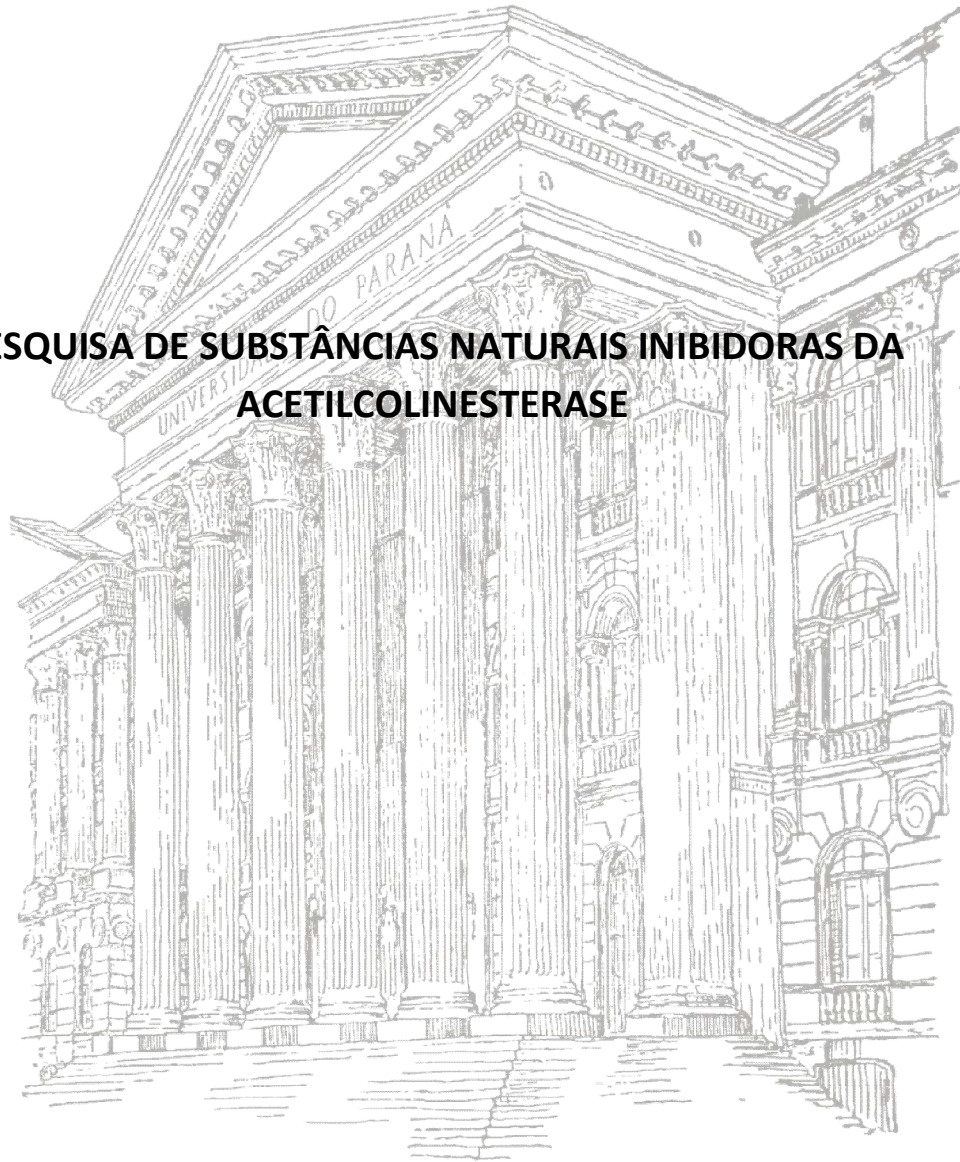


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDIA SEIDL

**PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS INIBIDORAS DA
ACETILCOLINESTERASE**



CURITIBA

2010

CLAUDIA SEIDL

**PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS INIBIDORAS DA
ACETILCOLINESTERASE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Tit. Cid Aimbiré de M. Santos

CURITIBA

2010

Seidl, Cláudia

Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase /
Cláudia Seidl – Curitiba, 2010.

86 f.: il.;30 cm.

Orientador: Cid Aimbiré de Moraes Santos

Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos.

Inclui bibliografia

1. Anticolinesterásicos. 2. AChE. 3. Apocynaceae. 3. *Himatanthus lancifolius*. 4. Uleína. 5. Doença de Alzheimer. 6. Plantas medicinais. I. Santos, Cid Aimbiré de Moraes. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.321

NOTA BIOGRÁFICA

A autora graduou-se em Farmácia Industrial pela Universidade Federal do Paraná em 2007. Durante sua graduação foi bolsista de iniciação científica entre agosto/2006 a julho/2007, no laboratório de Farmacognosia sob orientação do Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos, desenvolvendo o projeto “Pesquisa da atividade anticolinesterásica de plantas medicinais”, cujos resultados foram apresentados no XV EVINCI (Evento de Iniciação Científica da UFPR, 2007). Entre agosto de 2007 a abril de 2009 ocupou o cargo de farmacêutica responsável técnica em diferentes filiais da rede de drogarias Droga Raia S/A. Em março de 2008 ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas na UFPR, área de insumos, medicamentos e correlatos, onde desenvolveu trabalho de pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase. A aluna foi contemplada com uma bolsa nível mestrado através do edital MCT/CNPq nº 70/2008 e o projeto foi contemplado pelo edital MCT/CNPq nº 14/2009 – Universal. Os resultados deste trabalho serão, em parte, publicados em:

- Seidl, C., Correia, B. L., Stinghen, A. E. M e Santos, C. A. M.: “Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Olefine from *Himatanthus lancifolius*”. Zeitschrift für Naturforschung C. Aceito para a publicação em 16 de abril de 2010.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai,
Carlos Távora Seidl
(*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todos os caminhos que me trouxeram até aqui.

Ao Professor Cid Aimbiré de Moraes Santos, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos, por me acolher em seu laboratório e por ter acreditado sempre no meu trabalho e na minha capacidade mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha mãe Silmara, pelo lar, apoio, compreensão, incentivo e palavras de estímulo em todos os momentos da minha vida.

Ao Rodrigo, meu amor, pela relação maravilhosa e por me apoiar em todos os momentos desta jornada, por me incentivar nos estudos e por sempre me inspirar a ir mais longe.

A Professora Almeriane Maria Weffort-Santos pelo apoio essencial para realização deste trabalho, por todas as excelentes sugestões e por sua amizade.

Ao Professor Brás Heleno de Oliveira, pelo auxílio, dedicação e colaboração nos experimentos envolvendo a imobilização enzimática.

A Professora Andréa E.M. Stinghen, pela disponibilização do uso do equipamento leitor de microplacas.

A técnica Maria da Graça Toledo por ter me auxiliado nos experimentos no equipamento CLAE.

A aluna de iniciação científica Beatriz L. Correia, por sempre estar disposta a ajudar e pela dedicação em todos os experimentos em que me auxiliou.

Aos colegas de laboratório Luma, Joélia, Rafaela, Rodrigo, Elise por proporcionarem um ambiente sempre agradável para o trabalho e por todas as risadas.

A D. Maria, por todo auxílio técnico e por sempre acreditar em todos nós alunos estando sempre disposta a ajudar.

Aos amigos de mestrado Karina, Leopoldo, Marianna, Astrid, Fernanda G., Adélia, Marcela, Lorene, Fernanda K., Fernanda S., Stella, Mário e João por terem compartilhado comigo, de alguma forma, de todos os momentos de conquistas, frustrações e cansaço e, por acima de tudo, entenderem esses meus sentimentos.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro através do edital Universal MCT/CNPq nº 14/2009.

EPÍGRAFE

“Para realmente venceres
é preciso coragem,
bons pensamentos e
muita força pessoal’.”

