículo (DMSO 20% em NaCl 0,09%) e 30 min após foram observados por 5 min no campo aberto. Os resultados estão expressos como média + EPM, onde se verifica uma diminuição do comportamento exploratório de levantar dos camundongos que receberam o referido extrato quando comparado com o grupo veículo ( $p \leq 0,001$  teste t de Student); e um aumento significativo do tempo parado do grupo que recebeu o extrato bruto II comparado ao grupo veículo ( $p \leq 0,05$  teste t de Student).

No anexo 6 observa-se o efeito da administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* sobre o comportamento de camundongos em um labirinto em cruz elevado. Os camundongos receberam 1g/kg (i.p.) do extrato da planta ou veículo e 35 min após foram observados por 5 min no labirinto em cruz elevado. Os resultados estão expressos como média + EPM. O teste t de Student mostrou diferenças significativas de todos os parâmetros observados quando comparados ao grupo veículo ( $p \leq 0,01$ ). O grupo que recebeu o extrato bruto II apresentou diminuição do número total de entradas, das porcentagens de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos do labirinto e um aumento da porcentagem de permanência nos braços fechados em relação ao grupo veículo.

Os resultados apresentados no anexo 7 ilustram o efeito da administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* sobre o comportamento de camundongos na atividade locomotora espontânea. Os camundongos receberam 1g/kg i.p. do extrato da planta

apresentaram uma redução significativa no número de cruzamentos quando comparados com o grupo veículo ( $p \leq 0,05$ , teste t de Student).

No anexo 8 verifica-se a ausência de efeito da administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* sobre o tônus muscular de camundongos ( $p > 0,2$ , teste U de Mann-Whitney). Estes receberam 1g/kg i.p. do extrato da planta ou veículo e 45 min após foram dependurados pelas patas anteriores em um arame esticado e observados.

Como pode ser observado nos anexos 9 a 13, nenhum dos princípios ativos testados foi efetivo em alterar significativamente os escores do teste do campo aberto, movimentação espontânea, tônus muscular e catatonia ( $p > 0,2$ , Kruskal Wallis ANOVA).

No anexo 9 pode-se observar a ausência de efeito da administração dos princípios ativos da planta *P. elegans* sobre o teste de campo aberto. Os camundongos receberam 4 mg/kg de alantoína, sorbarina, triunboidina ou do veículo (i.p.) 30 min antes do teste (dados paramétricos: Kruskal Wallis ANOVA  $p > 0,2$ ; dados não paramétricos: ANOVA  $p > 0,2$ ).

A alantoína aumentou significativamente a porcentagem de tempo despendido nos braços fechados do labirinto em cruz elevado ( $p \leq 0.05$  comparado ao grupo veículo, teste de Newman-Keuls, precedido por ANOVA DE UMA VIA). O anexo 10 ilustra este efeito da administração dos compostos alantoína, sorbarina e triumoidina, isolados da planta *P. elegans* sobre o comportamento de camundongos em um labirinto em cruz elevado. Os camundongos receberam 4 mg/kg i.p. dos referidos princípios 35 min antes dos teste.

O anexo 11 ilustra o efeito da administração de compostos isolados da planta *P. elegans* sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos. Após 40 min da administração i.p. dos princípios ativos acima mencionados os animais foram submetidos ao teste e observados durante 5 min. O tratamento com estes compostos não-alterou a atividade locomotora dos animais ( $p > 0,2$ , teste de Newman-Keuls, precedido por ANOVA de uma via).

O anexo 12 ilustra o efeito da administração dos compostos isolados da planta *P. elegans* sobre o tônus muscular de camundongos. Após 45 min da administração i.p. dos princípios ativos acima mencionados os animais foram submetidos ao teste. O tratamento

com estes compostos não-alterou o tônus muscular dos animais ( $p > 0,2$ , teste de Mann-Whitney, precedido por Kruskal Wallis ANOVA)

No anexo 13 verifica-se a ausência de efeito decorrente da administração dos compostos isolados da planta *P. elegans* sobre o teste de catatonía em camundongos ( $p > 0,2$ , teste de Newman-Keuls, precedido por ANOVA de uma via). Após 50 min da administração i.p. dos princípios ativos acima mencionados os animais foram submetidos ao teste.

A figura 9 ilustra o efeito da administração i.p. do extrato bruto II da planta *P. elegans* (Vell.) Kuhlman após as sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de habituação, do comportamento exploratório de levantar (número de ocorrências) dos camundongos. Uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,108) = 11,48$ ,  $p \leq 0,001$ , do tratamento com extrato  $F(1,27) = 7,02$ ,  $p \leq 0,05$ , e também na interação entre tratamento e a medida repetida,  $F(4,108) = 3,11$ ,  $p \leq 0,05$ , confirmado pelo teste “post-hoc” de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). Um experimento em paralelo mostrou que a administração do extrato no mesmo esquema acima, uma dose diária por 5 dias, porém sem o treinamento correspondente, não alterou significativamente os escores do comportamento de levantar do grupo de animais expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

A figura 10 ilustra o efeito da administração i.p. do extrato bruto II de da planta *P. elegans* (Vell.) Kuhlman após as sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de ambulação, comportamento exploratório (número de cruzamentos) dos camundongos. Uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,108) = 5,03$ ,  $p \leq 0,001$ , mas não houve efeito no tratamento com extrato  $F(1,27) = 2,62$ ,  $p \geq 0,2$ , e também não houve interação entre o tratamento e a medida repetida,  $F(4,108) = 0,77$ ,  $p \geq 0,2$ . Um experimento em paralelo mostrou que a administração do extrato no mesmo esquema acima, com doses diárias por 5 dias, porém sem o treinamento correspondente, também não alterou significativamente os escores do comportamento de ambulação de um grupo de animais expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

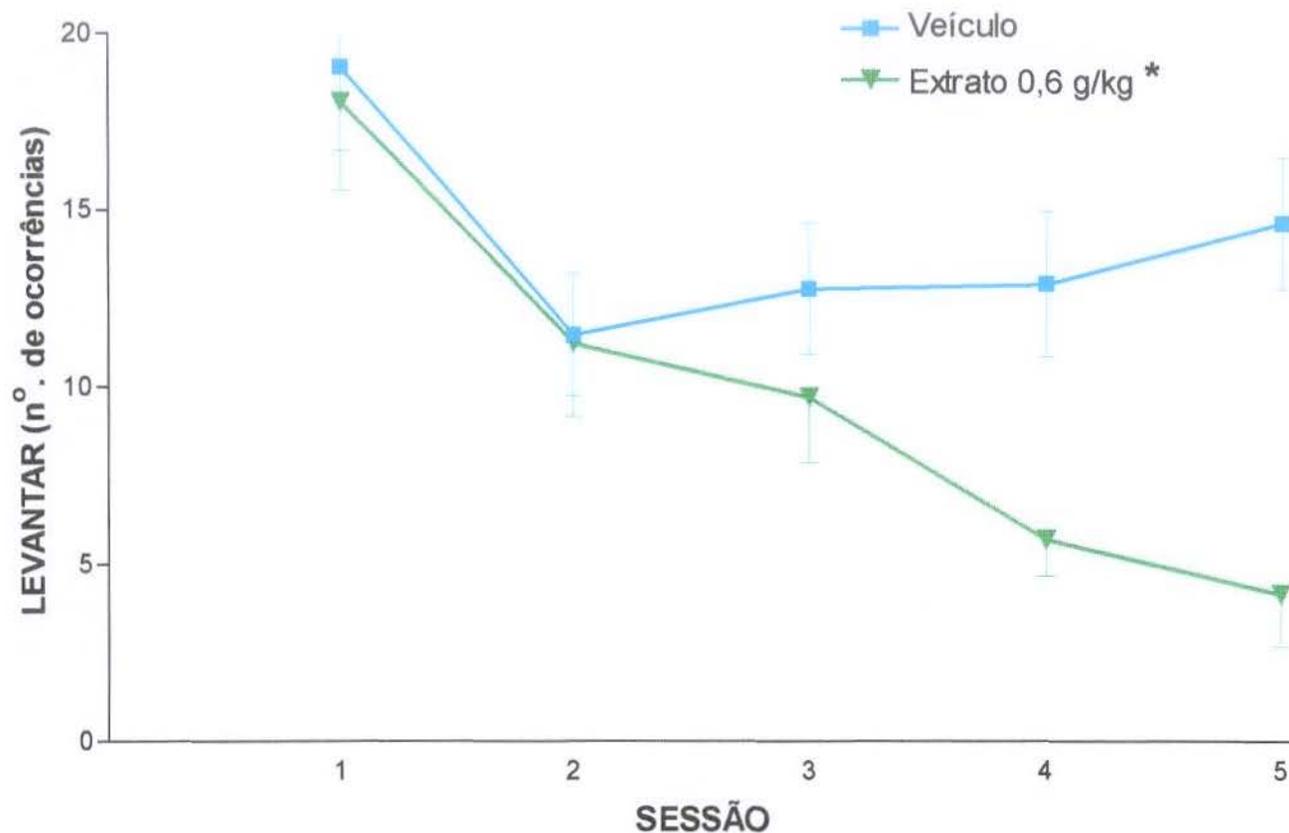


Figura 9. Efeito da administração i.p. do extrato de *P.elegans* após as sessões de treino na tarefa da habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de habituação - levantar (número de ocorrências)  $\pm$  EPM de 14-15 camundongos por grupo. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,108) = 11,48$ ,  $p \leq 0,001$ , do tratamento com extrato  $F(1,27) = 7,02$ ,  $p \leq 0,05$ , e também na interação, entre tratamento e a medida repetida,  $F(4,108) = 3,11$ ,  $p \leq 0,05$ , confirmado pelo teste post-hoc de Duncan (\*  $p \leq 0,05$ ). Um experimento em paralelo mostrou que a administração do extrato no mesmo esquema acima, uma dose diária por 5 dias, porém sem o treinamento correspondente, não alterou significativamente os escores de levantar de um grupos de animais expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

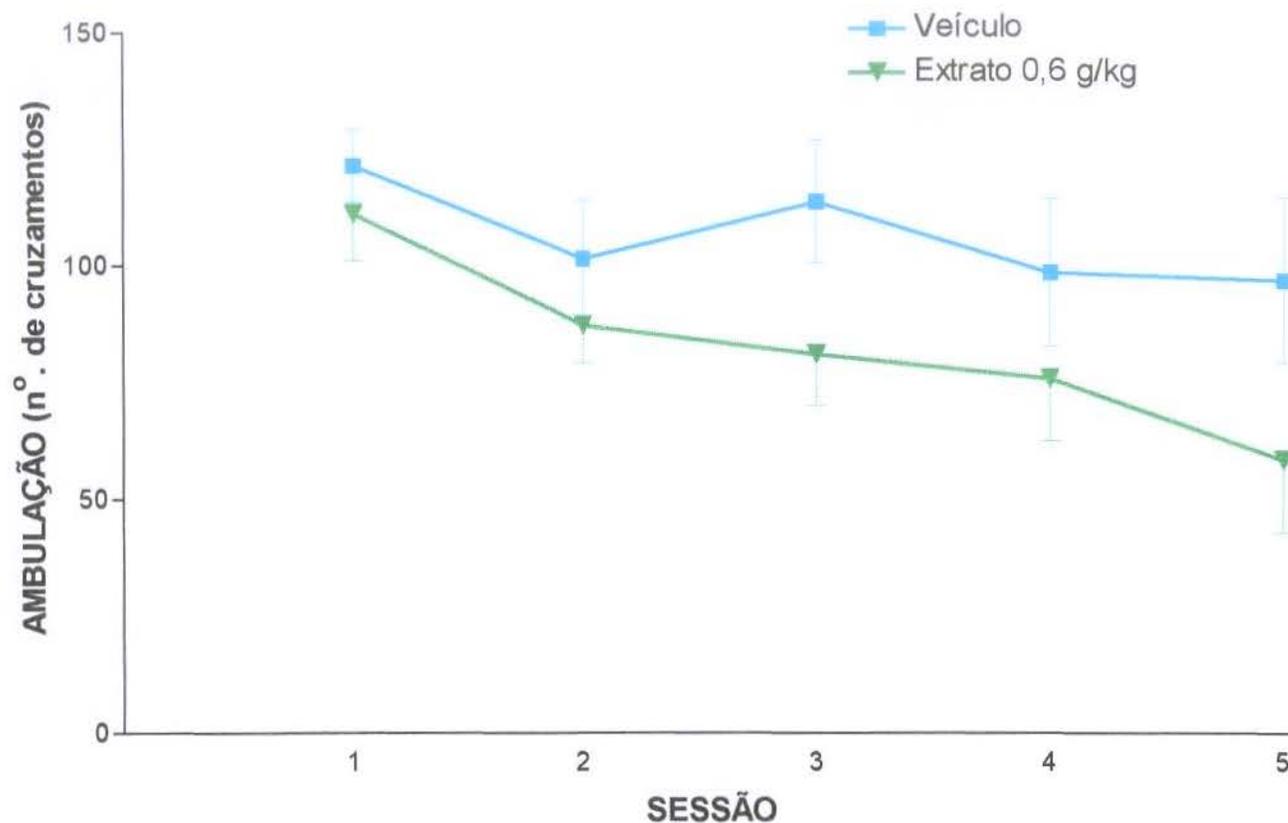


Figura 10. Efeito da administração i.p. do extrato de *P.elegans* após as sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de ambulação (número de cruzamentos)  $\pm$  EPM de 14-15 camundongos por grupo. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,108) = 5,03$ ,  $p \leq 0,001$  mas não houve efeito no tratamento do extrato  $F(1,27) = 2,62$ ,  $p \geq 0,2$ , e também não houve interação entre o tratamento e a medida repetida,  $F(4,108) = 0,77$ ,  $p \geq 0,2$ . Um experimento em paralelo mostrou que a administração do extrato no mesmo esquema acima, com doses diárias (5 dias), porém sem o treinamento correspondente, também não alterou significativamente os escores de ambulação de um grupo de animais expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

A figura 11 ilustra o efeito da administração i.p. do extrato bruto da planta *P. elegans* imediatamente após a sessão de treino sobre a retenção da tarefa de esQUIVA inibitória. A dose de 0,6 g/kg aumentou os escores de retenção desta tarefa ( $p \leq 0,05$  comparado ao grupo salina; teste U de Mann-Whitney precedido pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA).

A figura 12 ilustra o efeito da administração i.p. da fração J-III da planta *P. elegans*, imediatamente após a sessão de treino, sobre a retenção da tarefa de esQUIVA inibitória. Não houve efeito significativo com nenhuma das doses administradas. (Kruskal-Wallis ANOVA:  $H(4,72) = 3,77$ ;  $p \geq 0,2$ ).

A figura 13 ilustra o efeito da administração i.p da alantoína 30 min antes das sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam a porcentagem de ambulação comparado com os escores médios da primeira sessão. Uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(3,165) = 7,16$ ,  $p \leq 0,001$ , mas nenhum efeito significativo do tratamento com alantoína  $F(3,55) = 0,22$ ,  $p \geq 0,2$ . Não houve interação entre o tratamento e a medida repetida,  $F(9,165) = 0,81$ .

A figura 14 ilustra o efeito da administração i.p. da alantoína 30 min antes das sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios da habituação, no comportamento exploratório de levantar (número de ocorrências) dos animais. Uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(3,84) = 4,55$ ,  $p \leq 0,01$ , mas não houve efeito no tratamento da alantoína  $F(1,28) = 1,11$ ,  $p \geq 0,2$ , e também não houve interação entre tratamento e a medida repetida,  $F(3,84) = 1,49$ ,  $p \geq 0,2$ .

A figura 15 ilustra o efeito da administração de 7 µg/lado dos princípios isolados da planta *P. elegans* (Vell.) Kuhl: sorbarina, alantoína, triumboidina ou veículo no hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após a sessão de treino, sobre a habituação a um ambiente novo. Os resultados, do comportamento exploratório de levantar, estão expressos como média  $\pm$  E.P.M na sessão de teste. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos. ANOVA de uma via: treino -  $F(3,33) = 0,88$ ; teste -  $F(3,33) = 0,61$ .

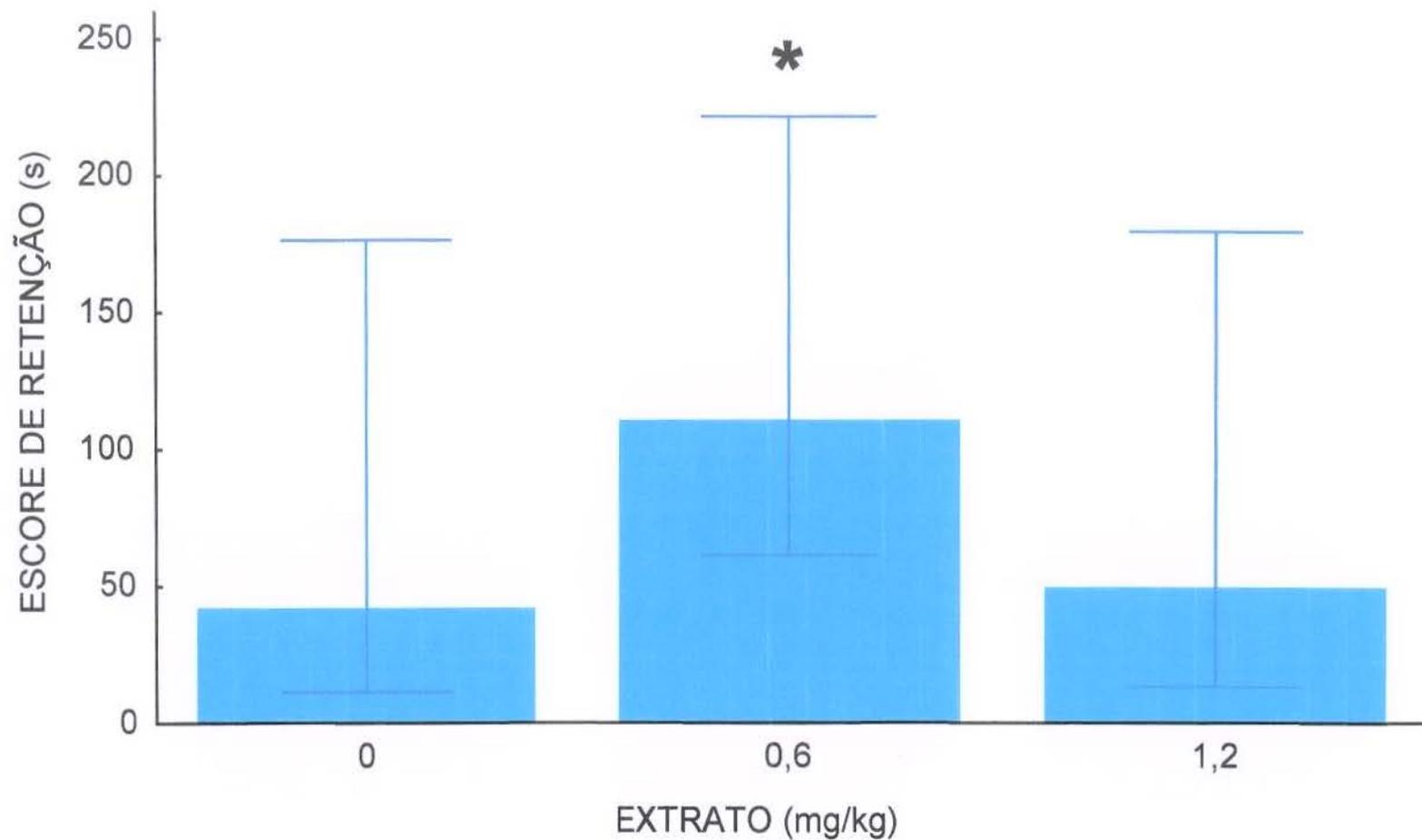


Figura 11. Efeito da administração i.p. do extrato bruto da planta *P. elegans* imediatamente após a sessão de treino sobre a retenção da tarefa de esquiva inibitória. Estes resultados representam as medianas (intervalos interquartis) de 19-24 camundongos por grupo. \*  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo salina; teste U de Mann-Whitney precedido pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA.

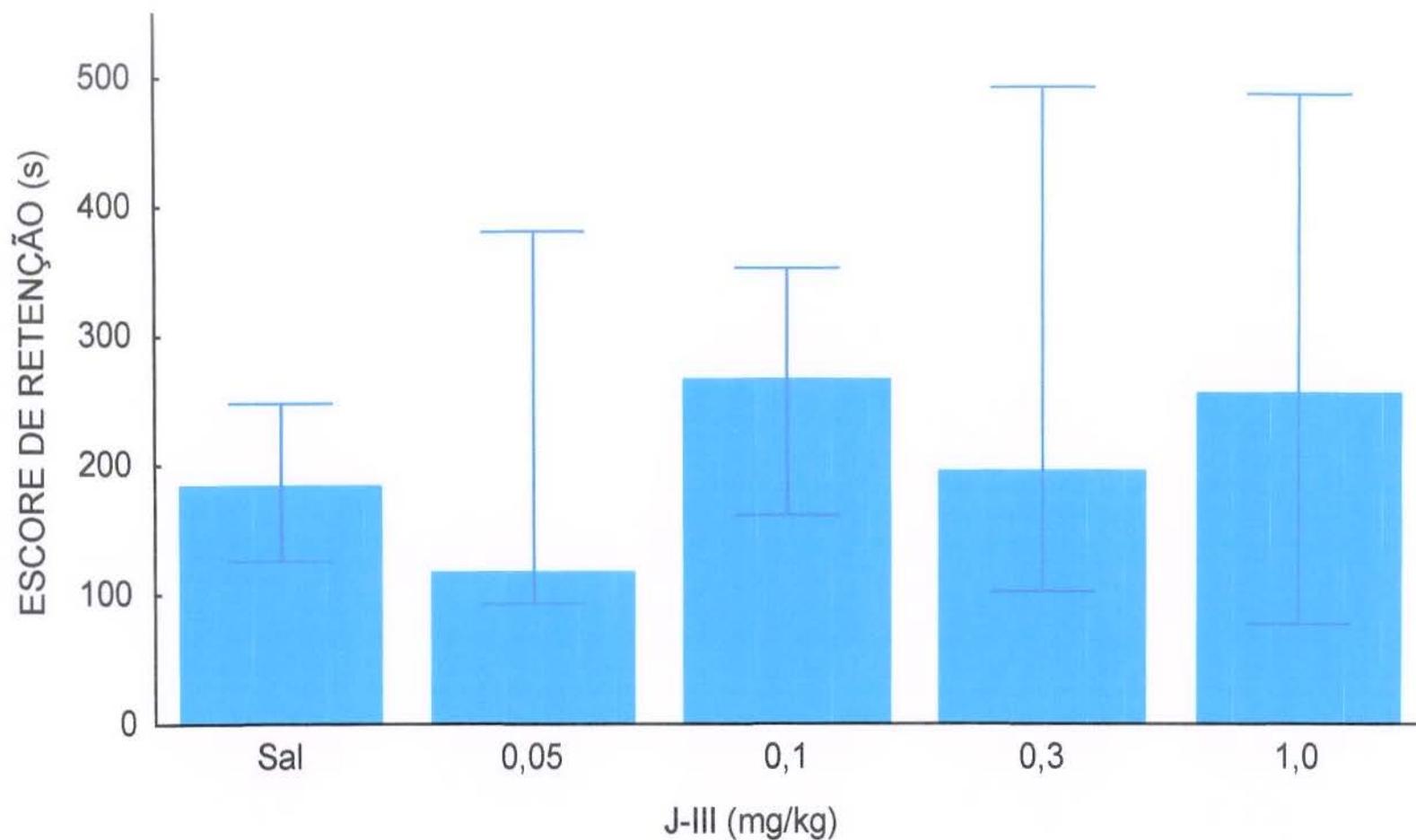


Figura 12. Efeito da administração i.p. da fração J-III da planta *P. elegans*, imediatamente após a sessão de treino, sobre a retenção da tarefa de esquiva inibitória. Estes resultados representam as medianas ( intervalos interquartis) de 12 a 15 camundongos por grupo. Não houve efeito significativo (Kruskal-Wallis ANOVA:  $H(4,72) = 3,77$ ;  $p \geq 0,2$ ).