Leocádio José Correia

SUMÁRIO

NOTA BIOGRÁFICA.....	3
DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
EPÍGRAFE	6
SUMÁRIO.....	7
LISTA DE ESQUEMAS.....	9
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	12
RESUMO	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO	16
Doença de Alzheimer.....	16
<i>Principais alterações cerebrais no cérebro com a DA</i>	18
<i>Características neuropatológicas da doença de Alzheimer</i>	21
<i>Tratamento</i>	23
Inibidores de colinesterase	24
Tacrina	25
Donepezila	25
Rivastigmina	25
Galantamina	26
Efeito dos anticolinesterásicos no metabolismo da APP	27
Busca de novos candidatos de origem natural para o tratamento da DA.....	28
<i>Os alcaloides como inibidores da acetilcolinesterase</i>	31
A família Apocynaceae.....	31
A espécie <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson.....	32
OBJETIVOS.....	35
Geral.....	35
Específicos	35
MATERIAL E MÉTODOS	36
Material botânico.....	36
Procedimentos gerais	37
Reagentes e equipamentos.....	37
<i>Tampões</i>	37
<i>Enzimas</i>	37
<i>Substrato</i>	38
<i>Reagentes colorimétricos</i>	38
<i>Placas de cromatografia de camada delgada</i>	38
<i>Leitor de microplacas</i>	39
<i>Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	39

<i>Sistemas de solventes</i>	39
Preparo dos extratos	40
<i>Extratos simples</i>	40
<i>Extratos fluidos e frações</i>	40
<i>Fração rica em alcaloides obtidas de H. lancifolius</i>	42
<i>Isolamento e identificação do alcaloide uleína a partir de H. lancifolius</i>	43
Preparo das placas de CCD.....	43
Ensaio em cromatografia de camada delgada	45
<i>Reagente colorimétrico sal Fast Blue B</i>	45
<i>Reagente colorimétrico de Ellman</i>	46
Ensaio em microplaca.....	47
Imobilização enzimática	48
<i>Síntese da sílica modificada</i>	48
<i>Empacotamento da coluna com a sílica modificada</i>	48
<i>Imobilização da enzima acetilcolinesterase</i>	49
<i>Determinação da quantidade de enzimas imobilizadas ativamente na coluna</i>	49
<i>Determinação da atividade anticolinesterásica com a enzima AChE imobilizada</i>	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
Triagem preliminar dos extratos simples em cromatografia de camada delgada	55
Ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee para os extratos fluídos.....	56
Ensaio em CCD e microplaca das frações líquido-líquido obtidas da espécie <i>R. sellowii</i>	58
Ensaio em CCD e microplaca das frações líquido-líquido obtidas da espécie <i>H. lancifolius</i>	59
Ensaio em CCD da fração rica em alcaloides e uleína de <i>H. lancifolius</i>	61
Determinação da IC ₅₀ do alcaloide uleína isolado de <i>H. lancifolius</i>	64
Imobilização enzimática	67
<i>Síntese da sílica modificada</i>	68
<i>Empacotamento da coluna com a sílica modificada</i>	69
<i>Imobilização da enzima acetilcolinesterase</i>	69
<i>Determinação da quantidade de enzimas imobilizadas ativamente no biorreator</i>	70
<i>Determinação da atividade anticolinesterásica utilizando o biorreator enzimático</i>	72
CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	77
REFERÊNCIAS.....	79

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Fluxograma do preparo do extrato fluido e fracionamento do extrato de <i>Himatanthus lancifolius</i>	41
Esquema 2. Fluxograma do preparo do extrato fluido e fracionamento do extrato de <i>Rauvolfia sellowii</i>	42
Esquema 3. Representação do preparo da cromatoplaça utilizando os extratos simples.....	44
Esquema 4. Sequência de reações para detecção de atividade anticolinesterásica de substâncias naturais pelo método de Ellman.....	52
Esquema 5. Reação de detecção de atividade anticolinesterásica de substâncias naturais pelo método de Marston.....	54
Esquema 6. Reação entre a sílica e a substância modificadora 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS).....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de eventos chaves relacionados com a patologia da DA baseado nas evidências disponíveis.....	20
Figura 2. A hipótese da cascata amiloide.....	23
Figura 3. Possíveis sítios de interação farmacológica entre os anticolinesterásicos (AChEI) e o metabolismo da APP.....	27
Figura 4. Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase das frações obtidas do particionamento do extrato fluido de <i>Rauvolfia sellowii</i> (Müll. Arg.), Apocynaceae avaliadas pelo ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001).....	59
Figura 5. Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase das frações o extrato fluido de <i>Himatanthus lacifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae avaliadas pelo ensaio em microplaca pelo Método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001).....	61

Figura 6. Ensaio em CCD pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) com a fração de alcaloides obtidas a partir da espécie <i>Himatanthus lancifolius</i> (Apocynaceae). (A) Ensaio positivo; (B) ensaio falso-positivo.....	62
Figura 7. Ensaio em CCD pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) com o alcaloide uleína obtidas a partir da espécie <i>Himatanthus lancifolius</i> (Apocynaceae). (A) Ensaio positivo; (B) ensaio falso-positivo.....	63
Figura 8. Ensaio em CCD pelo método de Marston (Marston et. al., 2002) com a fração de alcaloide (A) e com alcaloide uleína (B) obtidas a partir da espécie <i>Himatanthus lancifolius</i> (Apocynaceae).....	63
Figura 9. Inibição da acetilcolinestrase pela uleína em soluções metanólicas de <i>Himatanthus lacifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae, avaliadas pelo ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001).....	65
Figura 10. Curva de inibição da acetilcolinestase obtida para a uleína isolada de de <i>Himatanthus lacifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae.....	65
Figura 11. Gráfico de Michaelis-Menten para a enzima AChE imobilizada. Taxa da reação <i>versus</i> a concentração de acetiltiocolina (ACTI).....	71
Figura 12. Gráfico de Lineweaver e Burk para a enzima AChE imobilizada.....	72
Figura 13. Cromatogramas sobrepostos do substrato ACTI (30 mM). Coluna (250 x4,6 mm I.D.). FM: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M de reagente de Ellman, fluxo 0,5 ml/min, $\lambda=412$ nm e 37 °C.....	73
Figura 14. Cromatogramas sobrepostos do inibidor fisostigmina (0,1 mM). Coluna (250 X 4,6 mm I.D.). FM: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M de reagente de Ellman, fluxo 0,5 ml/min, $\lambda=412$ nm e 37 °C.....	73
Figura 15. Cromatogramas sobrepostos do (A) substrato ACTI (30 mM) e (B) do inibidor fisostigmina (0,1 mM). Coluna (250 x 4,6 mm I.D.). FM: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M de reagente de Ellman, fluxo 0,5 ml/min, $\lambda=412$ nm e 37 °C.....	74
Figura 16. Cromatogramas sobrepostos do substrato ACTI (30 mM) com diferentes fluxos (A) 0,5 ml/min, (B) 1,0 ml/min, (C) 1,5 ml/min e (D) 2,0 ml/min. Coluna (250 x 4,6 mm I.D.). FM:	

tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M reagente de Ellman, $\lambda=412$ nm e 37°C.....75

Figura 17. Cromatogramas sobrepostos de (A) substrato ACTI (30 mM), (B) substrato ACTI (30 mM) e donazepila (9 μ M). Coluna (50 x 4,6 mm I.D.).FM: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M de reagente de Ellman, fluxo 0,1 ml/min, $\lambda=412$ nm e 37 °C (Andrisano et. al., 2001)..... 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Drogas disponíveis no comércio aprovadas para o tratamento da doença de Alzheimer.....23

Tabela 2. Material botânico utilizado para os ensaios anticolinesterásicos.....36

Tabela 3. Espécies medicinais avaliadas pelos métodos de Marston e Rhee em cromatografia de camada delgada (CCD).....55

Tabela 4. Ensaio em microplaca dos extratos fluidos pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001).....57

Tabela 5. Ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) das frações líquido-líquido da espécie *R. sellowii*.....58

Tabela 6. Ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) das frações líquido-líquido da espécie *H. lancifolius*.....60

Tabela 7. Ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) da uleína da espécie *H. lancifolius*.....64

Tabela 8. Resultados do ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) de alguns alcaloides avaliados por Orhan e colaboradores (Orhan et al., 2007) e da uleína da espécie *H. lancifolius*.....66

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DA	Doença de Alzheimer
Tau	Proteína associada a microtúbulo
APP	Proteína precursora amiloide
A β	Peptídeo β -amiloide
CHAT	Colina acetiltransferase
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
BSA	Albumina de soro bovino
ACTI	Iodeto de acetiltiocolina
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCM	Diclorometano
EtOAc	Acetato de etila