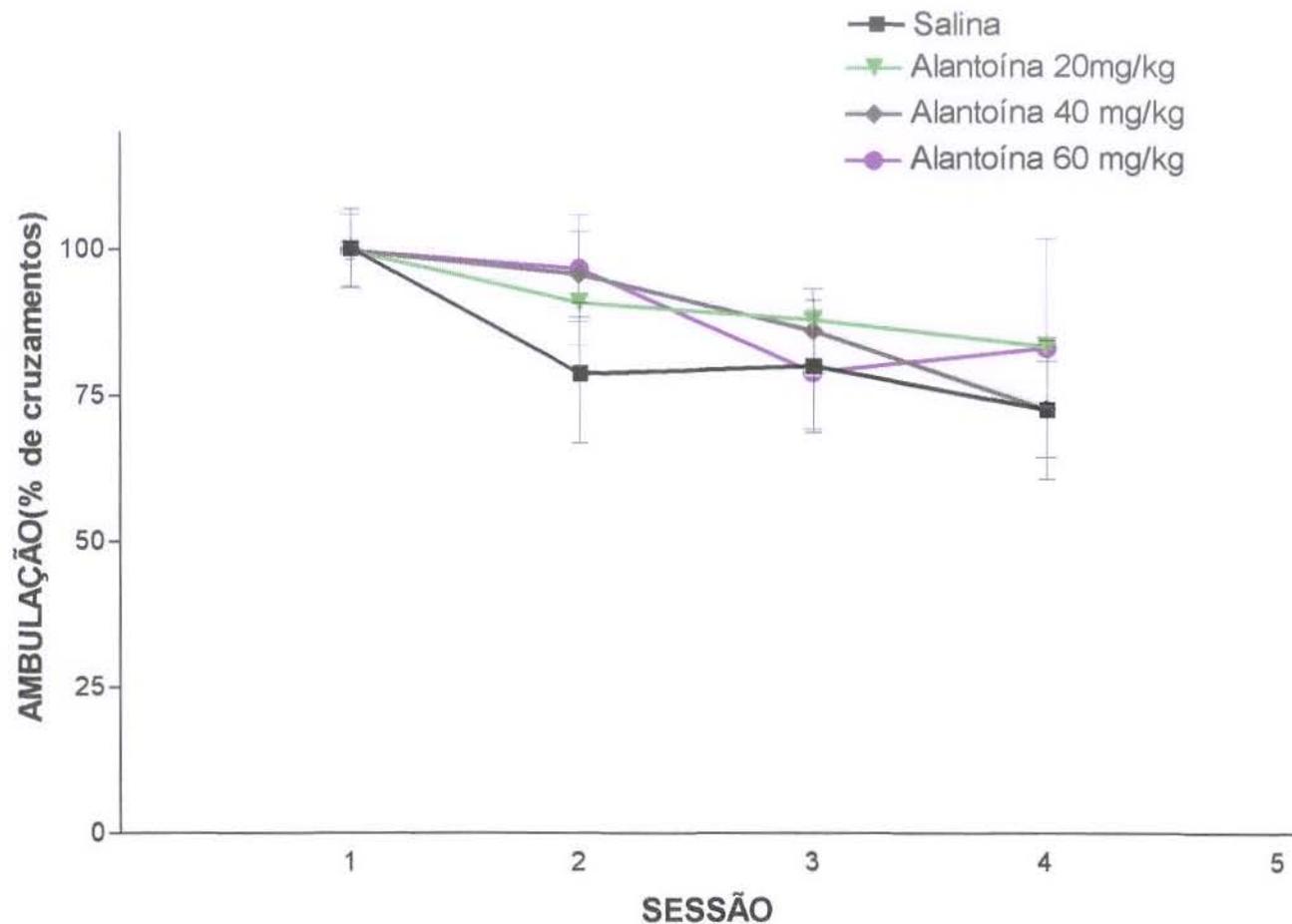


Figura 13. Efeito da administração i.p. de alantoína 30 min antes das sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam a porcentagem de ambulação comparado com os escores médios da primeira sessão  $\pm$  EPM de 15 camundongos por grupo. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(3,165) = 7,16$ ,  $p \leq 0,001$ , mas nenhum efeito significativo do tratamento com alantoína  $F(3,55) = 0,22$ ,  $p \geq 0,2$ . Não houve interação do tratamento com a medida repetida,  $F(9,165) = 0,81$ .

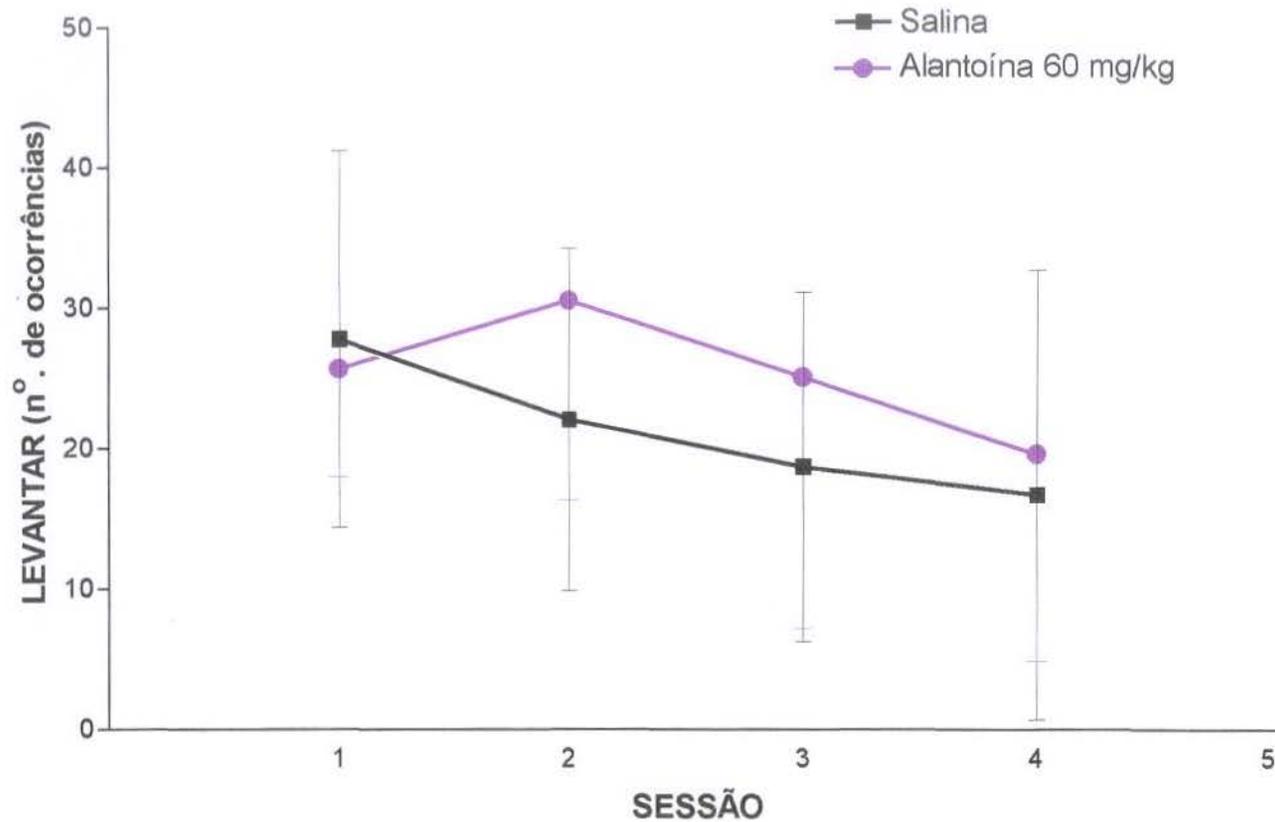


Figura 14 . Efeito da administração i.p. alantoína 30 min antes das sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de habituação - levantar (número de ocorrências)  $\pm$  EPM de 15 camundongos por grupo. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(3,84) = 4,55$ ,  $p \leq 0,01$ , mas não houve efeito no tratamento da alantoína  $F(1,28) = 1,11$ ,  $p \geq 0,2$ , e também não houve interação no tratamento com a medida repetida,  $F(3,84) = 1,49$ ,  $p \geq 0,2$ .

A figura 16 ilustra o efeito da administração bilateral de 7 µg/lado de sorbarina, alantoína, triumboídina ou veículo no hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após a sessão de treino, sobre a habituação a um ambiente novo. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M dos escores de ambulação na sessão de teste. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos. ANOVA de uma via : treino -  $F(3,33) = 3,23$ ; teste -  $F(3,33) = 0.74$ .

A figura 17 ilustra o efeito da administração bilateral de 7 µg/lado de sorbarina, alantoína ou veículo no hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após a sessão de treino, sobre a retenção da tarefa da esquivas ativa de duas vias. Estes resultados representam a média  $\pm$  E.P.M do número de esquivas ao choque na sessão de teste. A sorbarina melhorou em 46% os escores de retenção desta tarefa, em relação ao veículo ( $p \leq 0,05$ , teste de Duncan precedido por ANOVA de uma via,  $F(2,26) = 3,37$ ,  $p \leq 0,05$ ).

A figura 18 ilustra o efeito da administração i.p. da cafeína, após as sessões de treino, na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de ambulação (número de cruzamentos) dos animais. Uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,240) = 114,14$ ,  $p \leq 0,001$  mas não houve efeito do tratamento com cafeína,  $F(4,60) = 1,58$ ,  $p \geq 0,2$ . Houve, porém uma interação significativa entre tratamento e a medida repetida,  $F(16,240) = 2,24$ ,  $p \leq 0,05$ . Um experimento em paralelo mostrou que a administração de 100 mg/kg cafeína no mesmo esquema acima, com doses diárias (5 dias), porém sem o treinamento correspondente, também não alterou significativamente os escores de ambulação de um grupo de animais expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

A figura 19 ilustra o efeito da administração i.p. de cafeína após as sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de levantar (número de ocorrências) dos animais. Uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,240) = 28,40$ ,  $p \leq 0,001$ , mas não houve efeito do tratamento com cafeína,  $F(4,60) = 1,14$ ,  $p \geq 0,2$ , e também não houve interação entre o tratamento e a medida repetida,  $F(16,240) = 1,59$   $p \geq 0,2$ . Um experimento em paralelo mostrou que a administração de

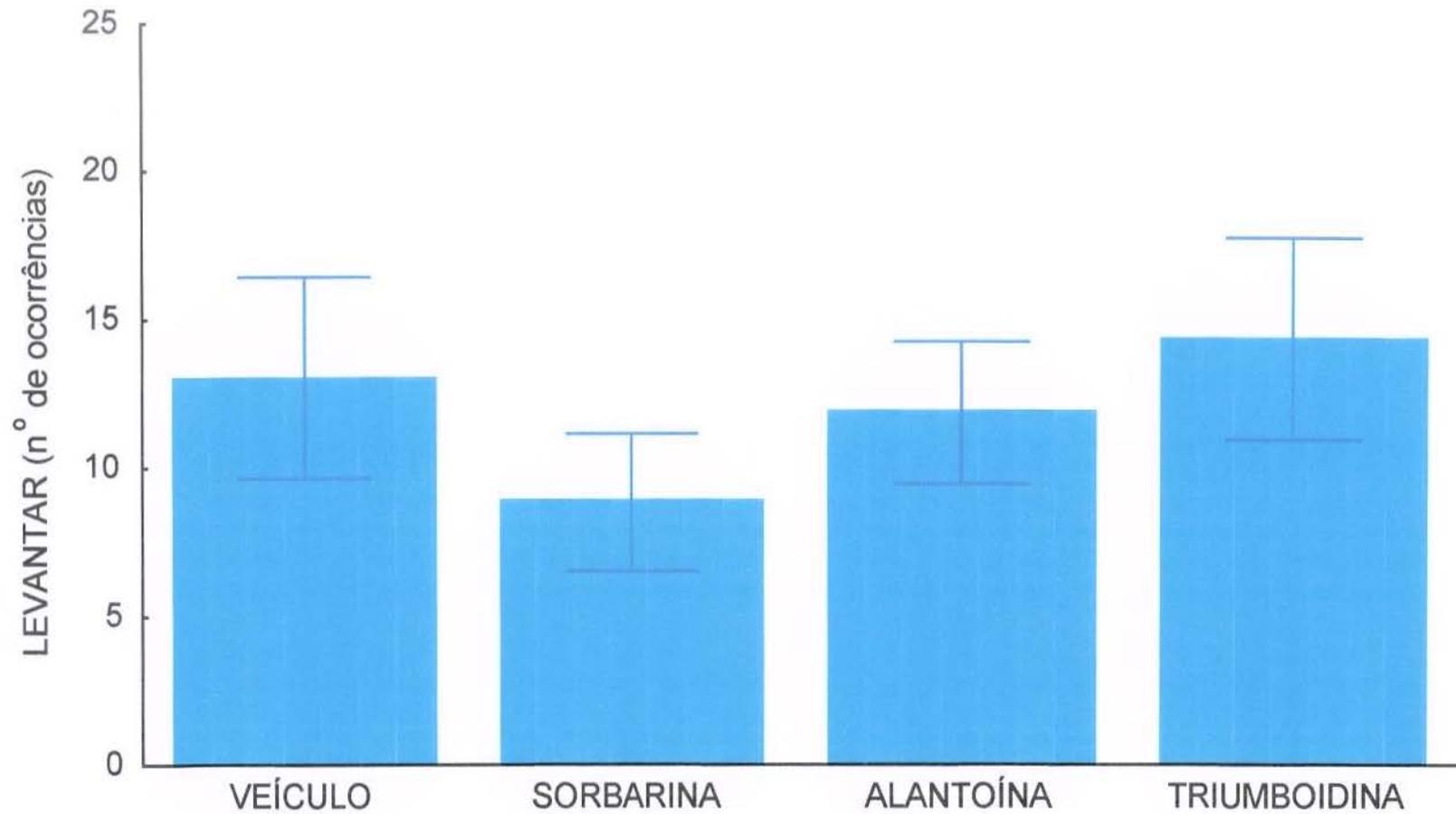


Figura 15. Efeito da administração de 7 ug/lado de sorbarina, alantoína, triumboidina ou veículo no hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após a sessão de treino, sobre a habituação a um ambiente novo. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM na sessão de teste, de 7-10 ratos por grupo. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos. ANOVA de uma via : treino -  $F(3,33) = 0,88$ ; teste -  $F(3,33) = 0,61$ .

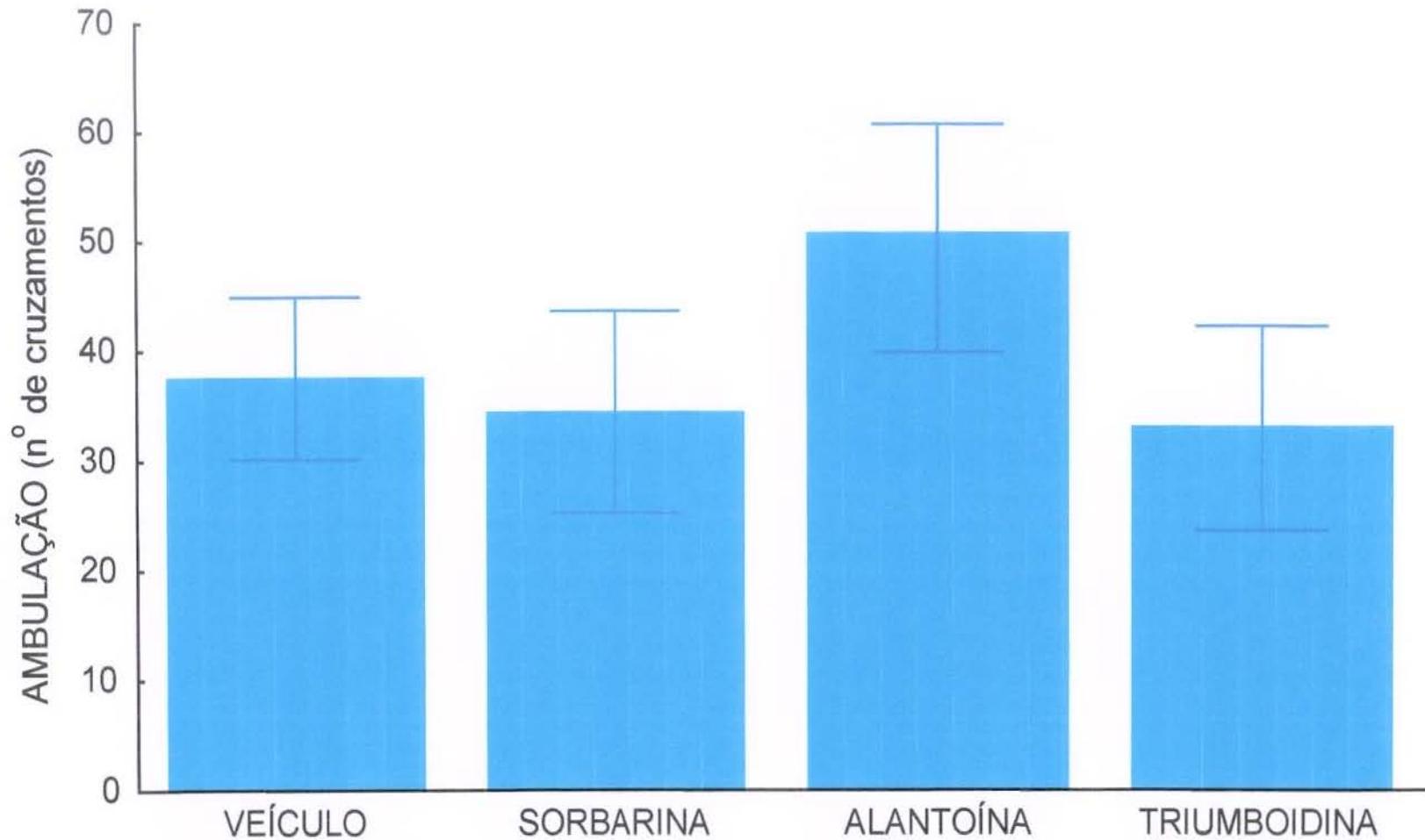


Figura 16. Efeito da administração bilateral de 7 ug/lado de sorbarina, alantoína, triumboldina ou veículo no hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após a sessão de treino, sobre a habituação a um ambiente novo. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM dos escores de ambulação na sessão de teste, de 7-10 ratos por grupo. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos. ANOVA de uma via : treino -  $F(3,33) = 3,23$ ; teste -  $F(3,33) = 0,74$ .

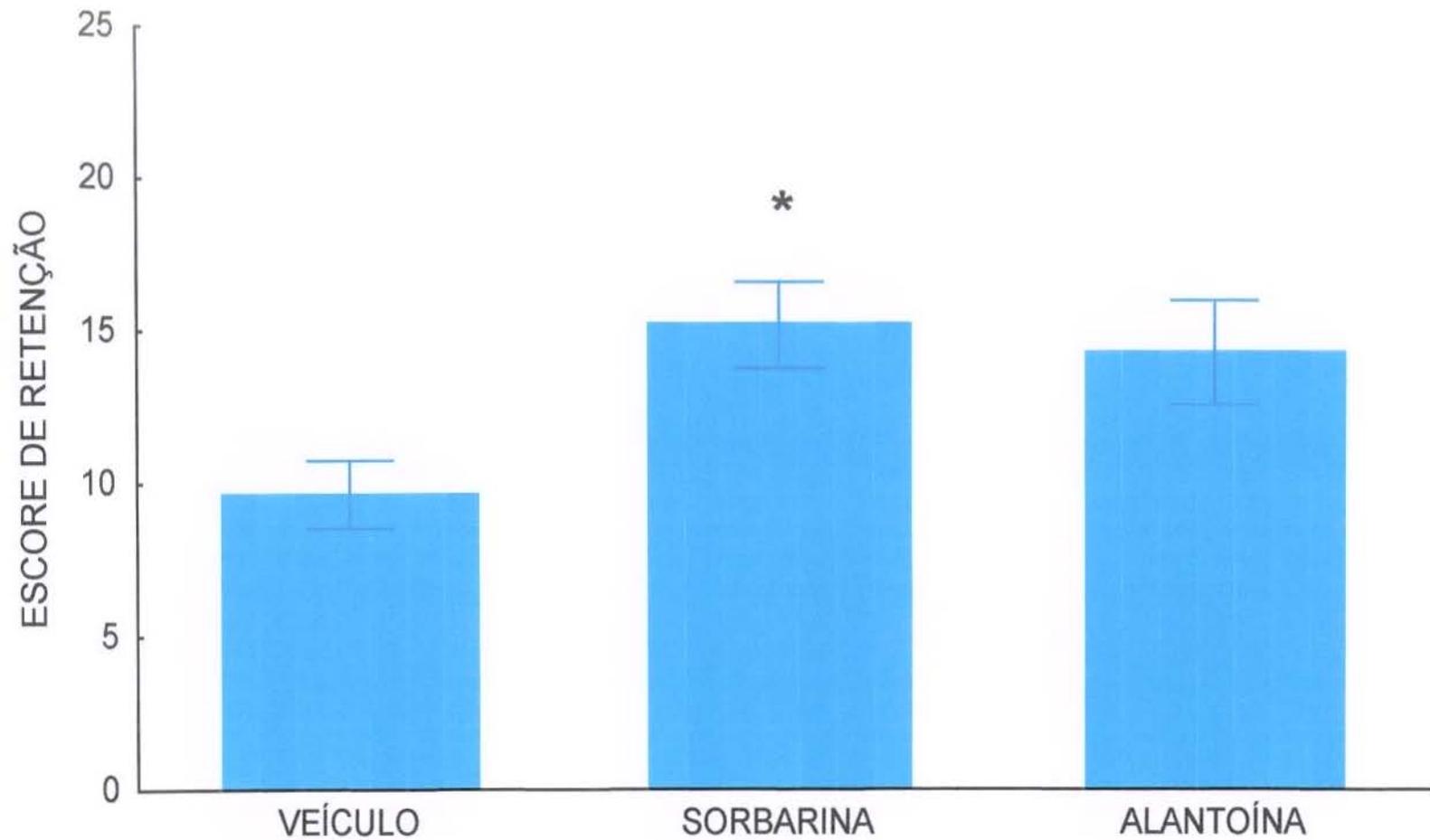


Figura 17. Efeito da administração bilateral de 7 ug/lado de sorbarina, alantoína ou veículo no hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após a sessão de treino, sobre a retenção da tarefa da esquiwa ativa de duas vias. Estes resultados representam a média  $\pm$  EPM do número de esquivas ao choque na sessão de teste, de 9-10 ratos por grupo. \*  $p \leq 0,05$  teste de Duncan, comparado ao grupo veículo, precedido por ANOVA de uma via,  $F(2,26) = 3,37$ ,  $p \leq 0,05$ .

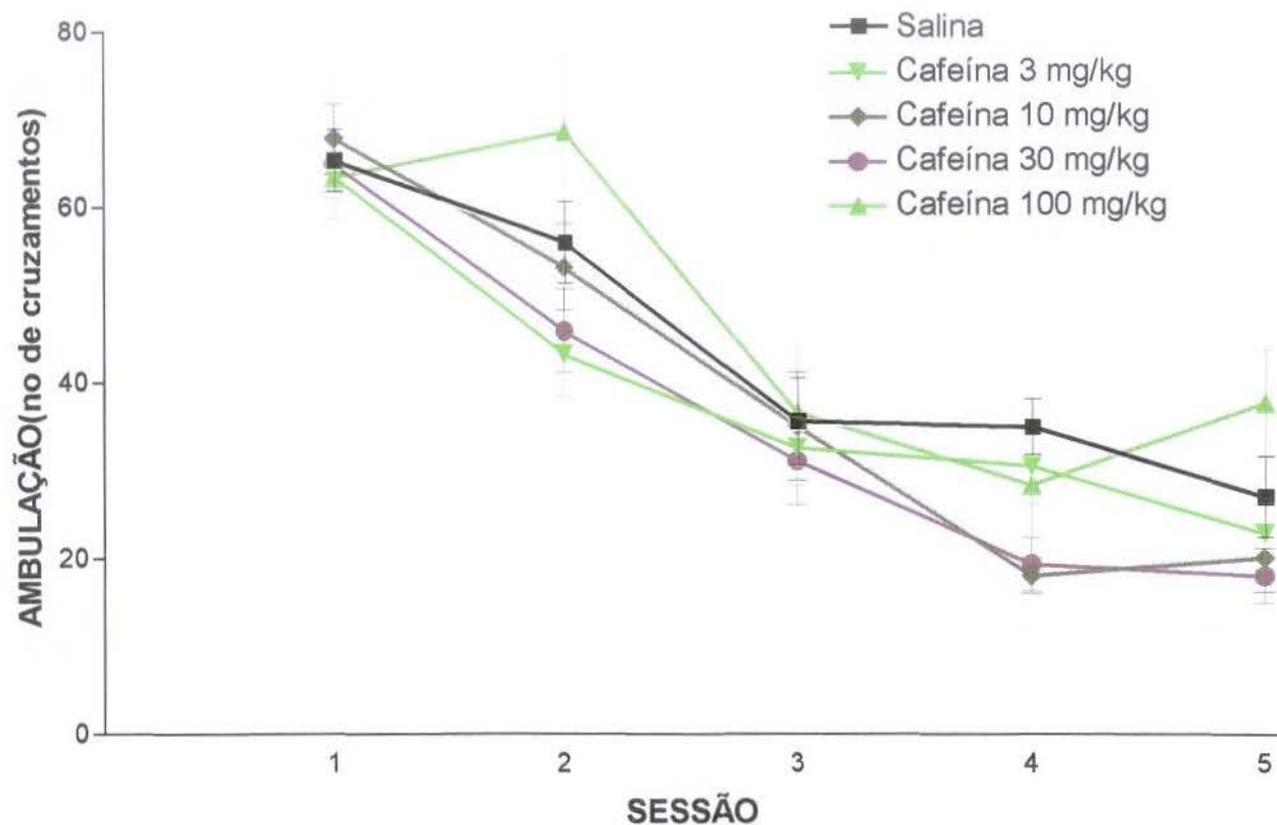


Figura 18 . Efeito da administração i.p. da cafeína após as sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de ambulação (número de cruzamentos)  $\pm$  EPM de 13 camundongos por grupo. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,240) = 114,14$ ,  $p \leq 0,001$  mas não houve efeito do tratamento com cafeína,  $F(4,60) = 1,58$ ,  $p \geq 0,2$ . Houve, porém uma interação significativa entre tratamento e a medida repetida,  $F(16,240) = 2,24$ ,  $p \leq 0,05$ . Um experimento em paralelo mostrou que a administração de 100 mg/kg cafeína no mesmo esquema acima, com doses diárias (5 dias), porém sem o treinamento correspondente, também não alterou significativamente os escores de ambulação de um grupo de 13 camundongos expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

caféina, com doses diárias de 100 mg/kg por 5 dias, porém sem o treinamento correspondente, também não alterou significativamente os escores de ambulação de um grupo de animais expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

A figura 20 ilustra o efeito da administração i.p. de caféina, 30 min antes das sessões de treino, na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam as porcentagens dos escores médios de ambulação (comparados aos escores da primeira sessão) dos animais. Uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,112) = 30,06$ ,  $p \leq 0,001$ , porém o tratamento com caféina não alterou significativamente os escores de retenção  $F(1,28) = 1,71$ ,  $p \geq 0,2$  e não houve interação entre tratamento e a medida repetida,  $F(4,112) = 1,97$ ,  $p = 0,10$ . Um experimento em paralelo mostrou que a administração de caféina com doses diárias de 100 mg/kg por 5 dias, porém sem o treinamento correspondente, não alterou significativamente os escores de ambulação de um grupo de animais expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

A figura 21 ilustra o efeito da administração i.p. de 30 mg/kg de caféina, 30 min antes das sessões de treino, na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de levantar (número de ocorrências) dos animais. Uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,112) = 5,48$ ,  $p \leq 0,001$ , no tratamento,  $F(1,28) = 6,70$ ,  $p \leq 0,05$ , e também na interação entre tratamento e a medida repetida,  $F(4,34) = 5,5931$   $p \leq 0,001$ . Um experimento em paralelo mostrou que a administração de caféina, com doses diárias de 100 mg/kg por 5 dias, porém sem o treinamento correspondente, não alterou significativamente os escores de ambulação de um grupo de animais expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

A figura 22 ilustra o efeito da administração i.p. da caféina 30 min antes da sessão de treino sobre a retenção da tarefa de esquiiva inibitória. As três maiores doses pioram, significativamente, o desempenho dos camundongos nesta tarefa ( $p \leq 0,01$  comparado ao grupo salina, teste U de Mann-Whitney precedido pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA).

A figura 23 ilustra o efeito da administração i.p. da caféina imediatamente após a sessão de treino sobre a retenção da tarefa de esquiiva inibitória. A dose de 30 mg/kg produz

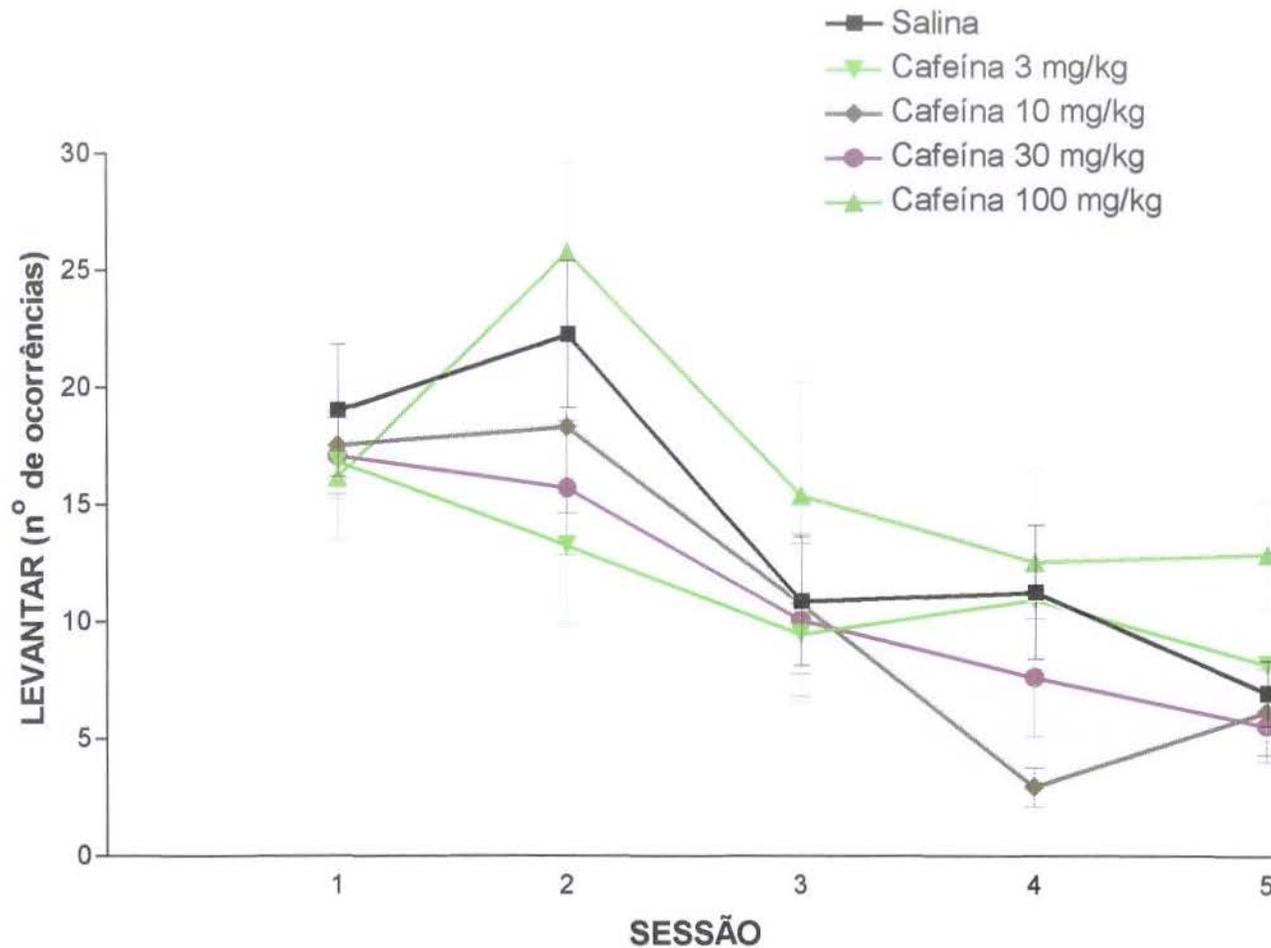


Figura 19. Efeito da administração i.p. de cafeína após as sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de levantar (número de ocorrências)  $\pm$  EPM de 13 camundongos por grupo. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,240) = 28,40$ ,  $p \leq 0,001$ , mas não houve efeito do tratamento com cafeína,  $F(4,60) = 1,14$ ,  $p \geq 0,2$ , e também não houve interação entre o tratamento e a medida repetida,  $F(16,240) = 1,59$   $p \geq 0,2$ . Um experimento em paralelo mostrou que a administração de cafeína, com doses diárias de 100 mg/kg por 5 dias, porém sem o treinamento correspondente, também não alterou significativamente os escores de ambulação de um grupo de 13 camundongos expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

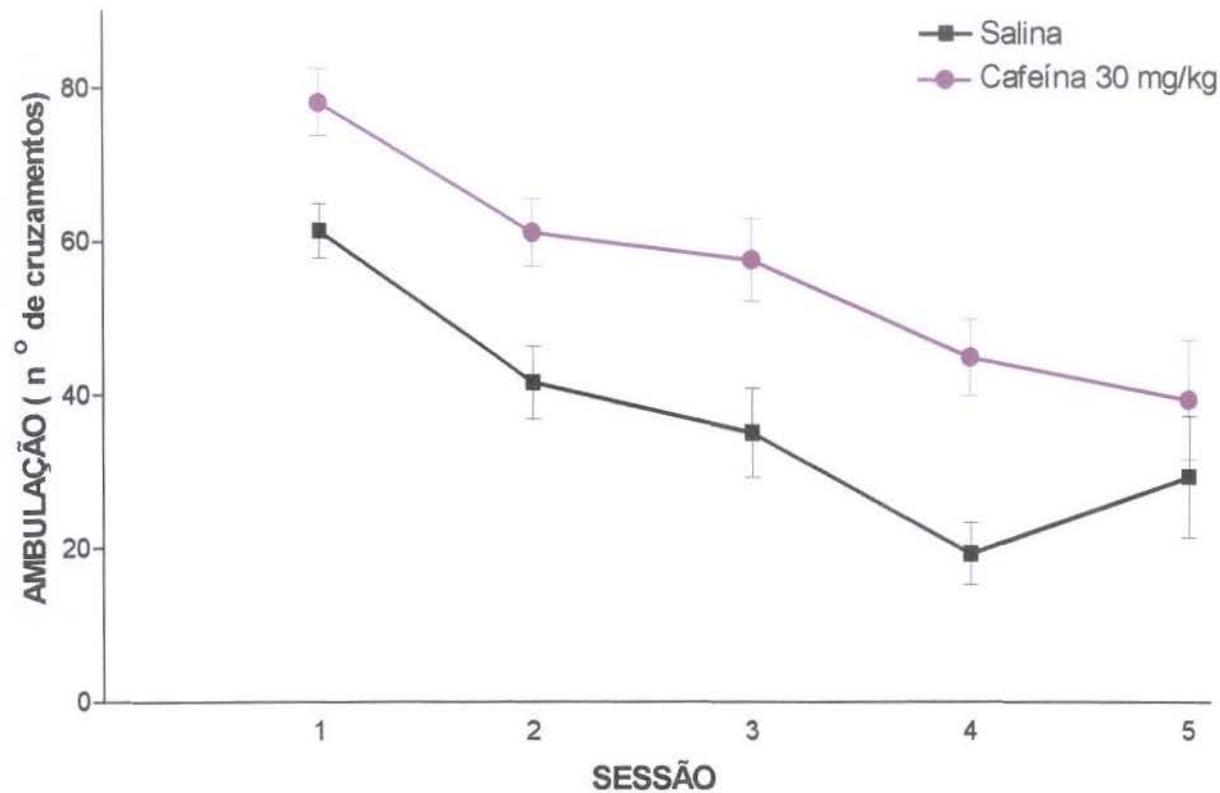


Figura 20 . Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes das sessões de treino na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de ambulação (número de cruzamentos)  $\pm$  EPM de 15 camundongos por grupo. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,112) = 30,06$ ,  $p \leq 0,001$ , porém o tratamento com cafeína não alterou significativamente os escores de retenção  $F(1,28) = 1,71$ ,  $p \geq 0,2$  e não houve interação entre tratamento e a medida repetida,  $F(4,112) = 1,97$ ,  $p = 0,10$ . Um experimento em paralelo mostrou que a administração de cafeína com doses diárias de 100 mg/kg por 5 dias, porém sem o treinamento correspondente, não alterou significativamente os escores de ambulação de um grupo de 15 camundongos expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

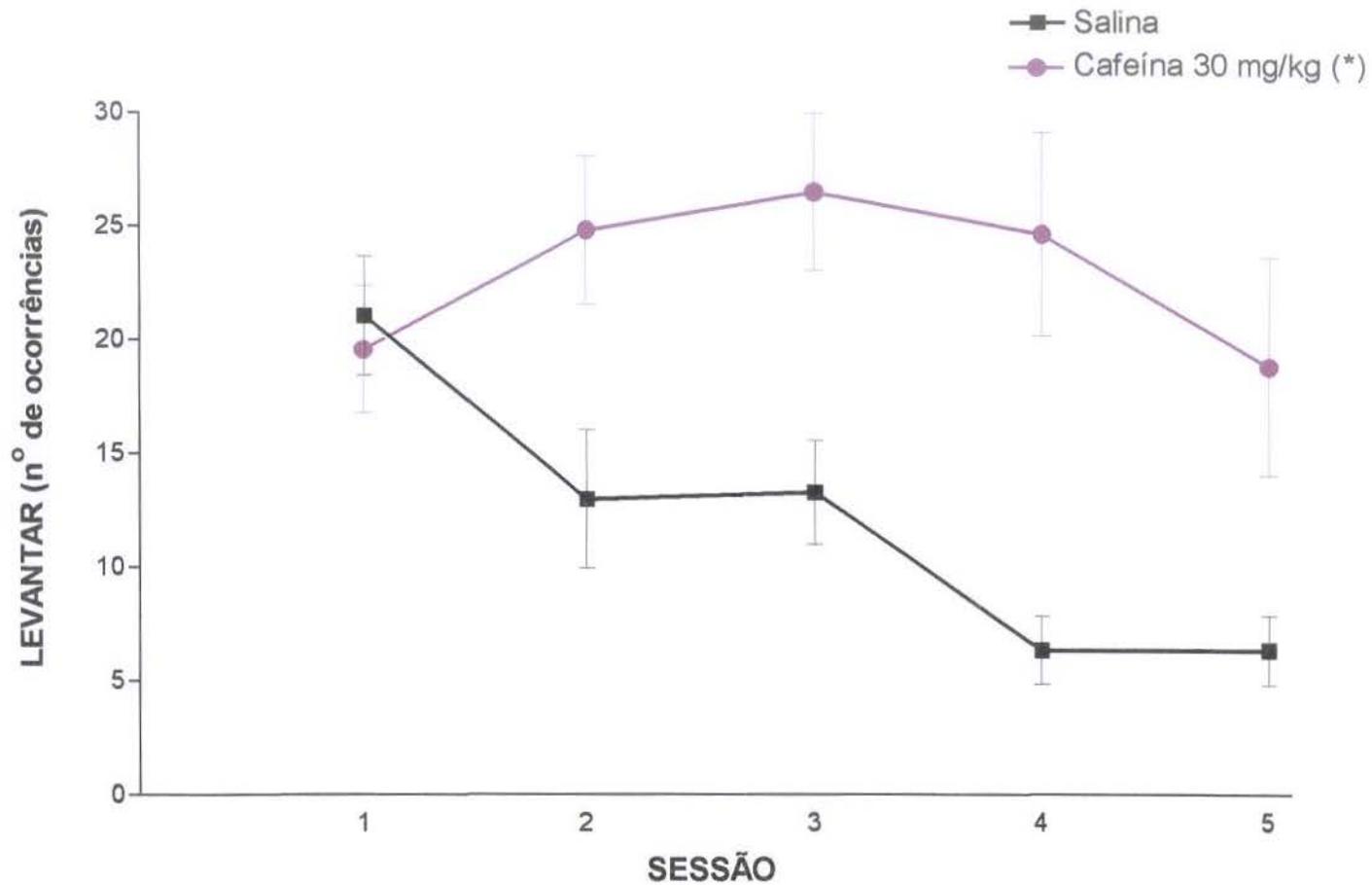


Figura 21. Efeito da administração i.p. de 30 mg/kg de cafeína , 30 min antes das sessões de treino, na tarefa de habituação a um ambiente novo. Estes resultados representam os escores médios de levantar (número de ocorrências)  $\pm$  EPM de 15 camundongos por grupo. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida (sessão)  $F(4,112) = 5,48$ ,  $p \leq 0,001$ , no tratamento,  $F(1,28) = 6,70$ ,  $p \leq 0,05$ , e também na interação entre tratamento e a medida repetida,  $F(4,34) = 5,5931$   $p \leq 0,001$ . Um experimento em paralelo mostrou que a administração de cafeína, com doses diárias de 100 mg/kg por 5 dias, porém sem o treinamento correspondente, não alterou significativamente os escores de ambulação de um grupo de 15 camundongos expostos ao ambiente novo ( $p \geq 0,2$  teste t de Student).

um melhor desempenho, significativo, do animal nesta tarefa ( $p \leq 0,05$  comparado ao grupo salina, teste U de Mann-Whitney precedido pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA).

A figura 24 ilustra o efeito da administração i.p. de cafeína, 30 min antes da sessão de teste, sobre a retenção da tarefa de esQUIVA inibitória. As doses de 3 e 10 mg/kg apresentaram um aumento significativo dos escores de retenção dos camundongos nesta tarefa ( $p \leq 0,01$  comparado ao grupo salina, teste U de Mann-Whitney precedido pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA).

A figura 25 ilustra o efeito da administração i.p. de cafeína, 30 min antes da sessão de treino e 30 min antes da sessão de teste, sobre a retenção da tarefa de esQUIVA inibitória. As doses de 3 e 30 mg/kg apresentam significativa piora do desempenho dos animais na tarefa ( $p \leq 0,05$  comparado ao grupo salina, teste U de Mann-Whitney precedido pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA).

A figura 26 ilustra os resultados obtidos com a administração da cafeína 30 min. antes do treino no labirinto aquático espacial de Morris. Estes e todos os resultados, expressos como média  $\pm$  EPM, representam as latências para chegar a plataforma submersa na sessão de treino e teste. As sessões de teste eram sempre realizadas 48 h após as de treino. Uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias com medidas repetidas demonstrou que os grupos aprenderam como chegar na plataforma,  $F(5,220) = 29,3$ ,  $p \leq 0,05$ ; porém o tratamento com a cafeína não afetou os escores de latência do treino para chegar a plataforma  $F(3,44) = 1,11$ ,  $p \geq 0,2$ ; e também não afetou a interação entre tratamento e medidas repetidas:  $F(15,220) = 0,32$ ,  $p \geq 0,2$ ; A cafeína administrada antes do treino também não afetou os escores de retenção do teste: medida repetida (provas):  $F(2,88) = 23,7$ ,  $p \leq 0,001$ ;  $F(2,88) = 17,6$ ,  $p \leq 0,001$ ; tratamento:  $F(3,44) = 0,70$ ,  $p \geq 0,2$ ; interação entre tratamento e medida repetida,  $F(6,88) = 0,33$ ,  $p \geq 0,2$ .

A figura 27 ilustra o efeito da administração i.p. da cafeína 30 min antes da sessão de treino na tarefa do labirinto aquático de Morris. Os resultados representam as distâncias para chegar a plataforma submersa na sessão de treino e teste. Uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida ( $p \leq 0,05$ ) mas não houve efeito no tratamento da cafeína. Também não houve interação entre o tratamento da cafeína com a medida repetida, no treino e teste.