GPTMS	3-glicidoxipropil-trimetoxisilano
AU	Unidades de absorvância
df	Fator de diluição
U	Unidades de enzima
ε	Coeficiente de extinção

RESUMO

A doença de Alzheimer é uma doença multifatorial, progressiva e neurodegenerativa caracterizada por alterações nas funções cognitivas de aprendizado e memória, bem como por alterações comportamentais. Os inibidores da enzima acetilcolinesterase constituem o principal tratamento da doença. Espécies vegetais são excelentes fontes de substâncias naturais com potencial anticolinesterásico e os alcaloides, como a galantamina e huperzina A, se destacam como a principal classe de inibidores. O objetivo dessa dissertação de mestrado foi contribuir com a busca de novas substâncias naturais com potencial anticolinesterásico. Os extratos fluidos, frações e substâncias isoladas foram avaliadas utilizando a associação dos ensaios em CCD (método de Rhee) e microplaca (método de Ellman modificado por Rhee) com o reagente de Ellman e o ensaio em CCD com o sal Fast Blue B (método de Marston). Dezenove extratos simples de diferentes espécies foram avaliados pelos ensaios em CCD e somente duas não apresentaram atividade inibitória nas concentrações testadas. As frações DCM, *n*-butanol e aquosa da espécie *Rauvolfia sellowii* foram as frações mais ativas enquanto que para a espécie *Himatanthus lancifolius* foram as frações DCM e EtOAc. Na fração rica em alcaloides da espécie *H. lancifolius* foi possível ainda relacionar a atividade encontrada com a atividade do seu principal alcaloide uleína uma vez que apresentaram o mesmo valor de R_f para as manchas de inibição. A uleína apresentou um valor de IC_{50} de 0,45 μ M, valor este que se encontra dentro do intervalo de valores de IC_{50} encontrado na literatura para a galantamina (0,39 a 1,5 μ M). Além disso, este trabalho apresenta o desenvolvimento e otimização de um ensaio para a determinação da atividade anticolinesterásica utilizando a enzima imobilizada em um suporte de sílica epoxidada dentro de uma coluna cromatográfica acoplada ao equipamento de CLAE.

Palavras chave: anticolinesterásicos, AChE, Apocynaceae, *Himatanthus lancifolius*, uleína, doença de Alzheimer

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a multifactorial, progressive neurodegenerative disorder characterized by changes in cognitive functions like learning and memory, as well as behavioural changes. Acetylcholinesterase inhibitors are the disease primary treatment. Plant species are excellent sources of natural substances with potential anticholinesterase activity and alkaloids, such as galantamine and huperzine A, stand out as the major class of inhibitors. The aim of this dissertation was to contribute with the search for new natural substances with potential anticholinesterase activity. The fluid extracts, fractions and isolated compounds were evaluated using a combination of assays in TLC (Rhee's method) and microplate (Ellman's method modified by Rhee) with Ellman's reagent and the assay in TLC with Fast Blue B salt (Marston's method). Nineteen simple extracts from different species were evaluated using the TLC assays and only two didn't show inhibitory activity at the concentrations tested. The DCM, n-butanol and aqueous fractions from *Rauvolfia sellowii* were the most active fractions while the DCM and EtOAc were the most active for the *Himatanthus lancifolius*. In the alkaloid rich fraction of the *H. lancifolius* species was possible to relate the activity found with the activity of its main alkaloid uleine once they showed the same R_f values for the inhibition spots. Uleine presented an IC_{50} value of 0.45 μ M, within the range of IC_{50} values found in literature for galantamine (0.39 to 1.5 μ M). Furthermore, this work presents the development and optimization of an assay for the determination of the acetylcholinesterase activity using the enzyme ACHE immobilized on a silica-epoxy support in a chromatography column coupled to the HPLC equipment.

Keywords: cholinesterase inhibitors, AChE, Apocynaceae, *Himatanthus lancifolius*, uleine, Alzheimer's disease

INTRODUÇÃO

A população mundial está cada vez mais idosa e doenças relacionadas à idade prevalecem sem cura ou tratamento eficaz tornando-se problemas de saúde pública mundial. Em quase todos os países, a proporção de pessoas acima de 60 anos está crescendo mais rapidamente do que qualquer outro grupo etário, resultado da baixa taxa de fecundidade e aumento da expectativa de vida. Estima-se que o número de pessoas acima de 65 anos atinja os 72 milhões por volta do ano 2030 somente nos Estados Unidos da América (NIA, 2009). No Brasil, segundo a Projeção da População por Sexo e Idade 1980-2050 (IBGE, 2008) a expectativa de vida média do brasileiro alcançará os 78,2 anos para os homens e 84,5 anos para as mulheres em 2050 enquanto que a taxa de fecundidade chegará aos 0,24% no mesmo ano. Espera-se que a população brasileira atinja o chamado “crescimento zero” por volta de 2039, apresentado, a partir daí taxas negativas de crescimento.

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência em pessoas acima de 65 anos afetando cerca de 10% das pessoas acima desta faixa etária e 50% das pessoas acima de 85 anos (Orhan et al., 2006; Racchi et al., 2004; Reichman, 2003; Viegas et al., 2005). É esperado um aumento ainda maior do número de pacientes com a doença com a melhoria da expectativa de vida e conseqüente aumento do número da população idosa. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2001), estima-se que 34 milhões irão apresentar algum sintoma da doença de Alzheimer em 2025 o que a torna um dos problemas de saúde pública mais alarmante nesse século (Reichman, 2003; Viegas et al., 2005).

Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita primeiramente pelo médico patologista alemão Aloïs Alzheimer em 1907. É uma doença mental complexa, multifatorial, heterogênea e irreversível relacionada à idade caracterizada pela perda gradual de memória, alterações no comportamento e na personalidade e também pelo declínio das habilidades intelectuais (Anekonda & Reddy, 2005; Viegas et al., 2005).

Alterações no comportamento como apatia, agitação e psicose são também sintomas clínicos relevantes e, juntamente com as alterações cognitivas, definem a DA clinicamente (Reichman, 2003). A intensidade dos sintomas pode variar de paciente para paciente (Anekonda & Reddy, 2005; Viegas et al., 2005). Pacientes com Alzheimer podem viver 8 a 10 anos antes de apresentarem os primeiros sintomas clínicos podendo a doença durar até 20 anos. As regiões cerebrais associadas com as funções mentais superiores, particularmente o neuro-córtex e hipocampo são as mais afetadas pelas mudanças bioquímicas associadas a DA (Reichman, 2003; Viegas et al., 2005).

Três estágios da doença foram descritos (Pallas & Camins, 2006):

1º Estágio: A DA sempre começa pelo ataque dos neurônios do sistema límbico, particularmente aqueles localizados no hipocampo que correspondem no cérebro pela zona da memória. Entretanto, somente os neurônios colinérgicos são afetados, como se a doença escolhesse somente os neurônios da memória. Neste estágio o hipocampo perde aproximadamente 25% de seu volume. Como os neurônios dessa zona, que são responsáveis pelo elo entre a memória de curto prazo e a memória de longo prazo, estão danificados, as pessoas no estágio prematuro da doença apresentam leves declínios na capacidade de memorização. Além disso, podem apresentar sinais menores de esquecimento relacionados, por exemplo, a nomes ou eventos recentes. Pessoas afetadas também irão apresentar dificuldades menores de comunicação e na aquisição de novas informações. O estágio prematuro dura geralmente dois a quatro anos.

2º Estágio: O estágio intermediário é o mais longo, podendo durar de dois a dez anos. A doença continua a devastar principalmente o sistema límbico e o hipocampo continua a perder neurônios, bem como várias outras zonas do sistema límbico ficam danificadas. As pessoas perdem a memória de curto prazo e conseqüentemente apresentam dificuldade para comunicar-se. Posteriormente, ocorre um declínio nos níveis da acetilcolina de certos neurônios, dentre estes estão aqueles localizados no telencéfalo ventral, os quais em condições normais estão envolvidos no armazenamento de informações da memória de longo prazo. A pessoa, portanto, não consegue relembrar nenhuma informação nova. Durante esse estágio, a

pessoa também apresenta mudanças de personalidade, confusão, raiva, tristeza, falta de orientação e concentração.