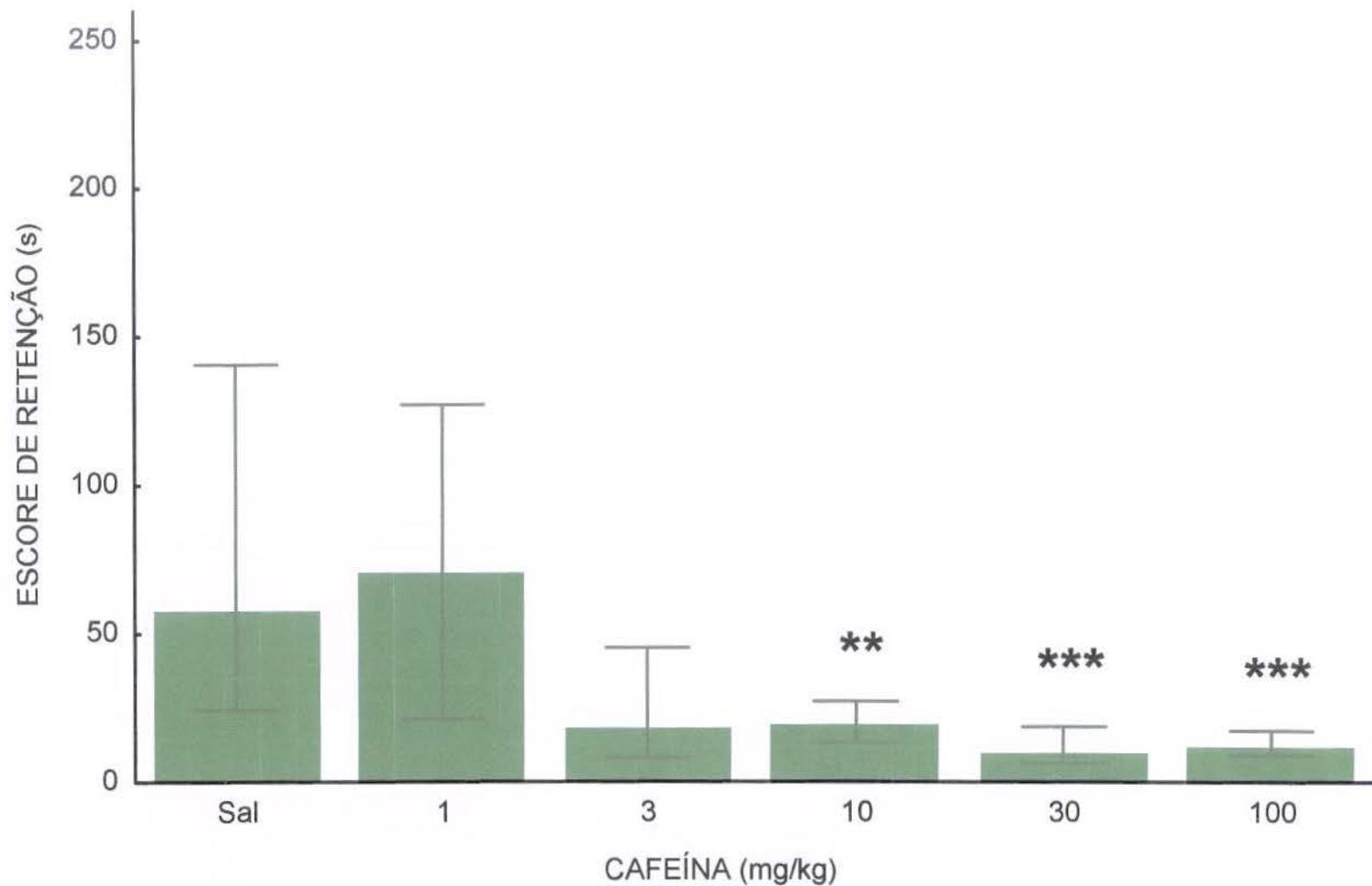


Figura 22. Efeito da administração i.p da cafeína 30 min antes da sessão de treino sobre a retenção da tarefa de esquila inibitória. Estes resultados representam as medianas e os intervalos interquartis de 15 camundongos por grupo. \*\*  $p \leq 0,01$  comparado ao grupo salina; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; teste U de Mann-Whitney precedido pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA.

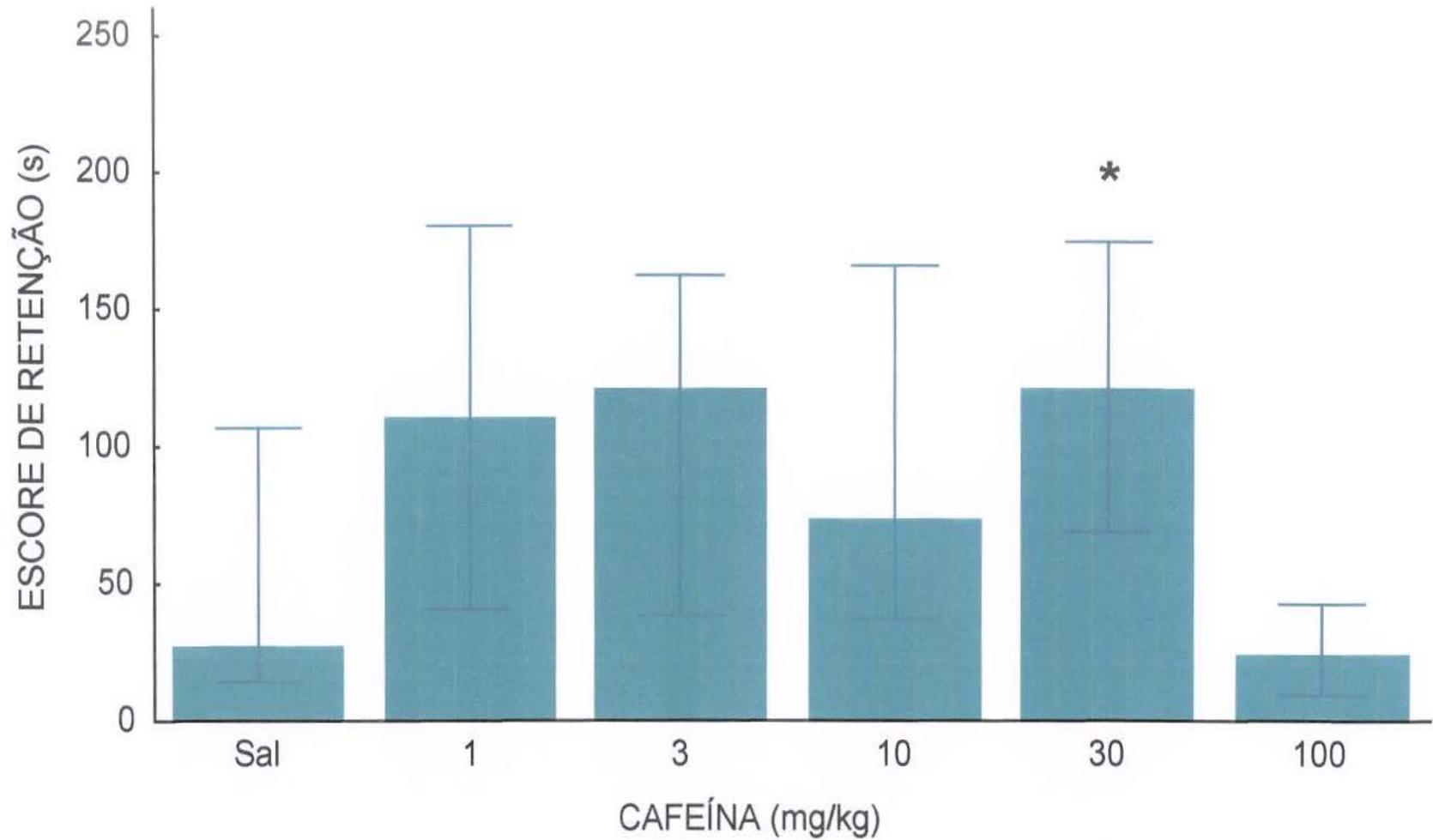


Figura 23. Efeito da administração i.p. da cafeína imediatamente após a sessão de treino sobre a retenção da tarefa de esquila inibitória. Estes resultados representam as medianas e os intervalos interquartis de 15 camundongos por grupo. \*  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo salina, teste U de Mann-Whitney precedido pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA.

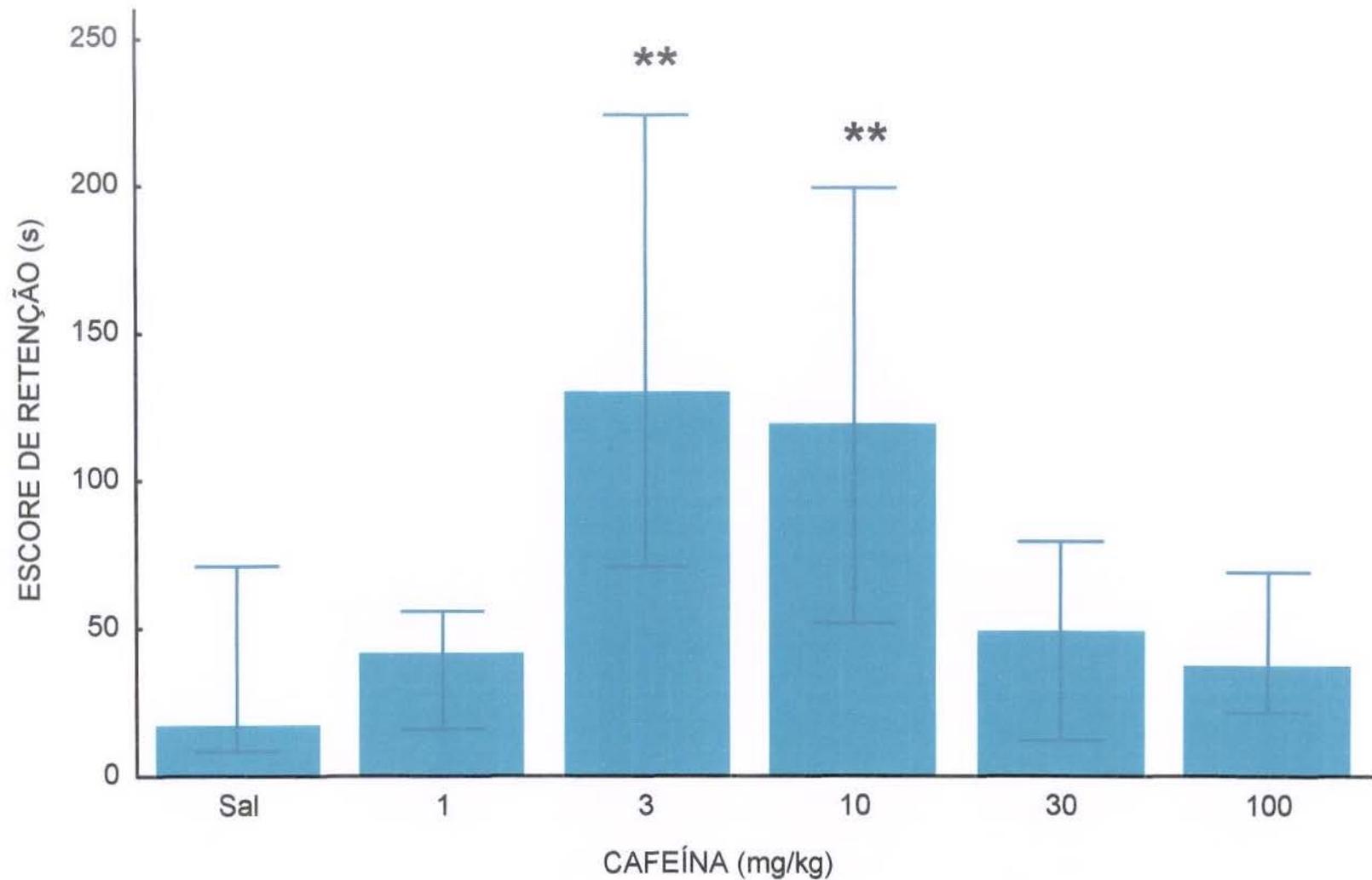


Figura 24. Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de teste sobre a retenção da tarefa de esquia inibitória. Estes resultados representam as medianas e os intervalos interquartil de 13-15 camundongos por grupo. \*\*  $p \leq 0,01$  comparado ao grupo salina, teste U de Mann-Whitney precedido pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA.

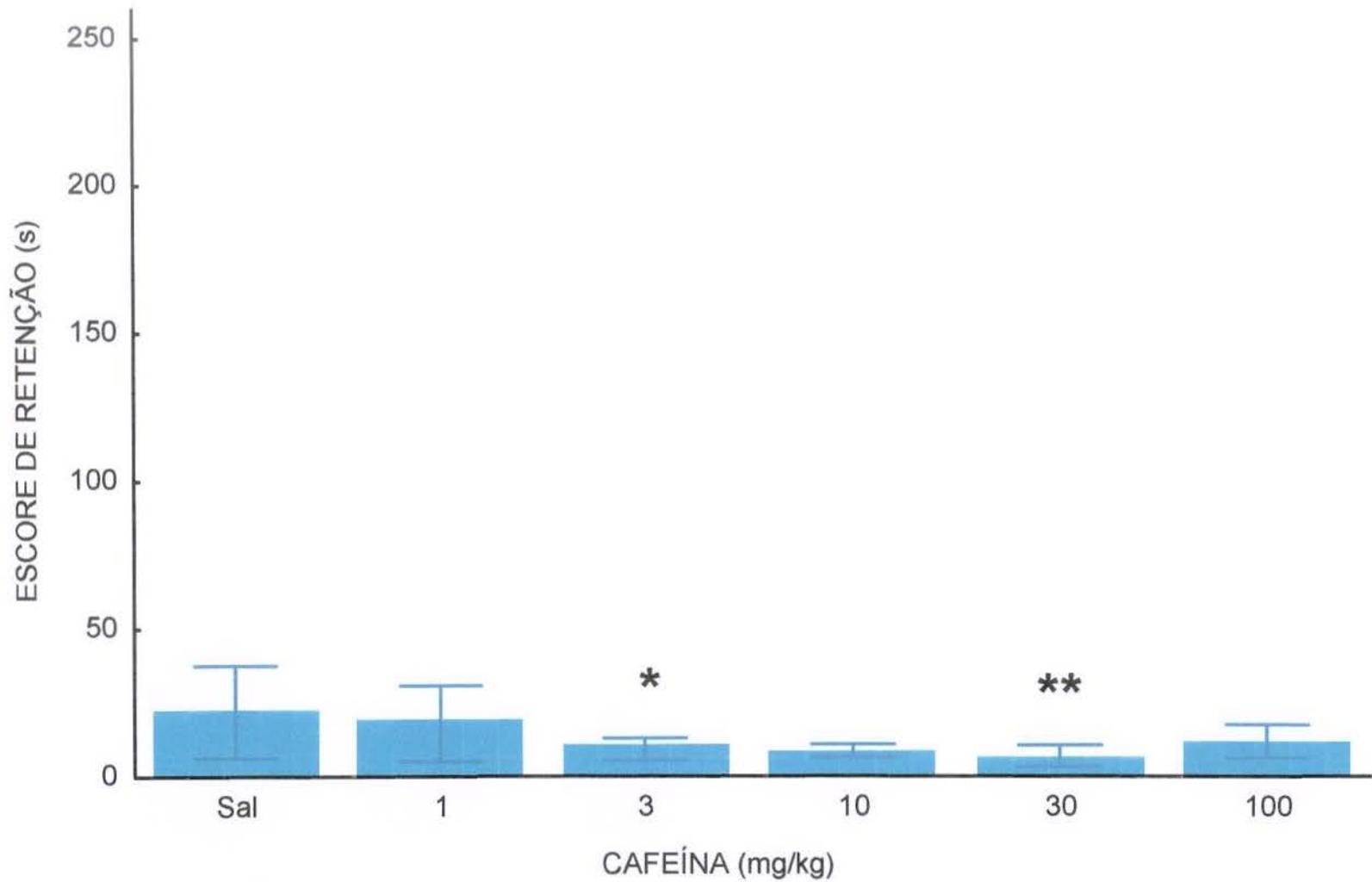


Figura 25. Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de treino e 30 min antes da sessão de teste sobre a retenção da tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA. Estes resultados representam as medianas e os intervalos interquartis de 13-15 camundongos. \*  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo salina; \*\*  $p \leq 0,01$ ; teste U de Mann-Whitney precedido pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA.

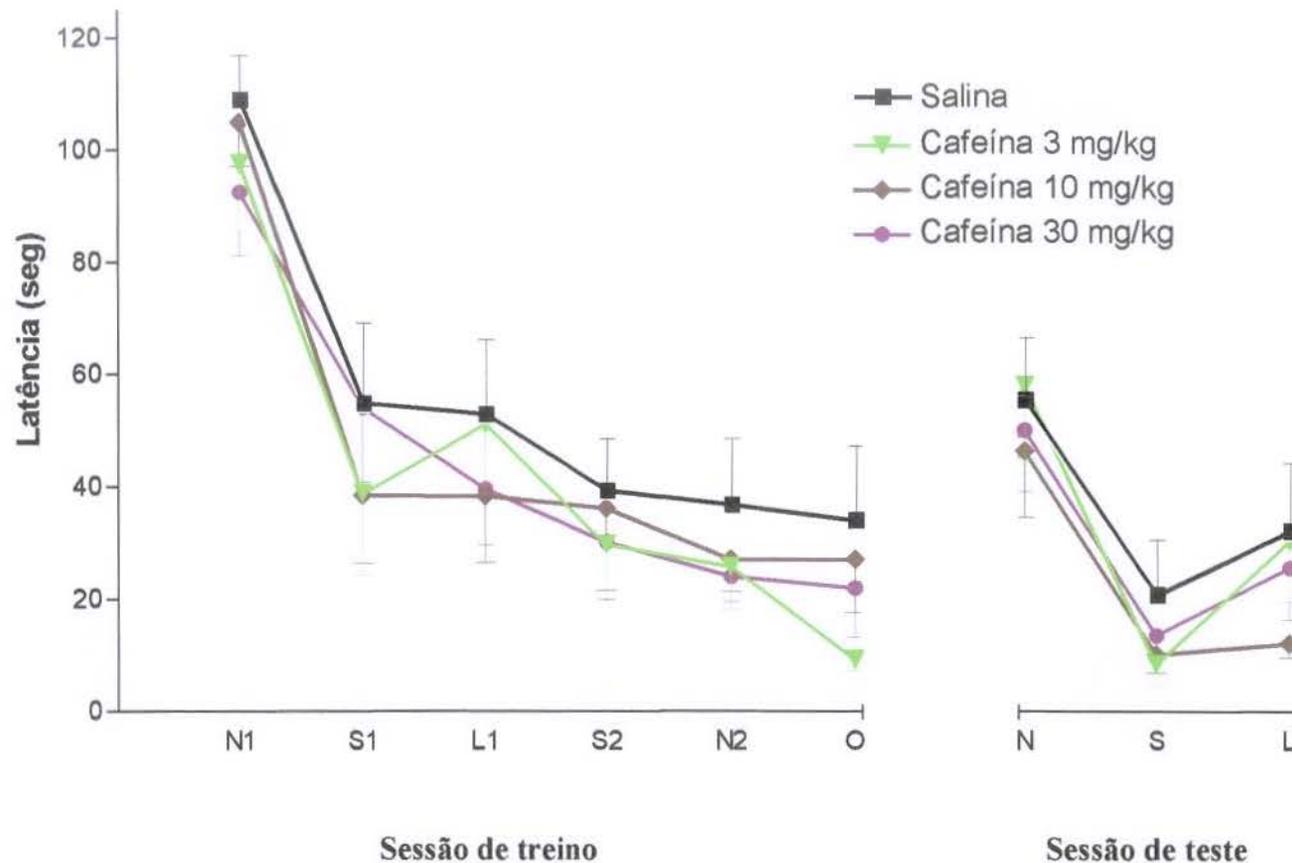
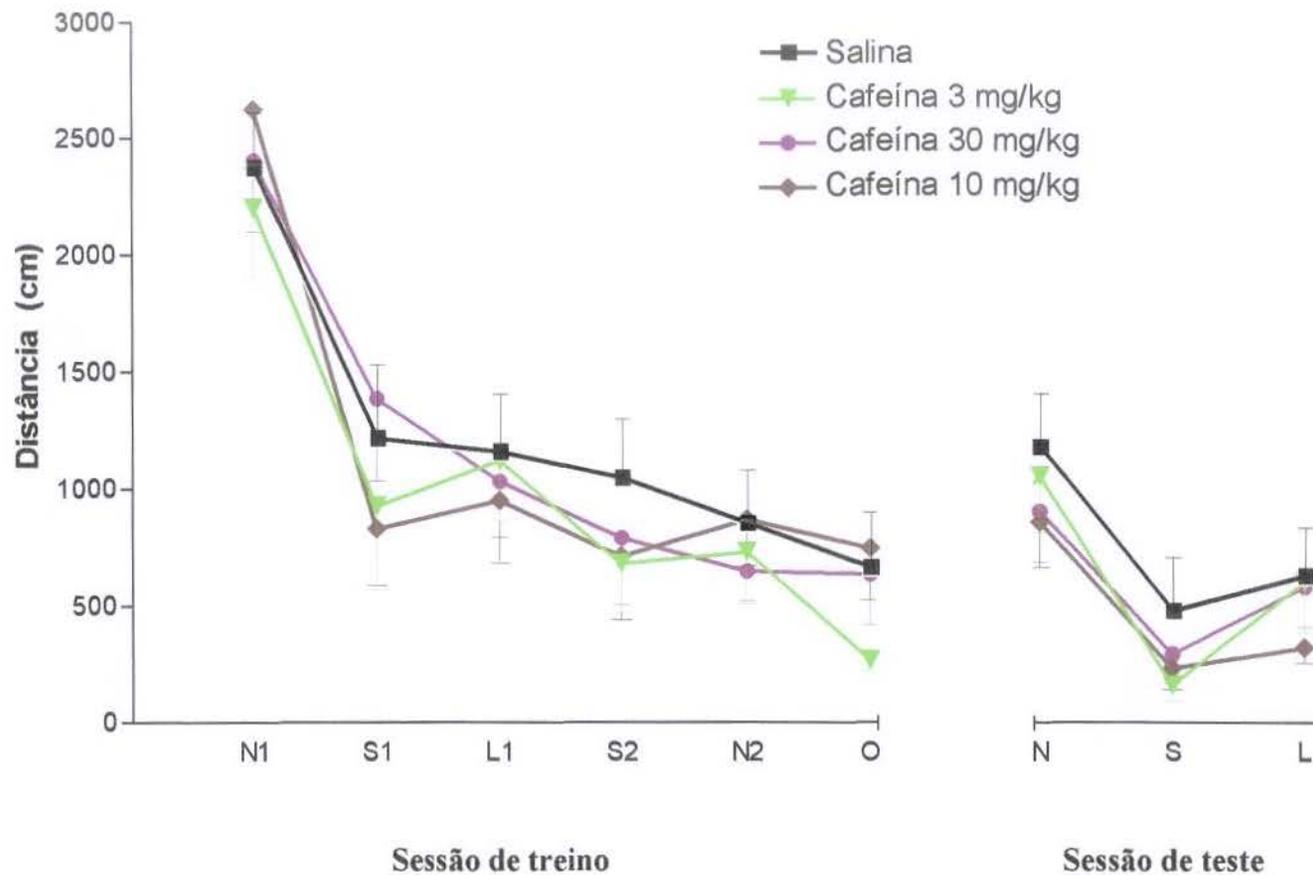


Figura 26. Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de treino na tarefa do labirinto aquático de Morris. Estes resultados, expressos como média  $\pm$  EPM de 12-15 ratos por grupo, representam as latências para chegar à plataforma submersa na sessão de treino e teste, saindo de diferentes quadrantes (N = norte, S = sul, L = leste e O = oeste). As sessões de teste eram realizadas 48 hs após as sessões de treino. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida ( $p \leq 0,05$ ) mas não houve efeito no tratamento da cafeína, como não houve interação no tratamento da cafeína com a medida repetida, no treino e teste.

A figura 28 ilustra o efeito da administração i.p. da cafeína 30 min antes da sessão de treino na velocidade de natação no labirinto aquático espacial de Morris. A velocidade não é afetada quando administrada 30 min. antes do treino. A análise estatística aplicando ANOVA de duas vias mostrou que a velocidade aumentou em função do número de provas [medidas repetidas ,  $F(5,220) = 7,97, p \leq 0,001$ ], mas não foi afetada pelo tratamento [ $F(3,44) = 0,89, p \geq 0,2$ ]. Apesar disto, houve uma interação significativa entre o tratamento com cafeína e a medida repetida [ $F(15,220) = 2,00, p \leq 0,05$ ].

O efeito da administração da cafeína imediatamente após a sessão de treino, no labirinto aquático espacial de Morris, é apresentado na Figura 29. Os resultados, que representam as latências para chegar a plataforma submersa na sessão de treino e teste, ilustram que os grupos aprenderam a chegar na plataforma [ANOVA de duas vias com medidas repetidas:  $F(5,275) = 46,4, p \leq 0,001$ ]. Nas sessões de treino os grupos não diferiram nos escores de latência do treino para chegar a plataforma: ANOVA de duas vias, tratamento  $F(4,55) = 0,65, p \geq 0,2$ ; ANOVA de duas vias: interação entre tratamento e medida repetida:  $F(20,275) = 0,86, p \geq 0,2$ ;  $F(20,275) = 0,75, p \geq 0,2$ . A análise dos escores dos testes mostrou que após o treino a cafeína administrada em doses baixas (0,3-10 mg/kg) melhorou a memória: medidas repetidas ( provas )  $F(2,110) = 24,94, p \leq 0,001$ ; tratamento:  $F(4,55) = 2,78, p \leq 0,05$ ; interação entre tratamento e medida repetida:  $F(8,110) = 2,70, p \leq 0,01$ . O grande efeito sobre a melhoria da memória foi observado com as menores doses ( $p \leq 0,05$  teste de Duncan precedido por ANOVA sendo que a dose de 30 mg/kg não apresentou efeito ( $p = 0,14$ , teste de Duncan “post-hoc”).

Na figura 30 pode-se observar o efeito da administração i.p da cafeína imediatamente após a sessão de treino, no labirinto aquático espacial de Morris. Estes resultados representam as distâncias para chegar a plataforma submersa na sessão de treino e teste. Uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida ( $p \leq 0,001$ ). A mesma análise, seguida de teste de Duncan, mostrou um efeito significativo no tratamento da cafeína, na sessão de teste ( $p \leq 0,05$ ) comparado ao grupo salina. Também houve interação no tratamento da cafeína com a medida repetida na sessão de teste ( $p \leq 0,001$ ).



**Figura 27.** Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de treino na tarefa do labirinto aquático de Morris. Estes resultados, expressos como média  $\pm$  EPM de 12-15 ratos por grupo, representam as distâncias para chegar à plataforma submersa na sessão de treino e teste, saindo de diferentes quadrantes (N = norte, S = sul, L = leste e O = oeste). As sessões de teste eram realizadas 48 hs após as sessões de treino. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida ( $p \leq 0,05$ ) mas não houve efeito no tratamento da cafeína. Também não houve interação no tratamento da cafeína com a medida repetida, no treino e teste.

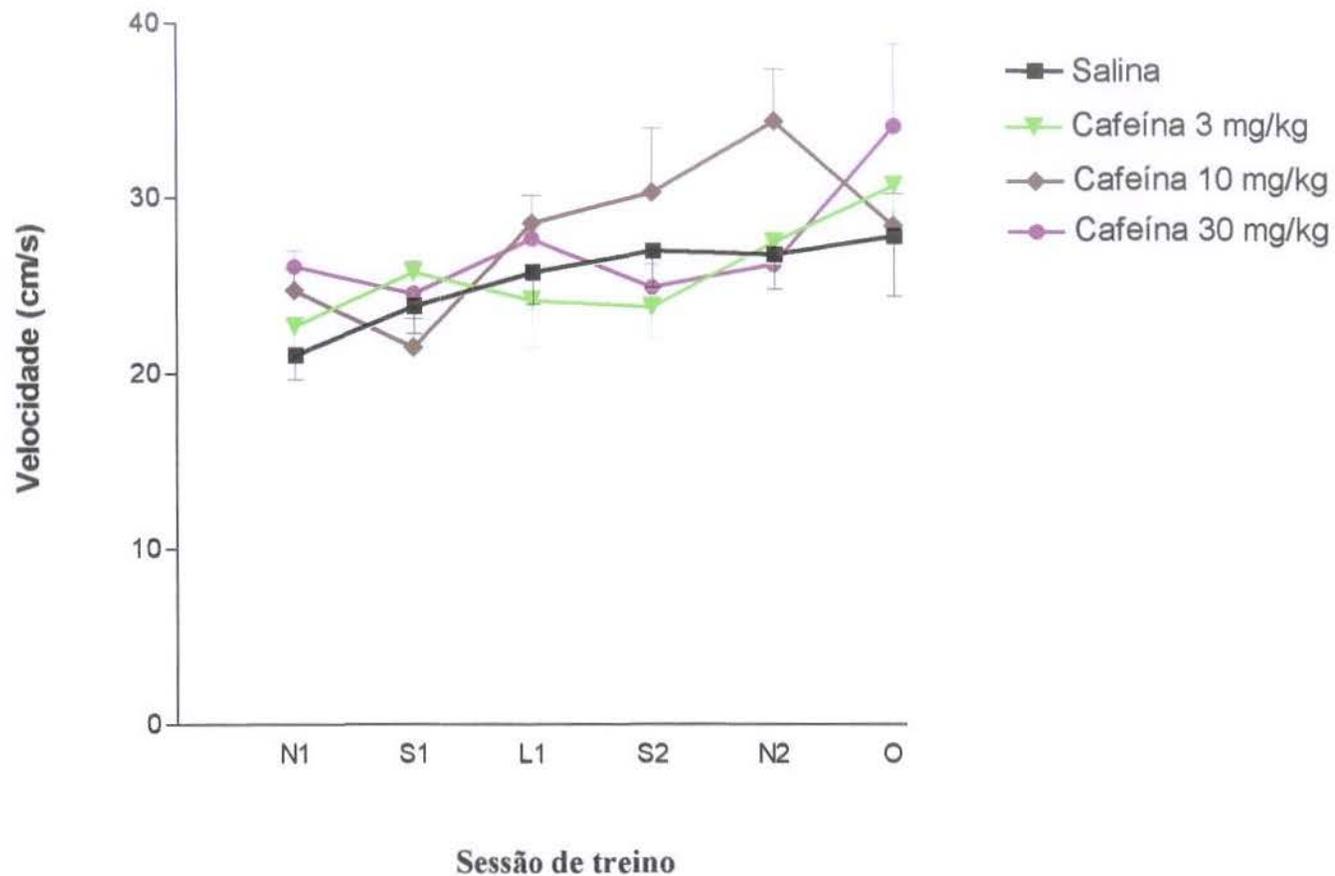


Figura 28. Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de treino na velocidade de natação da tarefa do labirinto aquático de Morris. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 12-15 ratos por grupo, representam a velocidade para chegar à plataforma submersa na sessão de treino, saindo de diferentes quadrantes (N = norte, S = sul, L = leste e O = oeste). Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida, ( $p \leq 0,05$ ) mas não com o efeito no tratamento da cafeína tanto no treino como no teste. A mesma análise mostrou que houve interação no tratamento da cafeína com a medida repetida,  $p \geq 0,05$ .

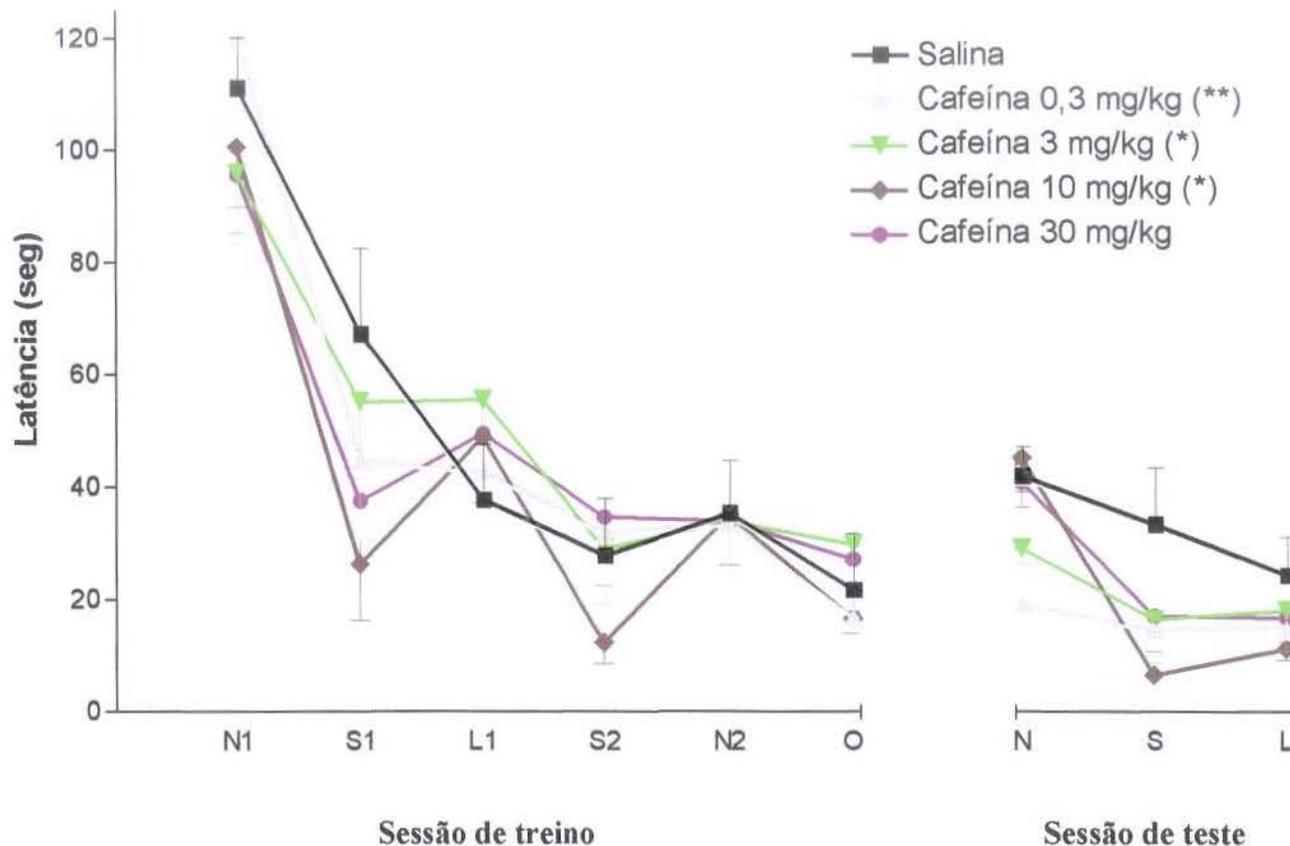


Figura 29. Efeito da administração i.p. de cafeína imediatamente após a sessão de treino na tarefa do labirinto aquático de Morris. Estes resultados, expressos como média  $\pm$  EPM de 12-15 ratos por grupo, representam as latências para chegar à plataforma submersa na sessão de treino e teste, saindo de diferentes quadrantes (N = norte, S = sul, L = leste e O = oeste). As sessões de teste eram realizadas 48 hs após as sessões de treino. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida ( $p \leq 0,001$ ). A mesma análise, seguida de teste de Duncan, mostrou um efeito significativo no tratamento da cafeína, na sessão do teste (\*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,001$ ) comparado ao grupo salina. Também houve interação no tratamento da cafeína com a medida repetida na sessão de teste ( $p \leq 0,001$ ).

A figura 31 ilustra os resultados, da latência para se chegar a plataforma, obtidos com a administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão do teste, no labirinto aquático espacial de Morris. Os grupos aprenderam a chegar até a plataforma, uma análise estatística aplicando ANOVA de duas vias, demonstrou um efeito significativo na medida repetida:  $F(5,220) = 55,92$ ,  $p \leq 0,001$ . Na sessão de treino os grupos não apresentaram diferenças nos escores de latência para chegar a plataforma:  $F(3,44) = 0,82$ ,  $p \geq 0,2$ ; e na interação entre tratamento e medida repetida:  $F(15,220) = 1,23$ ,  $p \geq 0,2$ . Na sessão de teste os animais continuaram a diminuir seus escores: medida repetida (provas),:  $F(2,88) = 30,3$ ,  $p \leq 0,001$ . A administração da cafeína antes do teste não afetou os escores individuais de retenção (teste): tratamento,  $F(3,44) = 1,20$ ,  $p \geq 0,2$ .

A figura 32 ilustra os resultados, da distância para se chegar a plataforma, obtidos com a administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão do teste, no labirinto aquático espacial de Morris. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida ( $p \leq 0,001$ ) sem haver contudo efeito no tratamento da cafeína. A mesma análise mostrou que houve interação no tratamento da cafeína com a medida repetida na sessão de teste ( $p \leq 0,05$ ).

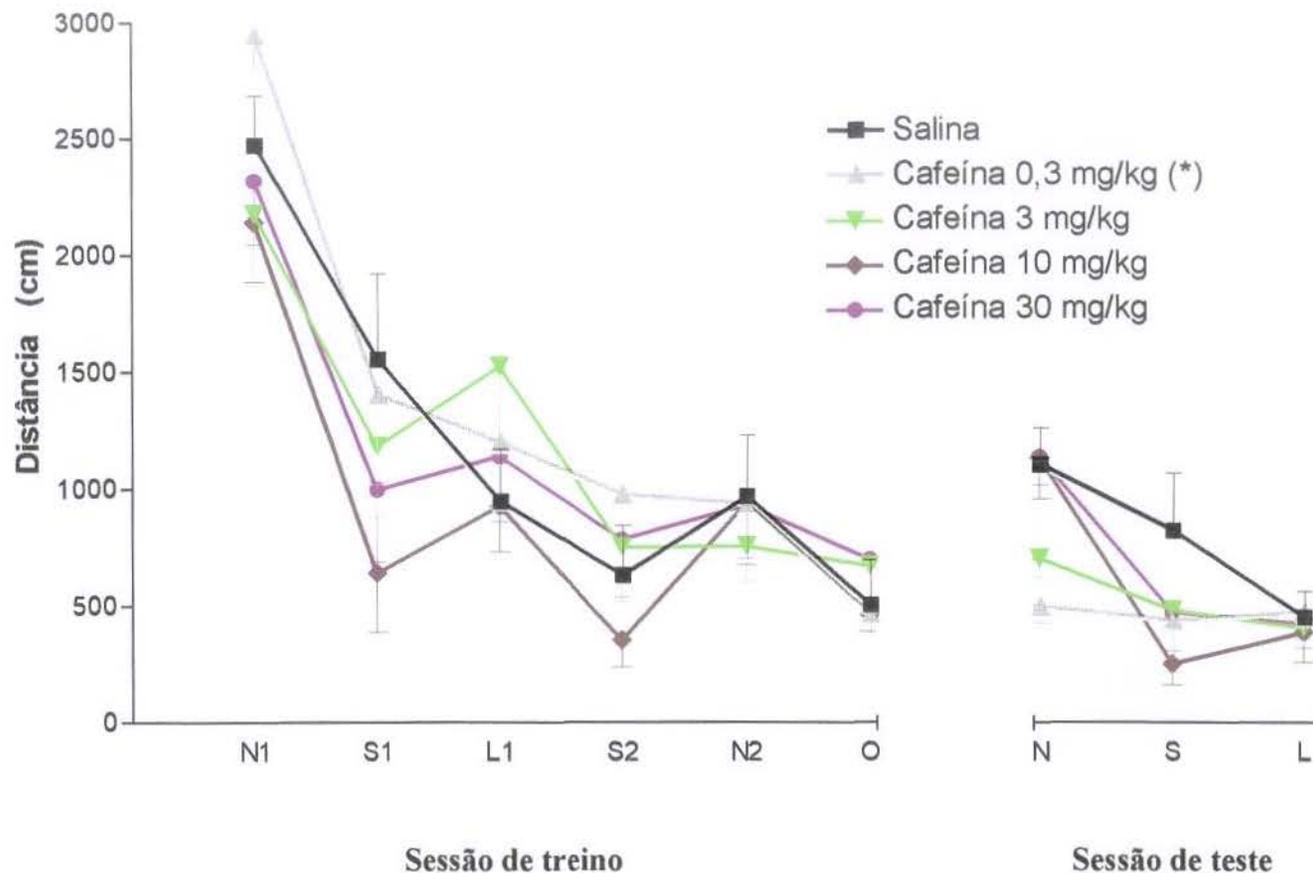


Figura 30. Efeito da administração i.p. de cafeína imediatamente após a sessão de treino na tarefa do labirinto aquático de Morris. Estes resultados, expressos como média  $\pm$  EPM de 12-15 ratos por grupo, representam as distâncias para chegar à plataforma submersa na sessão de treino e teste, saindo de diferentes quadrantes (N = norte, S = sul, L = leste e O = oeste). As sessões de teste eram realizadas 48 hs após as sessões de treino. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida ( $p \leq 0,001$ ). A mesma análise, seguida de teste de Duncan, mostrou um efeito significativo no tratamento da cafeína, na sessão do teste ( $* p \leq 0,05$ ) comparado ao grupo salina. Também houve interação no tratamento da cafeína com a medida repetida na sessão do teste ( $p \leq 0,01$ ).

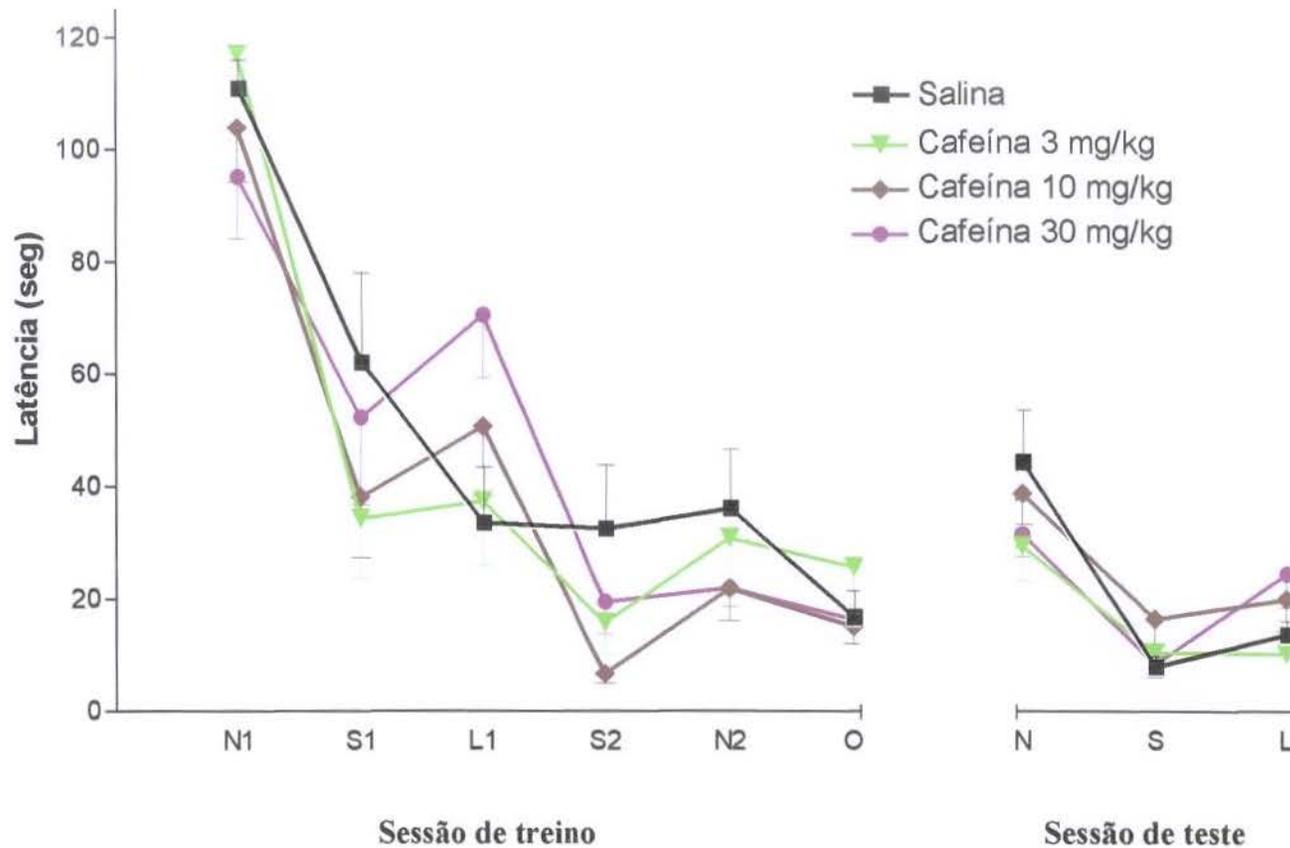


Figura 31. Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de teste na tarefa do labirinto aquático de Morris. Estes resultados, expressos como média  $\pm$  EPM de 12-15 ratos por grupo, representam as latências para chegar à plataforma submersa na sessão de treino e teste, saindo de diferentes quadrantes (N = norte, S = sul, L = leste e O = oeste). As sessões de teste eram realizadas 48 hs após as sessões de treino. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida ( $p \leq 0,001$ ), mas não houve efeito no tratamento da cafeína, e também não houve interação no tratamento da cafeína com a medida repetida, tanto no treino como no teste.