3º Estágio: Quando a doença ocupa uma grande parte do sistema límbico, incluindo 90% do hipocampo. Durante o estágio avançado da doença, quase nenhuma recuperação de informação é possível devido ao dano no sistema límbico. Neste ponto, a doença ataca os neurônios colinérgicos em todo o córtex cerebral destruindo assim, as memórias ali armazenadas. A pessoa esquece seu passado, amigos e família. Além disso, perde a memória ocasional e perde totalmente a capacidade de se comunicar e trabalhar. Esta fase dura de um a três anos em média e termina com a morte do paciente.

Principais alterações cerebrais no cérebro com a DA

As três principais alterações que acometem o cérebro de pessoas com a DA são (Kim et al., 2010; Selkoe, 2004a):

1. Placas amiloides

São encontradas nos espaços entre os neurônios e consistem principalmente de depósitos extracelulares de fragmentos insolúveis em placas senis do fragmento de proteína chamada de β -amiloide, de outras proteínas, de remanescentes de neurônios, dendritos e axônios em degeneração, de glia e outros materiais celulares. O peptídeo β -amiloide se deposita em placas que causam destruição de neurônios por criar processos inflamatórios crônicos nas regiões afetadas, interferir com a regulação de cálcio, essencial para a condução dos estímulos nervosos, e aumentar a produção de radicais livres, tóxicos para as células nervosas.

2. Emaranhados neurofibrilares

Encontrados dentro dos neurônios, os emaranhados neurofibrilares são agregados anormais da proteína associada à microtúbulo (τ). Em neurônios saudáveis, os microtúbulos formam estruturas como trilhos de trem que servem para guiar os nutrientes e outras

moléculas do corpo da célula até o fim do axônio. A proteína denominada tau, maior componente destes emaranhados, apresenta sua estrutura quimicamente modificada em pacientes com a DA. A tau que normalmente tem certo número de grupamentos fosfato ligados a ela, liga-se ao microtúbulo estabilizando-o. Em pessoas com a DA, ocorre uma fosforilação anormal da tau que acaba se desligando do microtúbulo, aglutinando-se juntamente com outros fragmentos da tau formando os emaranhados neurofibrilares. Quando isto acontece, os microtúbulos se desintegram e o sistema de transporte neuronal sofre um colapso.

3. Perda das conexões celulares e morte celular

Esta característica da DA resulta provavelmente do acúmulo anormal do peptídeo β -amiloide e dos emaranhados neurofibrilares. Quando ocorre a perda de conexão entre os neurônios, eles não conseguem funcionar normalmente e eventualmente morrem. Como a morte dos neurônios acontece em todo o cérebro, as regiões afetadas começam a diminuir em um processo denominado atrofia cerebral. Na fase final da doença o dano é generalizado e o tecido cerebral se encontra significativamente diminuído.

A figura (1) ilustra os principais eventos relacionados com o desenvolvimento do processo neurodegenerativo durante a evolução da doença de Alzheimer (Selkoe, 2004b).

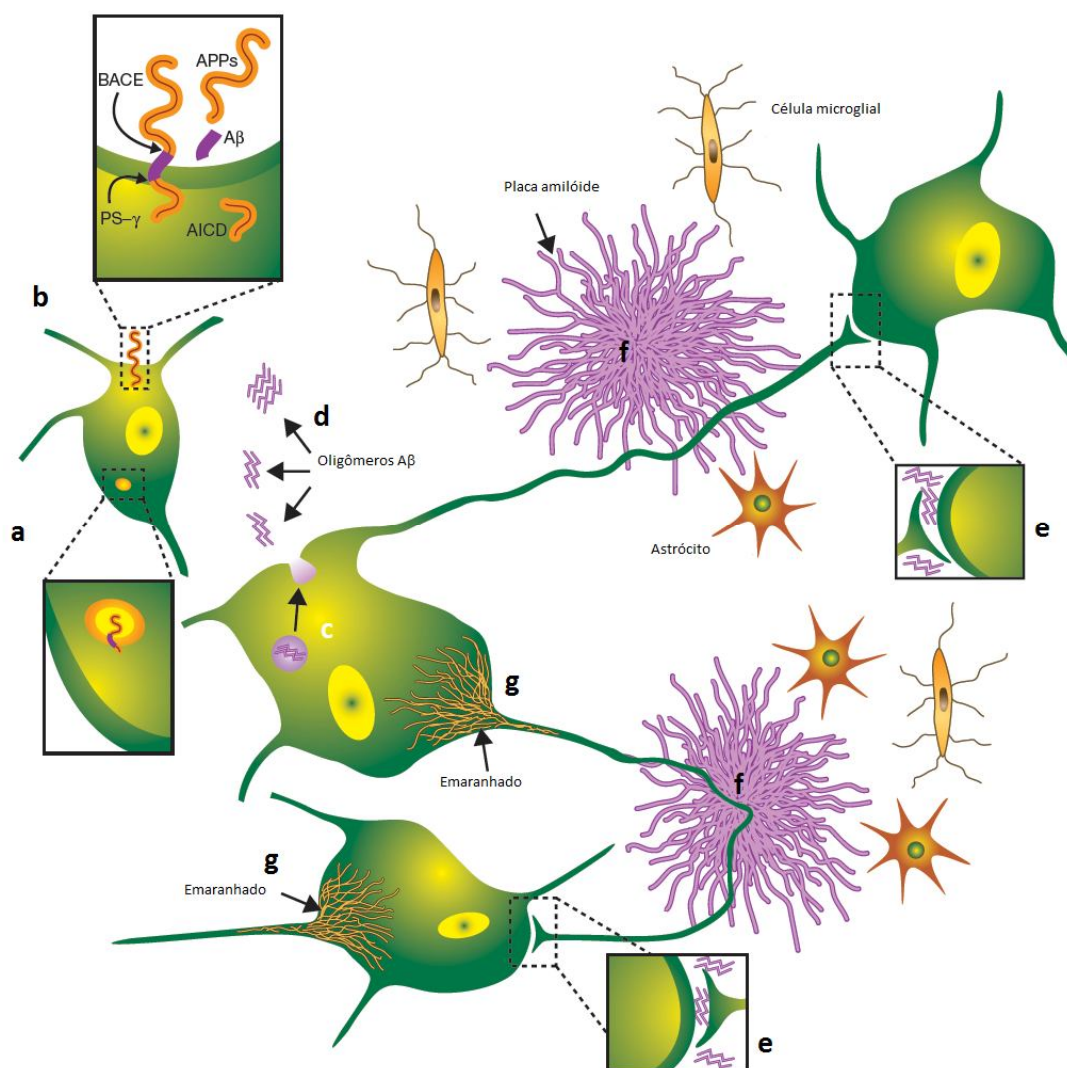


Figura 1. Modelo de eventos chave relacionados com a patologia da DA baseado nas evidências disponíveis. As moléculas de APP (proteína precursora amiloide) presentes no plasma (b) e em vesículas intracelulares como os endossomos (a), são quebradas pela β -secretase (BACE) e pelo complexo presenilina- γ -secretase (PS - γ) para liberar a região de peptídeo β -amiloide (A β). Uma porção de A β pode sofrer oligomerização, inicialmente dentro das vesículas (c), e depois ser liberado no líquido intersticial cerebral (d), da onde os oligômeros solúveis podem se difundir para as fendas sinápticas e interferir com as funções sinápticas de maneira ainda desconhecida (e). Os oligômeros de A β podem ainda se polimerizar em fibras amiloides insolúveis as quais se agregam em placas esféricas, prejudicando estruturalmente e funcionalmente os axônios e dendritos adjacentes (f). A ativação de quinases no citoplasma dos neurônios acompanha este efeito e leva a hiperfosforilação da proteína associada à microtúbulo (tau) e sua subsequente polimerização em filamentos insolúveis que se agregam na forma de emaranhados neurofibrilares (g). Células da microglia ativadas e astrócitos reativos ao redor das placas participam na resposta inflamatória localizada o que pode contribuir para a neurotoxicidade (Selkoe, 2004b).

Características neuropatológicas da doença de Alzheimer

Existem várias alterações neuropatológicas presentes na doença de Alzheimer. Dentre elas podemos destacar o depósito de agregados de proteínas, denominado de placas amiloides, distribuídas em diversas regiões do sistema nervoso central envolvido com o aprendizado e memória. Os depósitos conhecidos como placas amiloides são formados pela deposição progressiva do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) em placas senis extracelulares. No cérebro saudável, esses fragmentos de proteínas são quebrados e eliminados. Entretanto, na DA, esses fragmentos se acumulam formando placas duras e insolúveis. Evidências sugerem que o acúmulo do $A\beta$ é fundamental para a fisiopatologia da doença e parece ser o gatilho para todo processo neurogenerativo. O $A\beta$ é constituído por 40 ou 42 aminoácidos e deriva da quebra proteolítica de uma proteína integral de membrana denominada proteína precursora amiloide (APP). A APP é quebrada enzimaticamente por três diferentes formas de proteases denominadas α -, β - e γ - secretase. As secretases são um grupo heterogêneo de proteases localizadas em várias regiões na célula. A ordem que essas proteases quebram a APP determina se o peptídeo β -amiloide será ou não formado. A quebra da APP pela α -secretase produz fragmentos que atuam como substratos para a γ -secretase, mas o processamento desses fragmentos pela γ -secretase não leva a produção do $A\beta$. Entretanto, a quebra da APP no sítio N-terminal pela β -secretase produz um fragmento transmembrânico de peptídeo que é subsequente convertido pela γ -secretase em $A\beta$. Podem inclusive existir várias enzimas γ -secretase com vários graus de seletividade para a produção de $A\beta_{40}$ ou $A\beta_{42}$. A formação de uma ou de outra forma de $A\beta$ parece sofrer influência de duas outras proteínas associadas à membrana: as presenilinas (PS_1 e PS_2). A forma $A\beta_{42}$ é a forma que está relacionada com o desenvolvimento da doença de Alzheimer (Kim et al., 2010; Selkoe, 2004a).

A caracterização das secretases da APP é importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o controle da formação de aglomerados de peptídeos β -amiloides no cérebro e os efeitos patológicos subsequentes da DA. Drogas que possuem como alvo a atividade da γ -secretase demonstraram prejudicar a produção da $A\beta$. Entretanto, o bloqueio da

atividade da γ -secretase também está associado com uma variedade de efeitos colaterais que limitam o seu uso terapêutico (Kim et al., 2010; Selkoe, 2004a).

A quebra da APP pela α -secretase não resulta na formação do A β e, uma vez quebrada pela α -secretase, a APP não pode mais ser processada para a formação do A β por outra via enzimática. Isto sugere que o processamento da APP pela via α -secretase além de não levar ao desenvolvimento da DA pode ser considerado neuroprotetor. Diversas enzimas apresentam atividade α -secretase, porém, como uma enorme variedade de processos estão envolvidos para a regulação dessas enzimas o desenvolvimento de estratégias terapêuticas utilizando esta enzima envolve estudos mais avançados (Kim et al., 2010; Selkoe, 2004a).

A formação do peptídeo β -amiloide exige que a β -secretase seja a primeira enzima a quebrar a APP. O produto da quebra via β -secretase resultam em fragmentos que são processados pela γ -secretase em A β . Portanto, um aumento na atividade β -secretase resulta em um aumento na produção de A β , o que pode ser responsável para a evolução da DA. O produto da quebra da APP pela β -secretase é um fragmento da APP vinculado a membrana. Esse fragmento, substrato para a γ -secretase, é convertido em duas versões de A β (A β ₄₀ e A β ₄₂). Assim, o processamento da APP pela β -secretase aumenta a quantidade de substrato para a γ -secretase que pode levar a formação de aglomerados insolúveis de A β bem como diminuir a quantidade de substrato disponível para processamento pela α -secretase em produtos não tóxicos. Recentemente, uma enzima beta secretase específica que quebra APP (chamada BACE-1) que apresenta todas as propriedades da β -secretase foi identificada e clonada. Foi postulado então que a BACE-1 é a enzima responsável pelo primeiro passo de um processo que acaba resultando na formação do A β e o desencadeamento de todo processo neurodegenerativo (Figura 2). Por conseguinte, a inibição da BACE-1 é um alvo promissor para a descoberta de novas drogas (Kim et al., 2010; Selkoe, 2004a).

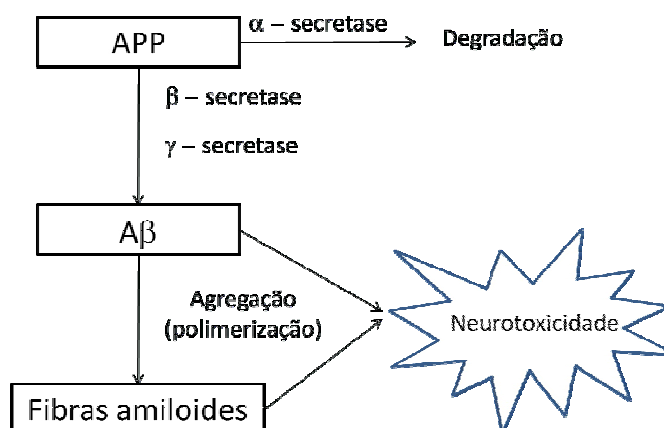


Figura 2. A hipótese da cascata amiloide. Esta hipótese propõe uma série de eventos patogênicos que levam ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA). O acúmulo cerebral do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) é o fator principal na DA e o restante dos eventos resulta de um desequilíbrio entre a produção, acúmulo e liberação do $A\beta$.

Tratamento

Atualmente, existem cinco drogas aprovadas para o tratamento clínico da doença de Alzheimer (Tabela 1) (FDA, 2007). Dentre estas, quatro são classificadas como drogas anticolinesterásicas, ou seja, inibidores da enzima acetilcolinesterase e a outra atua como antagonista do receptor de glutamato aumentando os níveis de acetilcolina na fenda sináptica.

Tabela 1. Drogas disponíveis no comércio aprovadas para o tratamento da doença de Alzheimer (FDA, 2007).

Genérico	Marca	Aprovado para	Efeitos Colaterais	Classe
Donepezila	Aricept®	Todos os estágios	Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos no TGI.	Anticolinesterásico
Galantamina	Reminyl®	Leve a moderada	Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos no TGI.	Anticolinesterásico
Rivastigmina	Exelon®	Leve a moderada	Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos no TGI	Anticolinesterásico
Tacrina	Cognex®	Leve a moderada	Possível dando no fígado, náusea e vômito.	Anticolinesterásico
Memantina*	Ebix®	Moderada a severa	Dor de cabeça, constipação, confusão e tontura.	Antagonista do receptor de glutamato (N-methyl-D-aspartato) NMDA

Inibidores de colinesterase

Os anticolinesterásicos possuem um papel importante no tratamento da DA. Em 1976 foi estabelecida a hipótese colinérgica a qual associa os sintomas cognitivos, funcionais e comportamentais presentes na DA, com a deficiência na neurotransmissão colinérgica ligada a perda dos neurônios colinérgicos (Cummings & Back, 1998). Várias alterações relacionadas com o sistema colinérgico no cérebro com DA são observadas entre elas: perda seletiva e significativa da atividade de CHAT em diferentes partes do cérebro (córtex, hipocampo e amígdalas), degeneração seletiva dos neurônios colinérgicos basais do cérebro, diminuição da atividade da AChE com proporcional ao aumento do número de placas senis bem como uma redução dos níveis de ACh e AChE (Garcia-Sanchez et al., 2003; Gouras, 2001; Kasa et al., 1997). Inúmeras abordagens vêm sendo exploradas para restaurar a função central colinérgica: o uso de agentes liberadores de ACh, a estimulação da captação de acetilcolina, a ativação de receptores colinérgicos (pós-sinápticos M_1 muscarínicos) por agonistas e a diminuição da degradação metabólica de ACh pela inibição da AChE (Kasa et al., 1997). A acetilcolina (ACh), principal neurotransmissor na DA, é reconhecidamente importante para o aprendizado e memória (Kasa, 1997). A deficiência de ACh na DA levou ao estabelecimento da hipótese colinérgica a qual explica que a incapacidade de transmitir impulsos neurológicos entre as sinapses cerebrais é a razão para as disfunções cognitivas e comportamentais. Existem dois tipos de colinesterases nos vários tecidos do corpo, a AChE e a BChE. A AChE hidrolisa a ACh, finalizando o efeito desse neurotransmissor nas sinapses colinérgicas. No cérebro, AChE é mais dominante do que a BChE. Estudos revelaram que um aumento dos níveis de ACh pela inibição da AChE pode melhorar a insuficiência na função cognitiva em estágios prematuros de DA (Mesulam, 2009). Com isso, a intensa investigação para o descobrimento de inibidores de AChE e a resposta positiva do tratamento contribuiu para o surgimento dos anticolinesterásicos no mercado (Orhan et al., 2006).