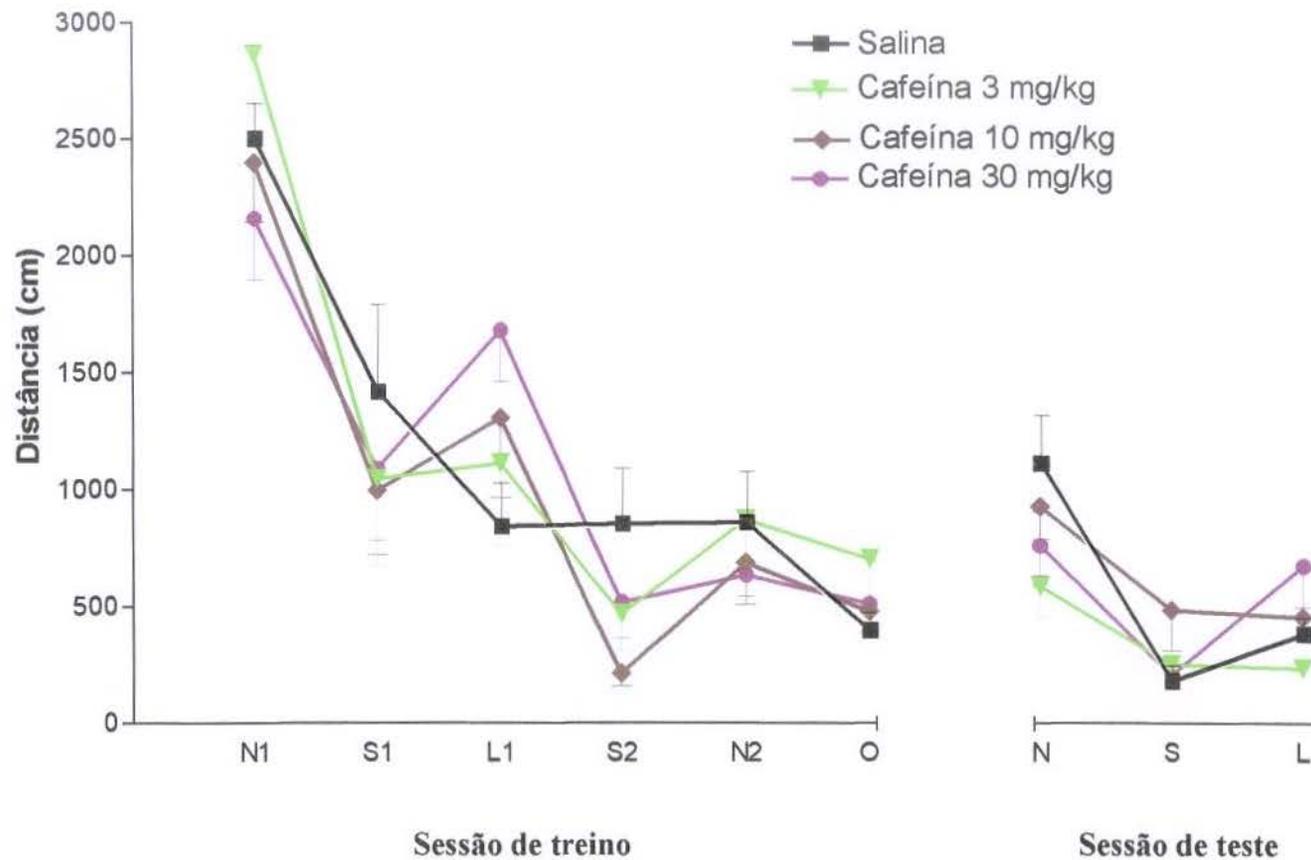


Figura 32. Efeito da administração i.p. de cafeína 30 min antes da sessão de teste na tarefa do labirinto aquático de Morris. Estes resultados, expressos como média  $\pm$  EPM de 12-15 ratos por grupo, representam as distâncias para chegar à plataforma submersa na sessão de treino e teste, saindo de diferentes quadrantes (N = norte, S = sul, L = leste e O = oeste). As sessões de teste eram realizadas 48 hs após as sessões de treino. Uma ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo na medida repetida ( $p \leq 0,001$ ), mas não houve efeito no tratamento da cafeína. A mesma análise mostrou que houve interação no tratamento da cafeína com a medida repetida na sessão do teste ( $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Os efeitos tóxicos observados com a administração dos extratos da planta *P. elegans* em camundongos simulam alguns dos efeitos descritos anteriormente em bovinos e caprinos (TOKARNIA et al.<sup>148</sup>,1969; TOKARNIA et al.<sup>149</sup>,1993). Desde 1838 existem relatos da toxicidade da referida planta sobre o gado bovino da região serrana do Rio de Janeiro (MELLO & FERNANDES<sup>101</sup>,1941), sendo a sintomatologia descrita comprovada posteriormente com a intoxicação experimental de bovinos, caprinos e coelhos (TOKARNIA et al.<sup>148</sup>,1969; TOKARNIA et al.<sup>149</sup>,1993; TAVARES et al.<sup>137</sup>,1974). Em nossos experimentos, a dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) encontrada foi de 1,82g /kg em camundongos, por via i.p (vide Fig.8). Considerando que a curva dose-efeito da DL<sub>50</sub> usa uma escala semi-logarítmica, pode-se inferir que esta foi similar às doses tóxicas observadas em outras espécies de animais: 1g /kg de peso corporal para o gado bovino (TOKARNIA et al.<sup>148</sup>,1969); 0,8g /kg em coelhos e cobaios (TAVARES et al.<sup>137</sup>,1974) e 0,5g /kg em caprinos (TOKARNIA et al.<sup>149</sup>,1993), salientando, contudo, que os experimentos dos outros autores administraram oralmente um macerado da planta enquanto que trabalhamos com um extrato administrado por via i.p. Experimentos paralelos foram realizados, com a administração do extrato oralmente, sendo a dose letal 3 vezes maior comparada a administração i.p. As convulsões observadas, assemelham-se com os relatos apresentados anteriormente, como tremores generalizados no gado bovino (TOKARNIA et al.<sup>148</sup>,1969); com tremores musculares e movimentos de pedalagem em coelhos (TAVARES et al.<sup>137</sup>,1974) e tremores musculares em caprinos (TOKARNIA et al.<sup>149</sup>,1993). A latência do início das convulsões variava de alguns minutos a poucos dias nos experimentos mencionados acima, enquanto neste, quase sempre ocorria em poucos minutos. A diferença pode ser devida ao uso de diferentes vias de administração, como já referido, além dos autores mencionados usarem um homogeneizado de planta em vez de extrato. As coincidências dos sinais apresentados em todos os experimentos, porém, indicam que o extrato bruto II contém os mesmos princípios da planta e ambos eram absorvidos, tanto pela administração oral como intraperitoneal.

Os efeitos convulsivos do extrato da planta *P. elegans*, tais como os apresentados na tabela 08, são semelhantes aos efeitos de muitas drogas estimulantes do SNC, em particular antagonistas do complexo receptor benzodiazepina/GABA/canal de cloro, como a picrotoxina, bicuculina (TURSKI et al.<sup>152</sup>,1985). Por outro lado, outras drogas são capazes de produzir crises convulsivas em camundongos, como agonistas de receptores glutamatérgicos (OLNEY et al.,1972 in MELLO et al.<sup>102</sup>1986; MELDRUM<sup>100</sup>,1995).

A tabela A7 mostra que o extrato da planta reduziu a atividade locomotora espontânea em camundongos, efeito oposto ao observado após a administração de etanol (DURCAN et al.<sup>32</sup>,1989; PAEIVAERINTA & KORPI<sup>116</sup>,1993), benzodiazepinas (LISTER<sup>88</sup>,1988) e antagonistas do receptor da adenosina (GRIEBEL et al.<sup>50</sup>,1991).

O extrato da planta diminuiu a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos labirinto em cruz elevado aumentando, conseqüentemente, a porcentagem gasta nos braços fechados, tal como pode ser observado na tabela A6. Este teste é particularmente sensível para drogas ansiolíticas como as benzodiazepinas (FILE & ARANKO<sup>37</sup>,1988; PELOW et al.<sup>120</sup>,1985) e etanol (LISTER<sup>88</sup>,1988). Em geral estas drogas aumentam a permanência dos camundongos nos braços abertos do labirinto, caracterizando uma ação ansiolítica (LISTER 1987<sup>87</sup>,1988<sup>88</sup>), efeito oposto ao ocorrido com o extrato.

Tal como pode ser observado na tabela A5, o extrato da planta *P. elegans* promoveu um decréscimo no parâmetro exploratório de levantar e aumento no tempo parado no teste do campo aberto. Este teste é também sensível para medir o estado de ansiedade do animal. Tratamentos que induzem ansiedade como choque inescapável nas patas promovem uma diminuição no atividade exploratória e um aumento da defecação (LEMOINE et al.<sup>83</sup>,1990; VAN-DIJKEN et al.<sup>157</sup>,1992). Estes resultados sugerem a presença de compostos estimulantes do SNC com efeitos ansiogênicos no extrato. No entanto alguns depressores do SNC, como as benzodiazepinas, causam um efeito de relaxamento da musculatura(FARKAS et al.<sup>36</sup>,1989; SIMIAND et al.<sup>137</sup>, 1989), o que não aconteceu com a administração do extrato da planta como mostra o teste do arame (vide tabela A8).

Os sinais da intoxicação de camundongos com o extrato da planta são similares aos anteriormente descritos na literatura para o gado bovino, caprino, coelhos e cobaias. Estes,

No presente trabalho o extrato da planta foi fracionado e os efeitos gerais de cada fração foram observados. Este estudo apresenta um planejamento racional diferente do conduzido por **KREBS**, (<sup>80</sup>1987, <sup>81</sup>1991) onde os compostos químicos mais abundantes foram isolados e caracterizados sob o aspecto da estrutura química. Nossos estudos revelaram que os compostos tóxicos estão concentrados nas frações mais polares e que não incluem o glicosídeo de flavonóide sorbarina isolado anteriormente por **KREBS**<sup>80</sup>,(1987). Quando estes compostos pouco polares foram isolados por cromatografia de filtração em gel de Sephadex LH-20 observou-se que o efeito tóxico convulsivante e letal da planta resultava do sinergismo entre um grande número de compostos, uma vez que nenhum deles isoladamente induziu convulsões e morte nos camundongos, porém, este efeito foi novamente verificado quando se administrou uma mistura destas frações. Este resultado demonstra que o objetivo de caracterizar sob o aspecto farmacológico o princípio tóxico da planta é complexo, sendo difícil a tarefa de propor uma estratégia farmacológica para tratar os animais intoxicados por ela. Reconhecemos porém, que o que se constitui um problema para os que querem tratar bovinos e caprinos intoxicados com a planta, constitui, ao mesmo tempo, um sucesso adaptativo da planta, sucesso este que provavelmente contribuiu para a preservação desta espécie vegetal da depredação por animais que buscavam pastagem. Naturalmente que este sucesso adaptativo durou até os pecuaristas começarem a combater a planta como uma “praga” que colocava em risco os seus rebanhos, colaborando assim para sua extinção.

Os diversos compostos mais polares da planta provavelmente pertencem a vários grupos químicos, tal como pode-se deduzir pela análise fitoquímica dos extratos etanólicos e aquosos da planta. Porém, segundo as características de sua interação com a Sephadex LH-20, muitos deles apresentam peso molecular entre 1,000 a 10,000 Da. o que pode incluir substâncias glicosiladas e também peptídeos. A caracterização da fração J-III, a mais abundante entre os princípios apolares, composta por um componente principal e dois contaminantes menos abundantes, sugere que estes não apresentam grupamentos aromáticos, são glicosilados e possuem grupamentos amina e carboxílicos.

Como ilustram as tabelas dos anexos 9 a 13, nenhum dos princípios ativos testados (sorbarina, triumboídina e alantoina) foi efetivo em alterar significativamente os escores do

teste do campo aberto, movimentação espontânea, tônus muscular e catatonía. Apenas a alantóina aumentou significativamente a porcentagem de tempo despendido nos braços fechados do labirinto em cruz elevado mostrando, semelhantemente ao extrato um feito ansiogênico.

Seguindo uma outra estratégia de pesquisa dos constituintes tóxicos da planta *P. elegans*, testamos também alguns dos compostos anteriormente isolados, quanto aos seus efeitos farmacológicos. Entre eles, a sorbarina foi o que apresentou pelo menos um efeito farmacológico (não tóxico) semelhante ao observado com o extrato da planta: a propriedade de melhorar a memória de roedores. A quantidade de sorbarina de que havia a disposição para os testes era muito pequena e só nos permitiu um teste preliminar onde observamos o efeito facilitador da sorbarina sobre a memória quando administrada no hipocampo de ratos que foram treinados na tarefa de esquiva ativa.

A aglicona da sorbarina, a escutelareína, apresenta efeitos farmacológicos mediados pelos mesmos mecanismos de ação que explicam os efeitos das metilxantinas, que é um antagonista competitivo de receptores da adenosina e, em doses altas, inibe a enzima fosfodiesterase. Ambos mecanismos resultam em um aumento na concentração intracelular do segundo mensageiro AMP<sub>c</sub> (GIL et al.<sup>46</sup>,1994; SANZ et.al.<sup>131</sup>,1994; JI et al.<sup>74</sup>,1996; KARTON et al.<sup>77</sup>,1996; HASRAT et al.<sup>53</sup>,1997). Na impossibilidade de realizar testes que demandam uma quantidade relativamente grande da sorbarina, estudamos os efeitos da metilxantina cafeína, que atua pelos mesmos mecanismos de ação, sobre modelos animais de memória e aprendizagem.

Os resultados obtidos com as tarefas do labirinto aquático de Morris, esquiva inibitória e habituação a um campo aberto estão de acordo com estudos prévios em humanos, que sugerem que a cafeína pode melhorar a memória (CALEV<sup>17</sup>,1994, JARVIS<sup>73</sup>,1993, POLLINA & CALEV<sup>121</sup>,1997, RIEDEL et al.<sup>127</sup>,1995, RIEDEL & JOLLES<sup>126</sup>1996, SMITH et al.<sup>138</sup> 1994, WARBURTON<sup>163</sup>1995) e mostram que estas tarefas são bons modelos para estudar este efeito. Nossos resultados também concordam com a maioria dos estudos anteriores que reportam efeitos benéficos da cafeína verificados em modelos de memória e aprendizado para animais. MOLINENGO et al.<sup>106</sup> (1994) relataram a redução no declínio da memória em ratos que receberam administração crônica

de cafeína após a interrupção do treino na tarefa do “*staircase*”, modelo onde os ratos treinados têm de parar em determinados degraus de uma escada. Existem alguns relatos sobre a melhora da consolidação da memória provocada pela cafeína quando administrada depois do treino em tarefas de habituação em ratos (MOLINENGO et al. <sup>105</sup>,1995), esquiiva inibitória em camundongos (CESTARI & CASTELLANO<sup>25</sup>,1996; FLOOD et al. <sup>41</sup>,1978), labirinto com múltiplos compartimentos em camundongos (YONKOV & ROUSSINOV <sup>167</sup>,1983) e esquiiva ativa em ratos (YONKOV <sup>168</sup>,1984).

Os resultados do presente estudo reforçam algumas particularidades do efeito da cafeína como um facilitador da memória que não são sistematicamente estudados nos trabalhos anteriores: 1) o efeito da cafeína é mais evidente quando administrado após o treino, sugerindo um efeito sobre a consolidação da memória; 2) quando administrada antes do treino a cafeína prejudicou a aquisição da memória para algumas tarefas mas não afetou para outras, sugerindo que seu efeito prejudicial sobre esta depende de características particulares de cada situação de aprendizagem; 3) a administração da cafeína imediatamente antes do teste sugere um pequeno efeito benéfico sobre a evocação da memória; 4) os efeitos facilitadores da cafeína sobre a memória são observados com a administração de baixas doses mas não com altas, que podem até causar efeitos opostos.

O efeito da administração pós-treino sobre a consolidação da memória não pode ser atribuído a influência direta na performance do animal já que a droga foi efetiva apenas quando administrada após o treino, e a sessão de teste ocorreu somente 48 h após. Em relação à tarefa do labirinto aquático de Morris, a dose de 10 mg/kg de cafeína causou uma interação positiva com o aumento observado na velocidade do nado como uma função das provas, mas, novamente esta não foi a situação em que a cafeína melhorou a memória. Ela apresentou este efeito benéfico quando administrada após todas as sessões de treino e apresentou os melhores resultados com as doses mais baixas que não melhoraram a velocidade de natação (0,3 mg/kg). Na tarefa de esquiiva inibitória a administração pós-treino de cafeína também houve uma melhora da memória, porém com doses que variaram de 1 a 30 mg/kg. Mesmo nesta tarefa, porém, uma dose maior de cafeína (100 mg/kg) não apresentou efeito. A cafeína não apresentou melhora sobre a memória dos animais quando administrada para camundongos após as sessões de habituação ao campo aberto em

nenhuma das doses testadas, porém a análise de variância mostra uma tendência ( $p = 0,07$ ) dos tratamentos a produzir este efeito.

Muitos dos estudos que apresentam um aumento na retenção da memória são realizados com a administração de cafeína após o treino (CESTARI & CASTELLANO<sup>25</sup>,1996; FLOOD et al.<sup>41</sup>,1978; FLEXNER & FLEXNER<sup>40</sup>,1975; MOLINENGO et al.<sup>105</sup>,1995; YONKOV<sup>166</sup>,1985; YONKOV & ROUSSINOV<sup>167</sup>,1983). Como observado neste estudo, pesquisas anteriores relatam que a administração de cafeína pré-treino é inefetiva ou promove um prejuízo na retenção da memória em animais (BARTUS<sup>6</sup>,1979; FURUSAWA<sup>42</sup>,1991; HUDZIK & WENGER<sup>56</sup>,1993; IZQUIERDO et al.<sup>70</sup>,1979; PAN<sup>117</sup>,1995; SANSONE et al.<sup>130</sup>,1994). O mesmo ocorre em estudos com humanos em que a administração da cafeína antes do treino foi ineficaz (SMITH et al.<sup>138</sup>,1994; LOKE<sup>89</sup>,1988; LOKE et al.<sup>90</sup>,1985) ou prejudica o armazenamento da memória (ERIKSON et al.<sup>33</sup>,1985; TERRY & PHIFER<sup>147</sup>,1986). Contrário a nossos resultados, os experimentos de ROUSSINOV & YONKOV<sup>129</sup>(1976) e YONKOV & ROUSSINOV<sup>167</sup>(1983) com animais relatam um maior efeito da cafeína quando administrado antes da sessão de treino. Entretanto, nestes estudos a cafeína foi administrada 5 min. antes deste e provavelmente está em concentração disponível no plasma apenas após a sessão de treino. Os poucos estudos que investigaram a ação da cafeína sobre a memória operacional sugerem uma ausência de efeitos em animais (FURUSAWA<sup>42</sup>,1991) e em humanos (WARBURTON<sup>163</sup>1995). Um estudo realizado por ERIKSON et al.<sup>33</sup>(1985) sugere que a cafeína pode ser prejudicial para a memória operacional de mulheres, mas não de homens.

Os efeitos amnésicos da administração pré-treino da cafeína não podem ser interpretados como uma “dependência de estado”, fenômeno onde a aprendizagem de uma tarefa só ocorre quando o animal está sob a ação da droga. Isto resulta em uma dependência do “estado de droga”, onde o animal só apresenta uma boa evocação quando novamente neste estado. O efeito amnésico da administração de cafeína antes da sessão de treino da tarefa de esQUIVA inibitória não foi revertido por uma nova administração de cafeína antes da sessão de teste.

A administração da cafeína antes da sessão de teste causou uma tendência a melhorar a memória na tarefa do labirinto aquático (interação tratamento/medida repetida)

e uma melhora significativa da memória na tarefa de esQUIVA inibitória. Estes resultados podem ser interpretados como uma melhora na evocação da memória, sendo que a literatura apresenta poucos estudos sobre este efeito da cafeína. Os resultados obtidos nestes estudos concordam com nossos, sugerindo que a cafeína melhora a evocação da memória. VALZELLI et al.<sup>156</sup> (1986) relatam que a cafeína melhora a evocação da memória de camundongos de aprendizado pobre. RIEDEL et al.<sup>127</sup>(1995) relatam que a cafeína atenua o dano causado pela escopolamina na evocação livre de palavras, em testes de memória de curta e de longa duração. Segundo os mesmos autores, a cafeína também melhora as perturbações causadas pela escopolamina na qualidade e na velocidade da evocação da memória de longa duração em tarefa de aprendizado de palavras em humanos.

Nossos resultados mostraram que apenas doses baixas de cafeína melhoraram a retenção na tarefa do labirinto aquático de Morris. Muitos dos estudos anteriores com animais mostraram um aumento no efeito de retenção da memória com doses baixas, via i.p., de cafeína, na faixa de 0.2 a 2.0 mg/kg para ratos e camundongos (CESTARI & CASTELLANO<sup>25</sup>,1996; ROUSSINOV & YONKOV<sup>129</sup>,1976; YONKOV<sup>166</sup>,1985; YONKOV & ROUSSINOV<sup>167</sup>,1983). Contudo, a diversidade de tarefas para memória e o pequeno número de estudos relatados na literatura não são suficientes para comparações com nossos dados, especialmente se considerarmos a carência de estudos com altas doses. Este efeito pode resultar da interação entre a cafeína com mais do que um alvo celular.

O efeito dual da cafeína, causando uma melhora da memória com doses baixas e prejuízo ou inefetividade em altas doses pode estar refletindo a ação da cafeína em mais de um tipo de receptor. A cafeína é conhecida tanto por agir como antagonista no receptor adenosinérgico A<sub>1</sub> como também no A<sub>2</sub> (BRUNS et al.<sup>15</sup>,1986). O mecanismo pelo qual a cafeína exerce o efeito sobre o aumento da memória é controvertido. Os receptores adenosinérgicos A<sub>1</sub> são densamente expressos no córtex cerebral e no hipocampo (BRUNS et al.<sup>14</sup>,198; MAHAN et al.<sup>92</sup>,1991). A ativação do receptor A<sub>1</sub> da adenosina tem se mostrado um potente inibidor da liberação de acetilcolina dos neurônios piramidais hipocampais (BRILEY<sup>12</sup>,1990; CARTER et al.<sup>21</sup>,1995; MORTON & DAVIES<sup>110</sup>,1997). A acetilcolina, a propósito, tem mostrado ser importante para o armazenamento da memória (EVERITT & ROBBINS<sup>34</sup>,1997). Baseado nisto e no fato de que pessoas idosas

apresentam um declínio progressivo no níveis cerebrais de Ach e são mais susceptíveis aos efeitos benéficos da cafeína sobre a memória, alguns autores consideram que a inibição dos receptores A<sub>1</sub> adenosinérgicos é o principal mecanismo que explica este efeito (RIEDEL & JOLLES<sup>126</sup>,1996). Por outro lado, outros autores acreditam que o efeito antagonista da cafeína sobre o receptor da adenosina, A<sub>1</sub>, não pode explicar seu efeito facilitador sobre memória. Argumentam que agonistas adenosinérgicos A<sub>1</sub>, tais como o N6-(R-fenlisopropil)adenosina (R-PIA) (MOLINENGO et.al.<sup>106</sup>,1994) ou o N6-ciclopentiladenosina (CPA) (VON LUBITZ et al.<sup>161</sup>,1993) não antagonizam o efeito benéfico da cafeína sobre a memória, podendo ainda potencializá-lo, enquanto o antagonista 3- dipropilxantina (DPCPX) não melhora a retenção da memória (VON LUBITZ et al.<sup>161</sup>,1993). Estes autores propõe que o efeito comportamental estimulante das metilxantinas pode ser associado de forma mais conclusiva ao bloqueio dos receptores adenosinérgicos A<sub>2</sub> do que dos receptores A<sub>1</sub> (HOWELL et al.<sup>55</sup>,1997). Os dados apresentados aqui não deixam claro o mecanismo da cafeína, mas reforçam a idéia de que o efeito facilitador ou prejudicial da cafeína sobre a memória pode estar associado à ativação dose-dependente de mais de um tipo de receptor.