Tacrina

A tacrina (I), (hidrocloreto de 9-amino-1,2,3,4-tetra-hidro-acridina, THA) (Cognex[®]) foi a primeira droga aprovada pela US Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento dos níveis leve a moderado da DA em 1993. A tacrina é uma aminoacridina ativa e um inibidor reversível de AChE. Possui ação farmacológica adicional em níveis monoamina e canais iônicos e é quase tão potente quanto à fisostigmina, com 50% de inibição da AChE na concentração de 10^{-7} M. Apresenta o mesmo tipo de inibição contra BChE e seu uso foi limitado devido a sua hepatotoxicidade e baixo tempo de meia-vida plasmática (3 - 5 h), exigindo uma posologia de quatro vezes ao dia. Baseado na tacrina desenvolveu-se a segunda geração de inibidores de AChE (compostos pós-fisostigmina e pós-tacrina) como, por exemplo, donepezila, rivastigmina, e galantamina, os quais apresentam melhor perfil terapêutico embora eficácia modesta se comparada com a tacrina (Orhan et al., 2006; Racchi et al., 2004; Reichman, 2003).

Donepezila

O cloridrato de donepezila (II) (Aricept[®]), outra droga com uma atividade anticolinesterásica potente e seletiva, foi aprovada pelo FDA em 1996 e tornou-se o inibidor de AChE mais prescrito. O donepezila é uma piperidina inibidora reversível de AChE com alta seletividade para AChE. Demonstrou ser 1000 vezes mais seletivo para a AChE do que BChE. Seu elevado tempo de meia-vida plasmática (70 horas) exige somente uma dose diária. A droga é geralmente bem tolerada, apresentando alguns efeitos colaterais colinérgicos como náuseas, vômito, constipação, diarreia, tontura e interrupção do sono (Orhan et al., 2006; Racchi et al., 2004; Reichman, 2003).

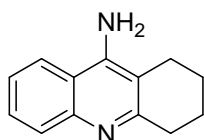
Rivastigmina

O tartarato de rivastigmina (III), [tartarato de (S)-N-etil-3-1-[(dimetil-amino)etil]-N-metil-fenilcarbato hidrogênio, ENA 713] (Exelon[®]) é um derivado de carbamatos inibidor pseudo-irreversível da AChE. A droga foi aprovada pelo FDA para o tratamento sintomático dos níveis leve e moderado da DA em abril de 2000. Seus efeitos colaterais envolvem o sistema gastrointestinal numa relação dose dependente. A droga apresenta tempo de meia-vida inferior

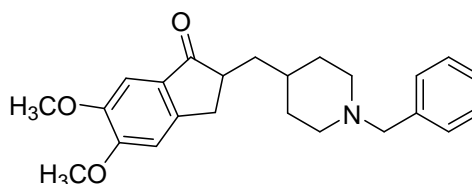
ao donepezila e deve ser administrada duas vezes ao dia (Orhan et al., 2006; Racchi et al., 2004; Reichman, 2003).

Galantamina

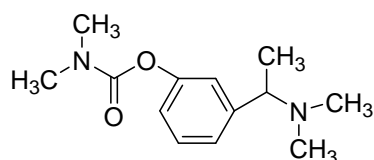
A galantamina (IV) é um alcaloide terciário e uma das mais novas drogas anticolinesterásicas no mercado. Foi primeiramente isolada de espécies de *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae), posteriormente também extraída de outras espécies desta família como *Narcissus* sp. e *Leucojum* sp. Em 1996 foi lançada no mercado com o nome comercial de Nivalin[®] para o tratamento de DA e, posteriormente, re-nomeada para comercialização como Reminyl[®]. Possui um modo particular de ação sendo um inibidor reversível de AChE e um modulador alostérico de receptores nicotínicos de acetilcolina o que pode ter valor adicional no tratamento da DA. Seus parâmetros farmacocinéticos são favoráveis e incluem uma alta biodisponibilidade, cinética de eliminação linear previsível em certas doses e um tempo de meia-vida curto. Entretanto, apresenta alguns efeitos colaterais como náuseas, vômito e anorexia o que limita o seu uso em altas doses (Orhan et al., 2006; Racchi et al., 2004; Reichman, 2003).



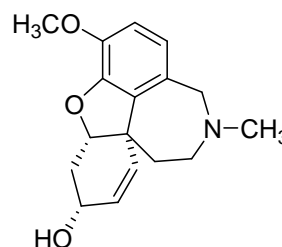
I



II



III



IV

Efeito dos anticolinesterásicos no metabolismo da APP

Vários autores estudaram a relação entre o sistema colinérgico e sua capacidade de modular o metabolismo da APP (Nitsch et al., 1993; Nitsch et al., 1992; Salviotti et al., 1996; Wolf et al., 1995). Na maioria dos experimentos, as conclusões relatam que os efeitos da estimulação colinérgica são diretamente dependentes de interações do tipo ligante-receptor e que tais interações são responsáveis por desencadear uma cascata de transdução de sinais que envolve a ativação de proteínas quinases. Vários segundos mensageiros intracelulares também contribuem para a regulação do metabolismo da APP e possuem interações extremamente complexas (Figura 3) (Racchi et al., 2004).

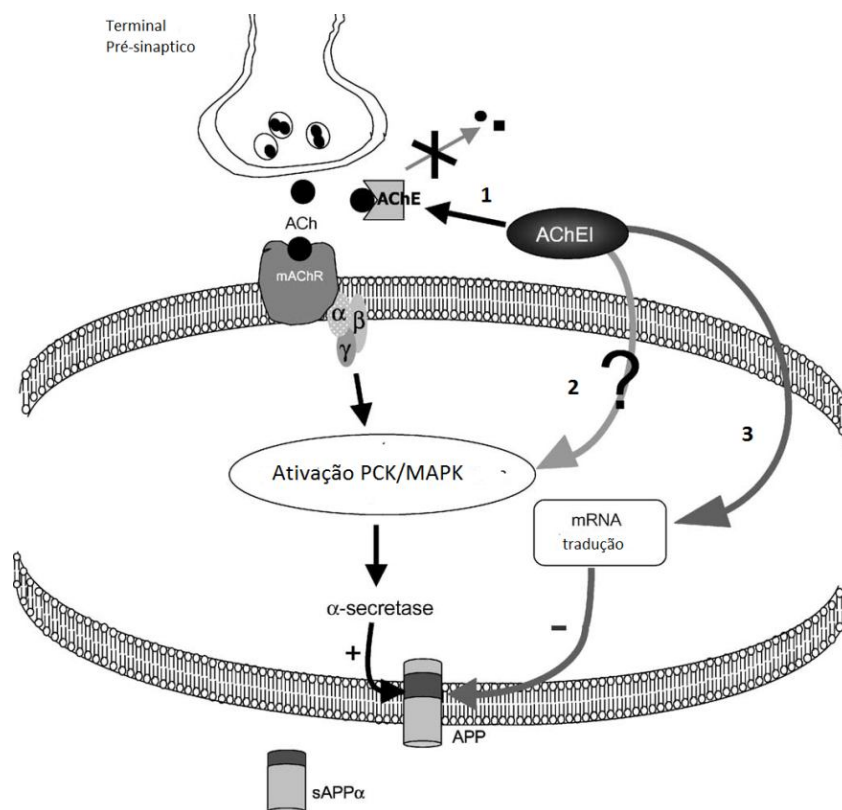


Figura 3. Possíveis sítios de interação farmacológica entre os anticolinesterásicos (AChEI) e o metabolismo da APP. Três possíveis sítios são indicados. Primeiramente, os AChEI podem interagir com o metabolismo da APP através da estimulação colinérgica indireta da via não-amiloidegênica. A estimulação colinérgica da α -secretase e liberação dos fragmentos solúveis da APP (sAPP α) envolve a ativação de vias de transdução de sinais de uma ou ambas as proteínas quinases. Também já foi sugerido que alguns AChEI podem interagir independentemente de receptores colinérgicos com estas vias e ativar ou alguns casos modular a metabolização normal da APP. Além disso, uma terceira possibilidade sugere a interação de algumas moléculas diretamente na síntese da haloproteína da APP e assim interferir no metabolismo da APP e formação de A β (Racchi et al., 2004).

Muitos inibidores da acetilcolinesterase foram testados *in vitro* com relação a sua capacidade de interagir no metabolismo da APP. O primeiro anticolinesterásico estudado quanto a esta capacidade foi a tacrina por Lahiri e colaboradores (1994). Entretanto, os dados iniciais sugeriram inicialmente que os anticolinesterásicos interagiam negativamente no metabolismo da APP. Experimentos posteriores realizados por Mori e colaboradores (1995) indicaram que maioria das outras moléculas eram capazes de aumentar o processamento não amiloidogênico da APP (Mori et al., 1995). Estudos posteriores realizados por Lahiri e colaboradores (1994) demonstraram pela primeira vez em cultivo celular que a tacrina, uma droga já utilizada no tratamento da doença de Alzheimer, afetava o metabolismo da APP (Lahiri, 1994).

Existem evidências substanciais que sugerem um mecanismo de interação entre os anticolinesterásicos e o metabolismo da APP. Infelizmente, os dados provenientes dos diferentes estudos e modelos experimentais nem sempre são consistentes. As diferenças geralmente provem do uso de modelos celulares distintos entre os estudos. Na maioria das vezes somente uma molécula é estudada e são raros os trabalhos que comparam duas ou mais moléculas no mesmo experimento. Outro fator importante é que às vezes, o efeito dos anticolinesterásicos no metabolismo da APP é relacionado com efeitos colinérgicos indiretos enquanto que em outros casos, sugere-se o envolvimento de mecanismos de ativação direta ou indireta de diferentes vias de transdução de sinais (Racchi et al., 2004).

Busca de novos candidatos de origem natural para o tratamento da DA

A diversidade estrutural dos anticolinesterásicos já conhecidos e a possibilidade de explorar modos de ação diferentes estimularam estudos fitoquímicos com diversas espécies de plantas e micro-organismos com base no uso popular ou dados etnobotânicos. A pesquisa de drogas inibidoras de AChE com ação prolongada, com maior potência e com menores riscos de efeitos colaterais, ainda permanece o foco de diversos pesquisadores (Howes & Houghton, 2003; Khalid et al., 2004). Nesse sentido, a biodiversidade brasileira possui um grande arsenal

de substâncias ainda para serem descobertas que podem contribuir para a solução deste problema (Viegas et al., 2004).

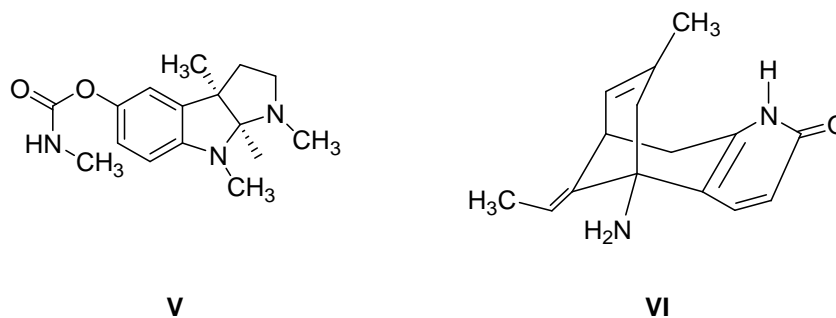
Cerca de 50% das drogas introduzidas no mercado durante os últimos 20 anos são derivadas diretamente ou indiretamente de moléculas pequenas de origem natural (Newman & Cragg, 2007). O potencial terapêutico das plantas medicinais brasileiras também foi demonstrado com sucesso no campo da DA (Barbosa-Filho et al., 2006). A natureza pode ser considerada como uma importante fonte de novos compostos químicos de interesse para o tratamento de várias doenças, inclusive a DA. Além disso, vários compostos promissores já foram sintetizados e testados por suas habilidades de inibir AChE (Di Giovanni et al., 2008).

Recentemente, extratos de plantas medicinais tem sido objeto de diversos estudos visando à busca de soluções que possam dar maior conforto aos pacientes com a DA (Adersen et al., 2006; Anekonda & Reddy, 2005; Facundo & Rios, 2005; Gilania & Ghayuara, 2004; Lopez et al., 2002; Viegas et al., 2004). Desse modo, diversos extratos avaliados mostraram propriedades como pró-colinérgica, antioxidante, antiamilóide e anti-inflamatória indicando o uso promissor de substâncias provenientes de fármacos vegetais no tratamento de pacientes com DA (Anekonda & Reddy, 2005). Extratos de plantas contendo vários constituintes ativos têm sido usados hoje em dia para tratar desordens associadas com o Sistema Nervoso Central, entre essas, espécies de *Salvia*, *Ginkgo*, noz-de-areca e espécies da família Amaryllidaceae (Anekonda & Reddy, 2005; Gilania & Ghayuara, 2004; Lopez et al., 2002; Melanie-Jayne et al., 2003; Viegas et al., 2004).

Vários fatores mostram que extratos de plantas medicinais podem ser veículos carreadores de substâncias importantes e ativas, onde se incluem as substâncias inibidoras da AChE (Anekonda & Reddy, 2005). O primeiro fator é a biodisponibilidade (Manach et al., 2005), especialmente quando se trata de plantas que contém flavonoides ou outras substâncias polifenólicas. Essas substâncias são capazes de atravessar a barreira intestinal e penetrar no sistema circulatório. O segundo fator é a capacidade dos extratos passarem pela barreira hemato-encefálica. Esta barreira expressa um grande número de transportadores, como a glicoproteína-P, onde as substâncias naturais atuam. O terceiro fator está relacionado aos aspectos toxicológicos e de interação droga-droga entre as substâncias naturais. Poucos

estudos clínicos foram realizados com plantas medicinais, ou seus extratos, que possam garantir da sua segurança e eficácia. No entanto, estudos clínicos realizados até então mostraram poucos efeitos adversos. Um estudo realizado por Anekonda e Reedy em 2005 apresenta uma lista de efeitos sinérgicos com combinações diversas de plantas com efeitos positivos e negativos para tratamento de pacientes com DA (Alcala et al., 2005; Roman et al., 2002).

A fisostigmina (**V**), um alcaloide primeiramente isolado da espécie *Physostigma venenosum*, L. (Fabaceae), foi o primeiro inibidor da acetilcolinesterase (Synapton[®]) utilizado na terapêutica. Embora a fisostigmina não seja mais utilizada clinicamente devido ao seu curto tempo de meia vida, sua estrutura química forneceu um modelo para o desenvolvimento da rivastigmina, outra substância com melhor perfil farmacocinético utilizada atualmente na terapia da doença. A galantamina (**IV**), outro alcaloide extraído primeiramente da espécie *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae), e posteriormente de outras espécies da mesma família como *Narcissus* sp. e *Leucojum* sp., é usada popularmente na Bulgária e Turquia para tratamento de condições neurológicas. Esta droga comercializada desde 1996 possui um modo duplo de ação como inibidor seletivo e reversível da enzima acetilcolinesterase e modulador dos receptores nicotínicos cerebrais o que mostrou valor adicional para o tratamento da DA (Marco & Carreiras, 2006). Outros alcaloides da família Amaryllidaceae como a assoanina, epinorgalantamina, oxoassoanina, sanguinina, 11-hidroxi-galantamina também apresentaram atividade anticolinesterásica significativa. A huperzina A (**VI**), um alcaloide isolado da espécie *Huperzia serrata* (Thumb) Lycopodiaceae, uma espécie nativa na China, onde já é utilizada há muitos anos para o tratamento de distúrbios cognitivos, está passando por estudos clínicos para o tratamento da DA e apresentou poucos efeitos colaterais quando comparado com inibidores comerciais (Anekonda & Reddy, 2005; Wang et al., 2009).