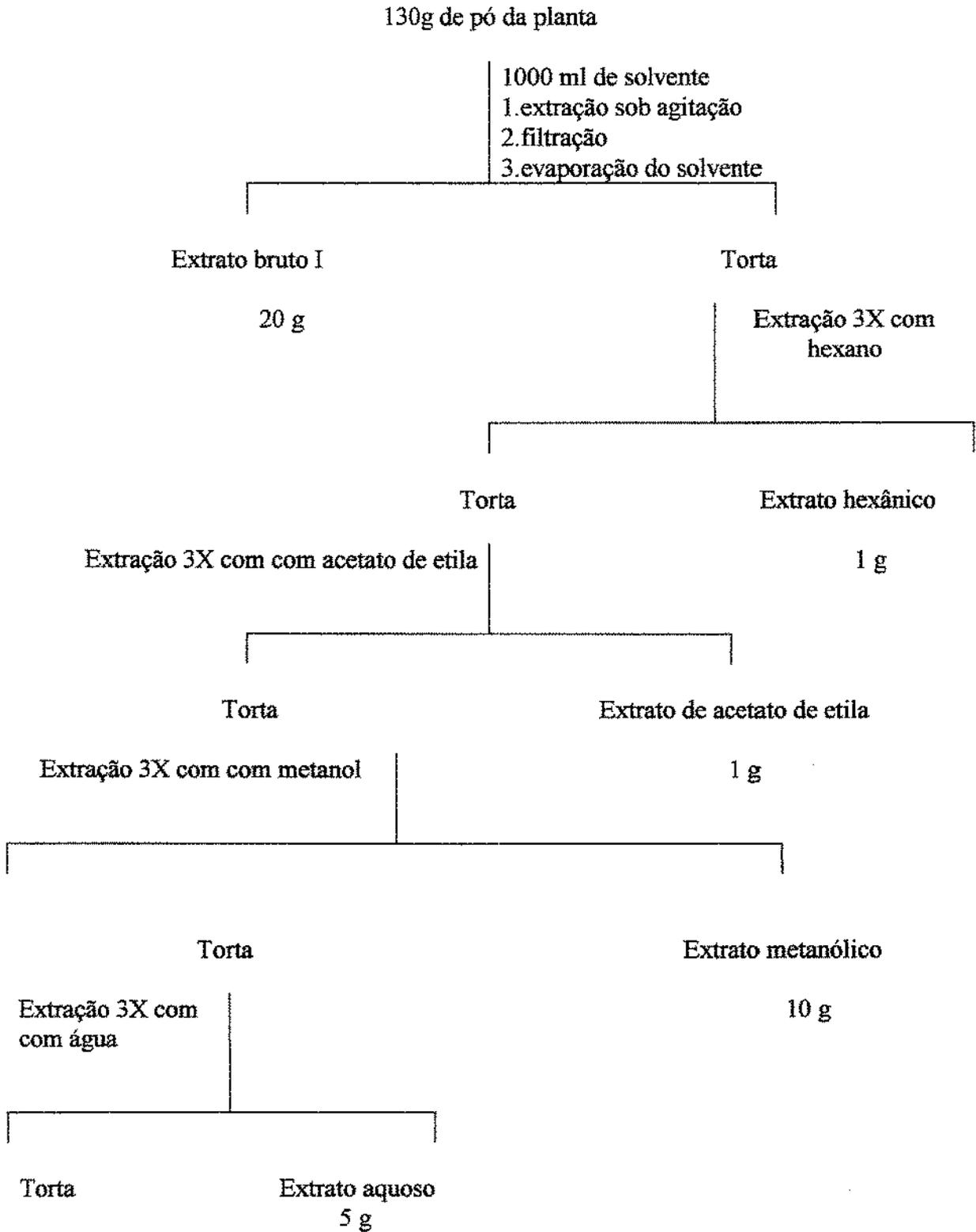
Em resumo, o presente estudo concorda com a idéia geral de que a cafeína pode melhorar a consolidação e a evocação da memória mostrando particularidades deste efeito em um estudo sistemático que usa uma variedade de modelos animais de aprendizagem e memória. Este estudo também aponta para a sorbarina, que apresenta um mecanismo de ação semelhante a da cafeína, como um agente promissor, entre os princípios ativos da planta *P. elegans*, por melhorar a memória quando administrado após o treino de animais em tarefas específicas.

## CONCLUSÕES

1. A planta *Pseudocalymma elegans* apresenta compostos com efeitos tóxicos que podem ser observados em camundongos, constituindo a intoxicação experimental destes animais um bom modelo de intoxicação de bovinos e caprinos com esta planta.
2. Os compostos tóxicos da planta atuam de forma sinérgica, estando concentrados em frações mais polares do extrato da planta.
3. O presente estudo mostra que o efeito sinérgico, de múltiplos constituintes, torna difícil o estabelecimento de uma estratégia farmacológica única para tratar os sintomas da intoxicação com a planta.
4. Os estudos farmacológicos de princípios ativos como a sorbarina e similares, mostram que compostos com efeitos terapêuticos, tais como o de melhorar a memória, podem ser purificados da planta.

## ANEXOS

### Anexo 1. Extração fracionada com Solventes



## Anexo 2. Preparação do Extrato Bruto II

200g de pó da planta

1. 800 ml de água: solvente(1/1), banho-maria por 15 min
2. adição de 800 ml de etanol, agitação por 12 hs
3. filtração exaustiva sob vácuo
4. concentração do solvente

Extrato bruto I  
+ 200 ml água

1. fracionamento por partição com éter de petróleo
2. concentração do solvente

Fração aquosa

Extrato de éter de petróleo  
( + apolar )

1. extração com éter etílico
2. concentração do solvente

Fração aquosa

Extrato etéreo

Resíduo aquoso

1. + KOH 1,0 M
2. pH 7 para 7.0 com HCl

Extrato Bruto II

Testes farmacológicos  
Fracionamento em coluna de sílica-gel  
Filtração em gel Sephadex LH-20

Extrato Bruto II

1. extração com butanol
2. concentração do butanol

Resíduo  
Restante

Extrato butanólico  
(9 g)

1. eluição com 9 ml água
2. filtração em coluna de Sephadex LH-20:
  - eluição com água
  - eluição com água + etanol ( 1:1 )
  - eluição com etanol

monitoramento em UV  
concentração de cada fração em rotavapor (etanol) ou liofilização (água)

Fração J-III

coluna de Sephadex LH-20  
eluição com água

Monitoramento em UV

Testes biológicos

### Anexo 3: Protocolo do Teste Hipocrático de Malone

-Data:-----

-Planta:-----

\*Lote de extração:

\*Animal testado:

\*Droga Usada:

\*Volume Injetado:

\*Sexo:

\*Veículo:

\*Via de Admn.

\*Peso:

\*Conc:

\*Dose:

Ação	Parametros	Con- tro- le	Tempo de injeção														
			0	5	10	15	30	60	4	8	24	48	4	7			
S E	↑ de motilidade																
I S	↑ freq. respiratoria																
S T	-piloreção																
T I	-exoftalmia																
E M	-mov. estereotipados																
M U	-lamber patas																
A L	-coçar focinho																
A	-morder cauda																
N N	-convulsao clonica																
E T	-convulsao toxica																
R E	-tremores finos																
V S	-tremores grosseiros																
O	-sialorreia																
S	-fasciculações																
O	-midriase																
	-ereção da cauda																
	-tremor da cauda																
C	-diametro pupilar																
E	↓ motilidade																
N D	↓ freq. cardiaca																
T E	-catatonía																
R P	-ptose palpebral																
A R	-analgesia																
L E	-anestesia																
S	-perda reflexo corneano																
S	-ataxia																
O	-dispneia																
R	-alienação ao ambiente																
E	-tonus da costa																
S	-perda da apreens. pat																
	-exoftalmia																
	-paralisia trem poster																
	-sedação																
	-diametro pupilar																
O DRE	-palidez																
U LHA	-cianose																
T	-hiperemia																
R MIC	-aumentada																
O ÇAO	-diminuida																
S	-coloração																
	-diarreia																
E	-contorção																
F	-reação de fuga																
E	-passividade																
ITDS	-agressividade																
	-erunhidos																

Coração: arritmico..... parada sistole..... diastole.....  
 Intestino: oticidade..... s/motilidade..... hiperemia.....  
 Cor: fixado..... baço..... pulmões..... rins.....  
 Sangue: precoagulado..... coagulado..... não coagulado.....  
 Vesiculabiliar: estendida..... normal..... cheia..... cor.....

**Anexo 4: Protocolo do Teste Hipocrático de Irwin**

DROGA	DOSE		VIA					
ANIMAL	PESO		GAIOLA					
DATA	MANHÃ ( )			TARDE ( )				
TEMPO (min)								
	0	30	60	90	120	150		
Sono								
Fechamento palpebral								
Atividade locomotora								
Comportamento bizarro								
Exoftalmia								
Taxa respiratória								
Tremores								
Contorções								
Convulsões								
Vocalização								
Urina								
Defecação								
Transferência								
Morte								
Observação								

DROGA	DOSE		VIA					
ANIMAL	PESO		GAIOLA					
DATA	MANHÃ ( )			TARDE ( )				
TEMPO (min)								
	0	30	60	90	120	150		
Locomoção espacial								
Fechamento palpebral								
Piloereção								
Estalar de dedos								
Corrida								
Elevação pélvica								
Elevação da cauda								
Aproximação do dedo								
Retirada do dedo								
Fuga ao toque								
Andar atáxico								
Andar hipotônico								
Outro problema ao andar								
Rotação de membros								
Total incapacidade ao andar								
Catatonía								
Vocalização								
Urina								
Defecação								
Morte								
Observação								

DROGA	DOSE		VIA				
ANIMAL	PESO		GAIOLA				
DATA	MANHÃ ( )		TARDE ( )				
TEMPO (min)							
	0	30	60	90	120	150	
Acomodação visual							
Força ao agarrar							
Tônus corporal							
Hipotermia							
Pavilhão do ouvido							
Córnea							
Esforço em relação a posição							
Manuseio do arame							
Cor da pele							
Diarréia							
Tônus das patas							
Tônus abdominal							
Tamanho da pupila							
Pupila - luz							
Lacrimejamento							
Salivação							
Morder							
Beliscão no dedo do pé							
Beliscão na cauda							
Reflexo de "righting"							
Tendência a morder							
Vocalização							
"Freezing" provocado							
Urina / Defecação							
Morte							

## Anexo 5

Tabela A5: Efeito da administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* sobre o comportamento de camundongos em um campo aberto.

	N	Nº de cruzamentos	Nº de levantar	Tempo parado	Tempo limpeza	de Nº de bolos fecais
Veículo	13	118,9±4,9	37,4±3,3	0,8±0,5	8,5±1,9	0,62±0,29
Extrato	13	106,8±17,9	6,8±2,8 #	40,5±17,7 *	7,5±4,4	0,08±0,08

Os camundongos receberam 1g/kg i.p. do extrato da planta ou veículo e 30 min antes do teste. Os resultados estão expressos como média ± EPM. \*  $p \leq 0,05$ ; #  $p \leq 0,001$  teste t de Student.

## Anexo 6

Tabela A6: Efeito da administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* sobre o comportamento de camundongos em um labirinto em cruz elevado.

	N	Nº total de entradas	% de braços abertos	% tempo braços abertos	% tempo braços fechados
Veículo	13	23,5±1,7	57,2±2,2	36,6±3,7	34,7±4,0
Extrato	13	16,1±1,9#	39,8±3,7+	19,9±4,1#	55,8±6,5*

Os camundongos receberam 1g/kg i.p. do extrato da planta ou veículo e 35 min antes do teste. Os resultados estão expressos como média ± EPM. \*  $p \leq 0,02$ ; #  $p \leq 0,01$ ; +  $p \leq 0,001$  teste t de Student.

## Anexo 7

Tabela A7: Efeito da administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* sobre o comportamento de camundongos na atividade locomotora espontânea.

	N	Nº de cruzamentos
Veículo	13	67,00±8,35
Extrato	13	40,46±7,80*

Os camundongos receberam 1g/kg i.p. do extrato da planta ou veículo e 40 min após foram observados por 5 min em uma caixa automatizada de locomoção espontânea. Os resultados estão expressos como média ± EPM. \*  $p \leq 0,05$  teste t de Student.

## Anexo 8

Tabela A8: Efeito da administração do extrato bruto II da planta *P. elegans* sobre o tônus muscular de camundongos.

	N	Tempo (s)
Veículo	13	40 (13,7/120)
Extrato	13	46 (16/99)

Os camundongos receberam 1g/kg i.p. do extrato da planta ou veículo e 45 min após foram dependurados pelas patas anteriores em um arame esticado e observados. Os resultados estão expressos como mediana (intervalos interquartis) do tempo de permanência no arame. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (teste U de Mann-Whitney).

## Anexo 9

Tabela A9: Efeito da administração de compostos isolados da planta *P. elegans* sobre o comportamento de camundongos em um campo aberto.

Droga	N	n° de cruzamentos	n° de levantar	tempo parado (s)	tempo de limpeza (s)	n° de bolos fecais
Veículo	19	6 (0,2/31)	0 (0/0)	152 ± 19	0,26 ± 0,21	0,0 (0,0/0,0)
Alantoína	19	4 (2/16)	0 (0/0)	186 ± 14	0,11 ± 0,10	0,0 (0,0/0,0)
Sorbarina	20	8 (0,5/28)	0 (0/0)	189 ± 16	0,00 ± 0,00	0,0 (0,0/0,0)
Triumboidina	20	5 (2/21)	0 (0/0)	174 ± 13	0,00 ± 0,00	0,0 (0,0/0,0)

Os camundongos receberam 4 mg/kg de alantoína, sorbarina, triumboidina ou do veículo (i.p.) 30 min antes do teste. Os resultados estão expressos como mediana (intervalos interquartis) ou como média ± EPM. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (dados paramétricos: Kruskal Wallis ANOVA  $p > 0,2$ ; dados não paramétricos: ANOVA  $p > 0,2$ ).

## Anexo 10

Tabela A10: Efeito da administração de compostos isolados da planta *P. elegans* sobre o comportamento de camundongos em um labirinto em cruz elevado.

Droga	N	n° total de entradas	% entradas braço aberto	% tempo no braço aberto	% tempo braço fechado
Veículo	19	8,74 ± 1,00	14,5 ± 4,0	4,8 ± 1,4	64,5 ± 3,9
Alantoína	19	6,95 ± 0,76	7,7 ± 2,9	1,3 ± 0,6 *	82,9 ± 3,0*
Sorbarina	20	6,15 ± 0,61	4,7 ± 2,0	1,4 ± 0,7	76,1 ± 4,1
Triumboidina	20	8,35 ± 0,71	20,7 ± 3,7	10,8 ± 2,5	65,3 ± 4,8

Os camundongos receberam 4 mg/kg i.p. de alantoína, sorbarina, triumoidina ou veículo 35 min antes dos teste. Os resultados estão expressos como média ± EPM. \*p ≤ 0,05, teste de Newman-Keuls precedido por ANOVA de uma via.

## Anexo 11

Tabela A11: Efeito da administração de compostos isolados da planta *P. elegans* sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos.

Droga	N	Nº de cruzamentos
Veículo	19	23 (15,0 / 33,7)
Alantoína	19	17 (11,5 / 21,5)
Sorbarina	20	19 (15,0 / 24,0)
Triumboidina	20	23 (13,5 / 27,0)

Os camundongos receberam 4 mg/kg i.p. de alantoína, sorbarina, triumoidina ou veículo 40 min antes dos teste. Os resultados estão expressos como mediana (intervalos interquartis). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Kruskal Wallis ANOVA  $p > 0,2$ ).

## Anexo 12

Tabela A12: Efeito da administração de compostos isolados da planta *P. elegans* sobre o tônus muscular de camundongos.

Droga	N	Tempo (s)
Veículo	19	171 ± 28
Alantoína	19	138 ± 27
Sorbarina	20	139 ± 23
Triumboidina	20	192 ± 24

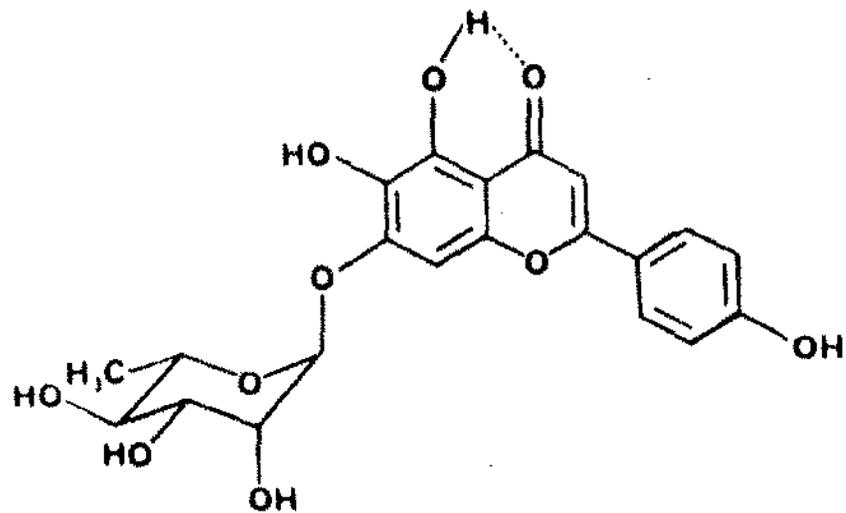
Os camundongos receberam 4 mg/kg i.p. de alantoína, sorbarina, triumboidina ou veículo 45 min antes dos teste. Os resultados estão expressos como mediana (intervalos interquartis). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Kruskal Wallis ANOVA  $p > 0,2$ ).

### Anexo 13

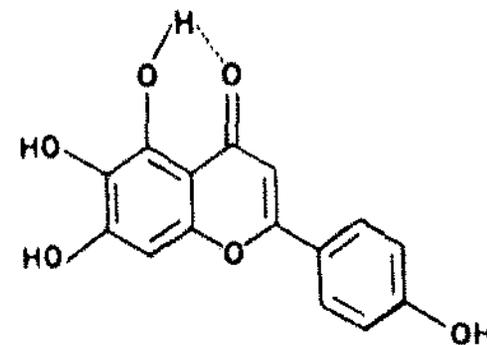
Tabela A13: Efeito da administração de compostos isolados da planta *P. elegans* sobre o teste de catatonía em camundongos.

Droga	N	Tempo (s)
Veículo	19	22,2 ± 2,2
Alantoína	19	23,2 ± 2,3
Sorbarina	20	28,9 ± 0,6
Triumboidina	20	28,4 ± 0,8

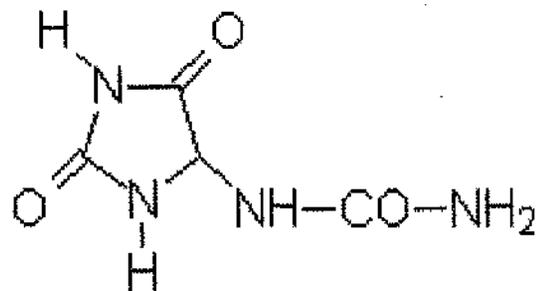
Os camundongos receberam 4 mg/kg i.p. de alantoína, sorbarina, triumboídina ou veículo 50 min antes dos teste. Os resultados estão expressos como média ± EPM. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA  $p > 0,2$ ).



SORBARINA



ESCUTELAREÍNA



ALANTOÍNA

Figura 33: Alguns compostos purificados da planta *Pseudocalymma elegans*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRANOFF, B.W. Learning and memory. *In: SIEGEL, G.J., AGRANOFF, B.W., ALBERTS, R.W. Basic Neurochemistry*, New York: Raven Press, 1989, p.915-927.
2. AHLJANIAN, M., TAKEMORI, A .E. Cross tolerances studies between caffeine and (-)-N<sup>6</sup>(phenylisopropyl)-adenosine (PIA) in mice . *Life Sciences*, v. 38, p.577-588, 1986 .
3. ANDREATINI, R., CALIL, H.M. Uso de anticonvulsivantes em psiquiatria. *In: OLIVEIRA, I.R. Manual de Psicofarmacologia Clínica*. São Paulo: MEDS, 1994, cap.9, p. 241-272.
4. ANGELUCCI, M.E.M., et al. The effect of caffeine on learning and memory of the Morris water maze, *Psychopharmacology* [no prelo]
5. BARRACO, R.A. et al. Adenosine A<sub>2A</sub> receptors in the nucleus accumbens mediate locomotor depression . *Brain Research Bulletin*, v.31, p.397-404, 1993 .
6. BARTUS, R.T., Four stimulants of the central nervous system: effects on short-term memory in young versus aged monkeys. *J. Am. Geriatr. Soc.*, v. 27, p.289, 1979.
7. BAUNDRY, M., LYNCH, G., Glutamate receptor regulation and the substrates of memory. *In: LYNCH, G., MCGAUGH, J.L., WEINBERGER, N.M. Neurobiology of learning and memory*, New York: Guilford Press, 1984, p.431-450.
8. BEAR, M.F. How do memories leave their mark? *Nature*, v. 385, p. 421-422, 1997.

9. BLISS, T.V.P., DOLPHIN, A.C. Where is the locus of long-term potentiation? *In*: LYNCH, G., MAGAUGH, J.L., WEINBERGER, N.M. **Neurobiology of learning and memory**, New York: Guilford Press, 1984. p.451-458.
10. BLOOM, F.E. Neurotransmissão e o Sistema Nervoso Central. *In*: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: MC Graw Hill, 1996, cap. 12, p. 197-216.
11. BOULENGER, J.P. et al. Chronic caffeine consumption increases the number of brain adenosine receptors. **Life Sciences**, v.32, p.1135-1142, 1983.
12. BRILEY, M. Biochemical strategies in the search for cognition enhancers. **Pharmacopsychiatry**, 2: 78-80, 1990.
13. BRODIN, L., SHUPLIAKOV, O. Functional diversity of central glutamate synapses- pre- and post-synaptic mechanisms. **Acta Physiol. Scand.**, v.150, p. 1-10, 1994.
14. BRUNS, R.F. et al. Binding of the A<sub>1</sub>-selective adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine to rat brain membranes. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v.335, p. 59-63, 1987.
15. \_\_\_\_\_, LU, G.H., PUGSLEY, T.A. Towards selective adenosine antagonist. *In*: STEFANOVICH, V., RUDOLPHI, K., SHUBERT, P. **Adenosine: receptors and modulation of cell functions**. Oxford: IRL Press, p. 51-58, 1986.
16. CAHILL, L., MCGAUGH, J.L. Amygdaloid complex lesions differentially affect retention of tasks using appetitive and aversive reinforcement. **Behav. Neurosci.**, v. 104, 532-543, 1990.

17. CALEV, A. Neuropsychology and ECT: past and future research trends, **Psychopharmacol. Bull.**, v. 30, p 461, 1994.
18. CARLINI, E. A. **Farmacologia Prática sem Aparelhagem**. São Paulo: Ed. Sarvier,1973.198p.
19. CARRASCO, M.A., DIAS, R.D., IZQUIERDO, I. Naloxone reverses retrograde amnesia induced by electroconvulsive shock. **Behav. Neural Biol.**, v. 34, p. 352-357, 1982a.
20. \_\_\_\_\_ et al. Effect of tones, footshocks, shuttle avoidance and electroconvulsive shock on met-enkephalin immunoreactivity of rat brain. **Behav. Neural Biol.**, v.34, p.1-4, 1982b.
21. CARTER, A.J. et al. Caffeine enhances acetylcholine release in the hippocampus in vivo by a selective interaction with adenosine A1 receptors. **J. Pharmacol Exp. Ther.**, v. 273, p.63, 1995.
22. CASTELLANO, C., INTROINI-COLLINSON, I.B., MCGAUGH, J.L. Interaction of betaendorphin and GABAergic drugs in the regulation of memory storage. **Behav. Neural Biol.**, v. 60, p.123-128, 1993 .
23. CAUL, W.F. et al. Effects of hippocampal lesions on rate in aversive classical conditioning. **Physiol. Behav.**, v. 4, p. 917-922, 1969.
24. CAVALHEIRO, E.A. et al. Anticonvulsant role of adenosine. **Pol. J. Pharmacol. Pharm.** v. 39, p. 537-544, 1987.
25. CESTARI, V., CASTELLANO, C. Caffeine and cocaine interaction on memory consolidation in mice. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 331, p.9, 1996.

26. CRUZMORALES, S.E. et al. Effects of GABA antagonists on inhibitory avoidance. **Life Sci.**, v. 53, p. 1325-1330, 1993 .
27. DA CUNHA, C . **Modulação da memória por Ligantes Endógenos do Receptor Benzodiazepínico Central**. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - UFPR, 1992.159 p .
28. \_\_\_\_\_, et al. Effect of posttraining injections of flumazenil into amygdala, hippocampus, and septum on retention of habituation and inhibitory avoidance in rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 23, p.301, 1990.
29. DANYSZ, W., ZAJACZKOWSKI, W., PARSONS, C.G. Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. **Behav. Pharmacol.**, v.6. p. 455-474, 1995.
30. DAVIS, M., RAINNIE, D., CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety, **Trends. Neurosci.**, v. 17, p.208-214, 1994.
31. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
32. DURCAN, M.J., LISTER, R.G., LINNOILA, M. Behavioral effects of alpha sub(2) adrenoceptor antagonists and their interactions with ethanol in tests of locomotion, exploration and anxiety in mice. **Psychopharmacology**, v. 97, p. 189-193, 1989.
33. ERIKSON, G.C., et al. The effects of caffeine on memory for word lists. **Physiol. Behav.**, v. 35, p. 47, 1985.

34. EVERITT, B.J., ROBBINS, T.W. Central cholinergic system and cognition. **Ann Rev Psychology**, v. 48, p. 649-684, 1997.
35. FAHMY, R.A. et al. **Hel. Chi. Acta.**, v.44, p.200-222, 1961. *In*: STAHL, E. **Thin-layer chromatography. A laboratory handboock.** 2.ed.Berlin: Springer-Verlag, 1969, 889 p.
36. FARKAS, S., TARNAWA, I., BEZENY, P. Effects of some centrally acting muscle relaxants on spinal root potentials: A comparative study. **Neuropharmacol.**, v. 28, p. 161-173, 1989.
37. FILE, S.E., ARANKO, K. Sodium valproate and chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test of anxiety in the rat. **Neuropsychobiology**, v. 20, p. 82-86, 1988.
38. FISHER, S., GUILLET, R. Neonatal caffeine alters passive avoidance retention in rats in an age and gender-related manner. **Brain Res. Developmental Brain**, v. 98, p. 145, 1997.
39. FLETCHER, P.C., FRITH,C.D., RUGG, M. D. The functional neuroanatomy of episodic memory. **TINS.** v. 20, p. 213-218, 1997.
40. FLEXNER J.B., FLEXNER, L.B. Puromycin's suppression of memory in mice as affected by caffeine. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.3, p. 13-17, 1975.
41. FLOOD, J.F. et al. Memory: modification of anisomycin-induced amnesia by stimulants and depressants. **Science**, v. 199, p.324-326, 1978.
42. FURUSAWA, K. Drug effects on cognitive function in mice determined by the non-matching to sample task using a 4-arm maze. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 56, p.48, 1991.

43. FUSTER, J.M. Network memory. *TINS.*, v.20, p. 451-459, 1997.
44. GARRET, B. E., HOLTZMAN, S. G. D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor antagonists block caffeine-induced stimulations of locomotor activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 47, p. 89-94, 1994.
45. GEISE, R. J., MACHNICKI, N.I., IANNIELLO, R.M. Determination of allantoin in cosmetic products by capillary zone electrophoresis. *Analytical Letters*, v. 27, p.183-194, 1994.
46. GIL, B. et al. Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A(2) and inflammatory responses in mice. *Life Sciences*, v. 54, p. 333-338, 1994.
47. GLOWA, J.R., SPEALMAN, R.D. Behavioral effects of caffeine, N<sup>6</sup>-(L-phenylisopropyl) adenosine and their combination in the squirrel monkey. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 231, p.665-670, 1984.
48. GRAEFF, F. G. **Drogas psicotrópicas**. São Paulo: Editora Pedagógica Universitária, 1984. 135p.
49. \_\_\_\_\_, VIANA, M.B., TOMAZ, C. The elevated T - maze, a new experimental model of anxiety and memory : effect of Diazepam. *Braz . J . Biol . Res.*, v.26, p. 67 - 70, 1993.
50. GRIEBEL , G. et al. Comparison of the behavioral effects of an adenosine A sub(1)/A sub(2)-receptor antagonist, CGS15943A, and A sub(1)-selective antagonist, DPCPX. *Psychopharmacology*, v. 103, p. 541-544, 1991.

51. GRIFFITHS, R.R., WOODSON, P.P. Reinforcing properties of caffeine: Studies in humans and laboratory animals. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 29, p.419-427, 1988.
52. HARDMAN, J.G., LIMBRID, L. **Goodman & Gilman: As bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill Interamericana de Editores,S.A., 1996. 1436p.
53. HASRAT, J.A. et al. Adenosine - 1 active ligands: cirsimarin, a flavone glycoside from *Microtea debilis*. **J.Nat.Prod.**, v. 60, p. 638-641, 1997.
54. HOCK, F.J. Therapeutic approaches for memory impairments. **Behav. Brain Res.**, v. 66, p. 143-150, 1995.
55. HOWELL, L.L., COFFIN, V.L., SPEALMAN, R.D. Behavioral and physiological effects of xanthines in nonhuman primates. **Psychopharmacology**, v. 129, p.1-14, 1997.
56. HUDZIK, T.J., WENGER, G.R. Effects of drugs of abuse and cholinergic agents on delayed matching-to-sample responding in the squirrel monkey. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 265, p.120, 1993.
57. IRWIN, S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic , quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse . **Psicopharmacol.**, v. 13, p.222-257, 1968.
58. IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. **Behav. Neural Biol.**, v. 51, p. 171-202, 1989.

59. IZQUIERDO, I., et al. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amigdala , medial septum , and hippocampus of the rat . **Behav. Neural Biol.**, v. 58, p.16 - 26 , 1992 .
60. \_\_\_\_\_, Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: Possible role of endogenous opiate machanisms in memory consolidation. **Psycopharmacology**, v. 66, p.199-203, 1979.
61. \_\_\_\_\_, Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB J.** v.8, 1139-1145, 1994.
62. \_\_\_\_\_, Pharmacology of memory: drugs acting upon the neurotransmitter mechanisms involved in memory consolidation. *In:* DELACOUR,S. **The memory of brain**. Singapoure: World Scientific Publishing,1994, p. 363-388.
63. \_\_\_\_\_, The neurobiology of memory consolidation. **Neurosciences**, v. 18, p. 1-11, 1992.
64. \_\_\_\_\_ et al. Mechanims for memory types differ. **Nature**. v. 393, p.635-636, 1998.
65. \_\_\_\_\_, MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiology of learning and memory**. v.68, p. 285-316, 1995.
66. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**. v.63, p. 19-32, 1997.

67. IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. **Braz . J . Biol . Res.** v.26, p. 573-589, 1993 .
68. \_\_\_\_\_, et al. Constructions e reconstruction of memories. **Brazilian J. Bio. Res.**, v. 21, p.9-25, 1988.
69. \_\_\_\_\_, et al. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats, **Eur. J. Neurosci.** v.9, p. 786-793, 1997.
70. IZQUIERDO J.A. et al. Effect of caffeine on the memory of the mouse. **Psychopharmacology**, v. 61, p. 29-30 ,1979.
71. JAMES, W. **Principles of Psychology**. New York: Holt, 1890. *Apud* SQUIRE, L.R., KNOWLTON, B., MUSEN, G. The structure and organization of memory. **Annu.Ver.Psychol.**, v. 44,p. 453-495, 1993.
72. JARVIK, M., KOPP, A. An improved one - trial passive avoidance learning situation. **Psychol. Rep.**, v. 21, p. 221-224, 1967 .
73. JARVIS, M.J. Does caffeine intake enhance absolute levels of cognitive performance? **Psychopharmacology**, v. 110, p. 45-52, 1993.
74. JL, X.D., MELMAN, Y.A., JACOBSON, K.A. Interactions of flavonoids and other phytochemicals with adenosine receptors, **J.Med. Chem.**, v. 39, p. 781-788, 1996.
75. KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSEL, T.M. **Principles of Neural Science**. Connecticut: Appleton & Lange, 1991. 1135p.

76. KANT, G.J. Effects of psychoactive drugs or stress on learning, memory, and performance as assessed using a novel water maze task. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 44, p.287, 1993.
77. KARTON, Y. et al. Synthesis and biological activities of flavonoid derivatives as A3 adenosine receptor antagonists. **J.Med.Chem.**, v. 39, p. 2293-2301, 1996.
78. KATZ, J.L., GOLDBERG, S.R. Psychomotor stimulant effects of caffeine alone and in combination with adenosine derivatives. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 242, p.179-187, 1987.
79. KENEMANS, J.L., VERBATEN, M.N. Caffeine and visuo-spatial attention. **Psychopharmacology**, v. 135, p.353, 1998.
80. KREBS, H.C. Ingredients from *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhl.: 1 Isolation of allantoin, lamiide and sorbarin. **Z. Naturforsch B. Chem. Sci.**, v. 42, p.1361-1364, 1987.
81. KREBS, H.C. Ingredients from *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhl.: 1 Isolation of a new iridoid glucoside and of durantoside II. **Z. Naturforsch B. Chem. Sci.**, v. 46, p.1258-1260, 1991.
82. KUHLMANN, J.G. Uma bignoniaceae pouco conhecida. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.5, n.14, p.364-368, 1941.
83. LEMOINE, A.P. et al. Footshock effects heart and brain MAO and MAO inhibitory activity and open field behavior in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.36, p.85-88, 1990.

84. LIDEN, D.J. Phospholipase A2 controls the induction of short-term versus long-term depression in the cerebellar Purkinje neuron in culture. **Neuron**, v.15, p. 1393-1401, 1995.
85. LINDE, L. An auditory attention task: a note on the processing of verbal information. **Percept Mot Skills**, v. 78, p.563-570, 1994.
86. LINDEN, J. Purinergic Systems. *In*: SIEGEL et.al. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical aspects**. New York: Raven Press, Ltd., 1994. Cap. 19, p. 401-416.
87. LISTER, R.G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p.180-185, 1987.
88. LISTER, R.G. Interactions of ethanol with benzodiazepine receptor ligands in tests of exploration, locomotion and anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 31, p. 761-766, 1988.
89. LOKE, W.H. Effects of caffeine on mood and memory. **Physiol Behav.**, v. 44, p. 367-372, 1988.
90. LOKE, W.H., HINRICHS, J.V., GHONEIM, M.M. Caffeine and diazepam: separate and combined effects on mood, memory, and psychomotor performance. **Psychopharmacology**, v.87, p.344-350, 1985.
91. LYNCH, G., BAUNDRY.M. The biochemistry of memory: A new and specific hypothesis. **Science**, v.224, p. 1057-1063, 1984.
92. MAHAN, L.C. et al. Cloning and expression of an A1 adenosine receptor from rat brain. **Mol Pharmacol**, v. 40, p.1-7, 1991.

93. MALONE, M.H., ROBICHAUD, R.C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*, v. 25, p.320-332, 1962.
94. MASUR, J. Sex differences in "emotionality" and behavior of rats in the open-field. *Behav. Biol.*, v.7, p. 749-754, 1972.
95. MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1988. 128p.
96. MCGAUGH, J.L. Drug facilitation of learning and memory, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.13, p. 229, 1973.
97. \_\_\_\_\_, CAHILL, L. Interaction of neuromodulatory systems in modulating memory storage. *Behav. Brain Res.*, v. 83, p. 31-38, 1997.
98. \_\_\_\_\_, et al. Adrenergic influences on memory storage: Interaction of peripheral and central systems. *In: LINCH, G., MACGAUGH, J.L., WEINBERGER, N.M. Neurobiology of learning and memory*. New York: Guilford Press, 263-288, 1984.
99. MCNAMARA, J.O. Fármacos eficazes no tratamento da epilepsias. *In: HARDMAN, J.G., LIMBRID, L. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: MC Graw Hill Interamericana de Editores,S.A., 1996, cap. 20, p. 335-353.
100. MELDRUM, B.S. Neurotransmission in Epilepsy. *Epilepsia*. v. 36(Supl. 1), p. s30-s35, 1995.
101. MELLO, E.M.M., FERNANDES,J.S. Contribuição ao estudo de plantas tóxicas brasileiras. *Ser. Inf. Agrícola, Min. Agricultura*, Rio de Janeiro, p.43-98, 1941.

102. MELLO, L.E.A.M., BORTOLOTTI, Z.A., CAVALHEIRO, E.A. Modelos experimentais de epilepsia: uma revisão. **Neurobiol. Recife**, v. 49, p. 231-268, 1986.
103. MILNER, B., SQUIRE, L.R., KANDEL, E.R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, v. 20, p. 445-468, 1998.
104. MISHIN, M., Memory in monkeys is severely impaired by combined but not separate removal of amygdala and hippocampus. **Nature**, v. 172, p. 297-298, 1978.
105. MOLINENGO, L. et al. Habituation of exploratory activity in rats: action of N<sup>6</sup>phenylisopropyladenosine, caffeine and their combination. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 19, p. 1189-1200, 1995.
106. \_\_\_\_\_, SCORDO, I., PASTORELLO, B. Action of caffeine, L-PIA and their combination on memory retention in the rat. **Life Sci.**, v. 54, p. 1247-1250, 1994.
107. MOREIRA, E.A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlbr. E. *Lobelia stellfeldii* R. Braga. Campanulaceae. **Trib. Farma.**, Curitiba, v. 74, n. 1, p. 3-29, 1979.
108. MORRIS, R.G.M. et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, p. 681-683, 1982.
109. MORRISON, R.T., BOYD, R.N. **Química Orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981. 1498p.

110. MORTON, R.A., DAVIES, C.H. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor-mediated synaptic responses by adenosine receptors in the rat hippocampus. **J. Physiol.**, v. 502, p. 75-90, 1997.
111. MUNIER, R., MACHEBOEUF, M., CHERRIER, N. Microchromatographie des alcaloïdes et des bases azotées biologiques sur papier traité préalablement par des sels. II. Amélioration de la technique des phases solvantes acides. Utilisation de papier imprégné par un sel dont l'anion est celui de l'acide qui acidifie la phase solvante. **Bull. Soc. Chi. Biol.**, v.34, n.1-2, p.204-214, 1952.
112. NAKASHIMA, T. **Étude phytochimique, évaluation des activités antifongiques et antivirales de trois Verbenaceae: *Lippia alba* N.E.Brown, *Lippia multiflora* Mold., *Citharexylum myrianthum* Cham.** Thèse (Docteur), Institut National Polytechnique de Toulouse, France 1993. 199p.
113. NAZARIO, G.M., LOVATT, C.J. Regulation of purine metabolism in intact leaves of *Coffea arabica*. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 1195-1201, 1993.
114. NETTO, C.A., DIAS, R. D., IZQUIERDO, I. Differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and water-finding task, **Psychoneuroendocrinology**, v.82, p.322-326, 1986.
115. ONGINI, E., FREDHOLM, B. Pharmacology of adenosine A<sub>2a</sub> receptors. **Trends in Pharmacological Science**, v. 17, p. 364-372, 1996.
116. PAEIVAERINTA, P., KORPI, E. R. Voluntary ethanol drinking increases locomotor activity in alcohol-preferring AA rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 44, p. 127-132, 1993.

117. PAN, S.Y. Features of memory on novel situation and avoidance response: evidence from comparisons between open-field behavior and step-through task. **Chung. Kuo. Yao. Li. Hsueh. Pao.**, 16, 125, 1995.
118. PARK, K.S., KWON, Y.M. The analysis of canacanine content in leaves, roots, and xylem exudate of *Canavalia lineata*. **Korean J. of botany**, v. 33, p.119-126, 1990.
119. PAXINOS,G., WATSON,C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press, 1986. 138p.
120. PELOW, S. et al. Validation of fopen closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.
121. POLLINA, D.A., CALEV, A. Amnesia associated with electroconvulsive therapy - progress in pharmacological prevention and treatment. **CNS Drugs**, v.7, p.381, 1997.
122. PONS, L. et al. Attentional effects of caffeine in man: Comparison with drugs acting upon performance, **Psychiatry Res.**, v. 23, p. 329, 1988.
123. PORSOLT, R.D., MCARTHUR, R.A., LENSĞRE, A. Psychotropic screening procedures. *In*: F. van Haareb (Ed) **Methods in behavioral pharmacology**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993. Cap.2, 23-51.
124. QUIRARTE, G.L. et al. Effects of central muscarinic blockade on passive avoidance: Anterograde amnesia, state dependency, or both? **Behav. Neural Biol.**, v. 62, p. 15, 1994.

125. RAJAVELU, S., SARALABAI, V.C., VIVEKANANDAN, M. Evaluation of N-2 fixation by stem and root nodules in *Sesbania rostrata* during rainy and dry months. **Applied Biochem.& Biotechn.**, v. 49, p. 143-151, 1994.
126. RIEDEL , W.J., JOLLES, J. Cognition enhancers in age-related cognitive decline. **Drugs therapy**, v. 8, p. 245-274, 1996.
127. \_\_\_\_\_, et al. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. **Psychopharmacology**, v. 122, p. 158-168, 1995.
128. ROSE, S.P.R., Memory - the brain's rosetta stone ? **Concepts in Neurosci.**, v.2, p.43-64, 1991.
129. ROUSSINOV, K.S., YONKOV, D.I. Cholinergic mechanisms in the learning and memory facilitating effect of caffeine. **Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.**, v. 2, p. 61, 1976.
130. SANSONE, M., BATTAGLIA, M., CASTELLANO, C. Effect of caffeine and nicotine on avoidance learning in mice: lack of interaction, **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 765, 1994.
131. SANZ, M.J. et al. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**, v.24, p. 689-699, 1994.
132. SARTER, M . Taking stock of cognition enhancers , **Trends Pharmacol . Science**, v. 12, p. 456 - 461, 1991 .
133. SARTER, M ., BRUNO, J.P. Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. **Brain Research Reviews**, v. 23, p. 28-46, 1997.

134. SCHELTENS, P., VAN GOOL, W.A. Emerging treatments in dementia. **Eur. Neurol.**, v. 38, p.184, 1997.
135. SCHÜTZ, R.A. et al. The central nervous system stimulant effects of the ethanolic extract from the toxic brazilian plant *Pseudocalymma elegans*, **Braz. J. Veterinary Res. Animal Sci.**, São Paulo, v.33, n.2, p.82-88, 1996.
136. SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica para as Ciências do comportamento.** São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 350p.
137. SIMIAND, J. et al. Comparative study in mice of tetrazepam and other centrally active skeletal muscle relaxants. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v 297, p. 272-285, 1989.
138. SMITH, A., MABEN, A., BROCKMAN, P. Effects of evening meals and caffeine on cognitive performance, mood and cardiovascular functioning. **Appetite**, v. 22, p.57, 1994.
139. SOLOMON, P.R., MOORE, J.W. Latent inhibition and stimulus generalization of the classically conditioned nictitating membrane response in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) following dorsal and hippocampal ablation. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v.89, p. 1192-1203, 1975.
140. SPEALMAN, R.D. Psychomotor stimulant effects of methylxantines in squirrel monkey: relation to adenosine antagonism. **Psychopharmacology**, v. 95, p. 19-24, 1988.
141. SQUIRE, L.R. **Memory and brain.** New York: Oxford University Press, 1987. 315p.

142. SQUIRE, L.R., KNOWLTON, B., MUSEN, G. The structure and organization of memory. *Annu. Ver. Psychol.*, v. 44, p. 453-495, 1993.
143. STAHL, E. **Thin-layer chromatography. A laboratory handboock.** 2.ed. Berlin: Springer-Verlag, 1969, 889 p.
144. **STEDMAN Dicionário Médico.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1979. v.1.
145. SWINYARD, E.A. et al. Experimental selection, quantification, and evaluation of anticonvulsants. *In: LEVY, R., MATTSON, R., MELDRUM, B. Antiepileptic Drugs.* New York: Raven Press, Ltd., 1989. Cap.5, p.85-102.
146. TAVARES, M.I., RESENDE, A.M.L., DOBEREINER, J. Intoxicação experimental por *Pseudocalymma elegans* em coelhos e cobaios. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 9, p. 91-94, 1974.
147. TERRY, W. S., PHIFER, B. Caffeine and memory performance on the AVLT. **J. Clin. Psychol.**, V. 42, p. 860, 1986.
148. TOKARNIA, C.H., et al. Intoxicação experimental por *Pseudocalymma elegans* ( Vell . ) Kuhl in em bovinos . **Pesq . Agropec . Bras .**, v.4, p. 195 - 204, 1969 .
149. \_\_\_\_\_, PEIXOTO, V., DOBEREINER, J. Intoxicação experimental por *Pseudocalymma elegans* ( Bignoneaceae ) em caprinos. **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 4, p. 195 - 204, 1993 .
150. TOMAZ, C. Amnésia. *In: GRAEFF, F.G., BRANDÃO, M.L. Neurobiologia das doenças mentais.* São Paulo: Editora Lemos, 1993. Cap.8, p.175-184.

151. TURSKI, W.A. et al. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res.**, v. 321, p. 237-253, 1984.
152. \_\_\_\_\_ et al. Injections of picrotoxin and bicuculine into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, behavioral and morphological analysis. **Neuroscience**, v. 14, 1985.
153. \_\_\_\_\_ et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioral electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Res.**, v. 9, p. 1408-1411, 1983a.
154. \_\_\_\_\_ et al. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. **Experientia**, v.39, p. 1408-1411, 1983b.
155. VALLE, J.R. **Farmacologia teórico-prática**. São Paulo: Lab. de Farmacologia e Bioquímica da E.P.M., 1955. 307p.
156. VALZELLI, L., BAIGUERRA, G., GIRAUD, O. Difference in learning and retention by Albino Swiss mice. Part III. Effect of some brain stimulants. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 8, p. 337-341, 1986.
157. VAN-DIJKEN, H. H. et al. Characterization of stress-induced long-term behavioral changes in rats: Evidence in favor of anxiety. **Physiol. Behav.**, v. 52, p. 945-951, 1992.
158. VAN RASSUM, J. M. Cumulative record of motor activity (a new procedure) and its use for the study of central stimulant drugs. **Experientia**, v.18, p. 93, 1962.

159. VON LUBITZ, D.K.J.E. et al. Reduction of postischemic brain damage and memory deficits following treatment with the selective adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 302, p. 43-48, 1996a.
160. \_\_\_\_\_ et al. Postischemic administration of adenosine amine congener (ADAC): analysis of recovery in gerbils. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 316, p. 171-179, 1996b.
161. \_\_\_\_\_ et al. Effects of chronic administration of adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist and antagonist on spatial learning and memory. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 249, p. 271-280, 1993.
162. WANG, J.H., KO, G.Y.P., KELLY, P.T. Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity. **Journal of Clinical Neurophysiology**. v. 14, p. 264-293, 1997.
163. WARBURTON, D.M. Effects of caffeine on cognition and mood without caffeine abstinence. **Psychopharmacology**, v.119, p. 66-70, 1995.
164. WEINSTOCK, M. The pharmacotherapy of Alzheimer's disease based on the cholinergic hypothesis: an update. **Neurodegeneration**, v. 4, p. 349-356, 1995.
165. WU, T.S., OU, L.F., TENG, C.M. Aristolochic acids, aristolactam alkaloids and amides from *Aristolochia kankauensis*. **Phytochem.**, v. 36, p. 1063-1068, 1994.
166. YONKOV, D.I. Correlations between the effects of CNS stimulants on memory processes and open field behavior of rats: the importance of brain cholinergic activity. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 7, p. 113-118, 1985.

167. YONKOV, D.I., ROUSSINOV, K.S. Influence of eserine on the learning and memory facilitating effect of central stimulants. **Bulg Acta Physiol. Pharmacol.**, v. 9, p. 11-17, 1983.
168. YONKOV, D.I. Possible role of brain dopaminergic systems in the memory effects of central stimulants. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 6, p. 235-239, 1984.
169. ZAR, J.H., **Biostatistical analysis**. Englewood Cliffs, N.J : Prectice-Hall, Inc.,1974. 620 p.
170. ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L.R., AMARAL, D. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to the CA1 field of the hippocampus. **J. Neurosci.**, v. 6, p. 2950-2967, 1986.