Os alcaloides como inibidores da acetilcolinesterase

Os alcaloides continuam sendo foco de pesquisa para novos protótipos de inibidores da acetilcolinesterase sendo o grupo de substâncias mais amplamente estudado. Uma revisão realizada em 2006 por Barbosa-Filho e colaboradores (2006), consultou 175 referências e foram levantadas 309 plantas e 260 substâncias isoladas. Dentre os compostos testados que foram isolados e identificados, 139 pertenciam à classe dos alcaloides. Particularmente as espécies pertencentes às famílias Amaryllidaceae, Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae e Fumariaceae apresentam mais estudos. Como a maioria dos inibidores de acetilcolinesterase apresenta nitrogênio em suas estruturas, a elevada atividade dos extratos parece estar relacionada com o seu rico conteúdo de alcaloides (Barbosa-Filho et al., 2006).

A família Apocynaceae

A família Apocynaceae pode ser considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos com utilidade terapêutica na medicina moderna. Os gêneros mais importantes desta família são *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Vinca*, *Tabernaemontana*, *Mandevilla*, *Hancornia*, *Nerium*, *Strophantus*, *Catharanthus*, *Allamanda*, *Thevetia*, *Wrightia*, *Plumeria*, *Himatanthus* e *Rauvolfia* (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002). Inúmeros estudos já foram realizados para avaliar o potencial anticolinesterásico com espécies desta família. Mroue e Alam (1991) isolaram, identificaram e determinaram o potencial anticolinesterásico do alcaloide bis-indólico crooksina da espécie *Haplophyton crooksii*. O gênero *Tabernaemontana* apresenta o maior

número de estudos realizados com relação ao potencial anticolinesterásico. Andrade e colaboradores (2005) isolaram e avaliaram o potencial anticolinesterásico de quatro alcaloides indólicos da espécie *Tabernaemontana australis* (coronaridina, voacangina, voacangina hidroxindolenina e rupicolina). De acordo com Chattipakorn e colaboradores (2007) o extrato metanólico da espécie *Tabernaemontana divaricata* foi capaz de inibir em 90 % a atividade da enzima AChE em estudos *in vitro*. Vieira e colaboradores (2008) avaliaram o potencial anticolinesterásico de frações e treze alcaloides obtidos de *Tabernaemontana laeta* e *Tabernaemontana hytrix* e confirmaram a atividade para alguns dos alcaloides avaliados. Outras espécies da família Apocynaceae também apresentam estudos com relação ao potencial anticolinesterásico. Ingkaninan e colaboradores (2003) realizaram uma triagem com extratos de plantas utilizados na medicina tradicional tailandesa. Os extratos hidroalcoólico a 50% de folhas de *Apocynum lancifolium*, extrato etanólico de folhas de *Catharanthus roseus* e extrato metanólico de raízes de *Ervatamia coronaria*, também apresentaram algum grau de atividade anticolinesterásica.

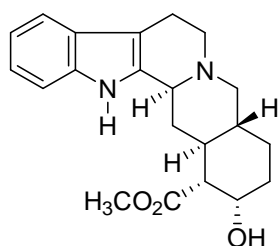
Estudos de triagem também foram realizados com diferentes tipos de alcaloides indólicos. Cardoso e colaboradores (2004) avaliaram o potencial anticolinesterásico e antioxidante de nove alcaloides indólicos glucosilados da espécie *Chimarrhis turbinata* (Rubiaceae) onde os alcaloides turbinatina e desoxicordifolina apresentaram atividade anticolinesterásica moderada. Orhan e colaboradores (2007) avaliaram a atividade anticolinesterásica de vários alcaloides dentre eles os alcaloides do tipo indólico; ioimbina e vincamina.

A espécie *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson

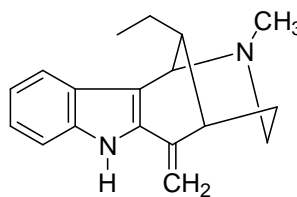
Himatanthus lancifolius é uma espécie nativa do Brasil encontrada principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste. Ocupa preferencialmente áreas de Mata Atlântica e, ocorre também, em vegetações de capoeira, cerrado, catinga e campos rupestres (Spina, 2004). A espécie está descrita na Farmacopéia Brasileira 1ª edição (1929), sob a antiga sinonímia de *Plumeria lancifolia*. A monografia descreve que as partes utilizadas são as cascas do caule,

usadas sob a forma extrato fluido, droga pulverizada e tintura. (Brandão et al., 2006). A espécie, popularmente conhecida como “agoniada”, mas também como “banan a-de-papagaio”, “banana-de-macaco”, “cana-de-macaco”, “janaúba”, “leiteira”, “sucubinha”, “gamelina” e outros, tem suas cascas caulinares tradicionalmente utilizadas como antiasmática, purgativa, para tratamento de doenças de pele, sífilis e distúrbios menstruais, induzindo contrações uterinas (Corrêa, 1926). Outras indicações para as cascas incluem o tratamento de adenite, clorose, problemas digestivos, febre intermitente, histeria e como vermífugo (Brandão et al., 2006). O látex extraído do caule é considerado anti-helmíntico e febrífugo, enquanto que às folhas atribuem-se ainda propriedades galactogogas (Corrêa, 1926).

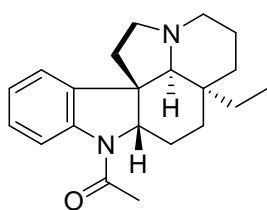
As cascas do caule de *H. lancifolius*, matéria-prima para a produção de alguns fitoterápicos, caracterizam-se pela presença de alcaloides indólicos, já foram isolados ioimbina (VII), uleína (VIII), desmetoxiaspidospermina (IX) e ajmalina (X) (França et al., 2000; Lopes, 2008; Souza, 2007; Baratto, 2010)



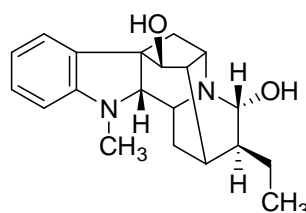
VII



VIII



IX



X

A fração rica em alcaloides indólicos da espécie apresentou um amplo espectro de atividade contra algumas linhagens de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans* e *Acinetobacter baumannii* (Souza et al., 2004). Também foi demonstrado que esta fração, cujo alcaloide indólico majoritário corresponde à uleína, foi capaz de provocar

alterações nas respostas contráteis da musculatura lisa vascular e não-vascular, um evento que pode estar relacionado ao bloqueio da entrada de cálcio na célula, alterações na mobilização de cálcio intracelular ou mesmo distúrbios na capacidade das células em usarem o cálcio para eventos contráteis (Rattmann et al., 2005). Além disso, a fração rica em alcaloides apresentou efeitos gastroprotetores através da ativação de vários mecanismos citoprotetores, incluindo antioxidantes enzimáticos, como o aumento da glutatona sintase (GHS) da mucosa gástrica, e antioxidantes não-enzimáticos, como o NO. A inibição da secreção ácida gástrica também foi verificada pelo bloqueio da bomba de H^+K^+ -ATPase, atividade esta relacionada aos alcaloides indólicos majoritários da fração, uleína e demetoxiaspidospermina (Baggio et al., 2005). Souza e colaboradores (Souza et al., 2007) observaram que a adição de concentrações crescentes de uleína ao cultivo de células endoteliais de aorta de coelhos e de células de melanoma de camundongos provocou um aumento na produção de NO. Recentemente, foi demonstrado que a espécie apresenta capacidade de interferir com a resposta inflamatória atuando no tráfego leucocitário (Nardin et al., 2008) e na regulação do sistema imune (Nardin et al., 2010).

OBJETIVOS

Geral

Investigação de produtos naturais com atividade anticolinesterásica, como extratos, frações e substâncias isoladas de plantas medicinais.

Específicos

- Utilizar e otimizar os ensaios com o reagente de Ellman em cromatografia em camada delgada e microplaca para determinar a atividade anticolinesterásica;
- Utilizar e otimizar o método de Marston em cromatografia em camada delgada para determinação da atividade anticolinesterásica;
- Desenvolver e otimizar ensaio para determinação da atividade anticolinesterásica por imobilização enzimática utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

Parte do material vegetal (Tabela 2) foi coletado em 1998 no local onde foi formada a represa para a Usina Hidrelétrica de Salto Caxias (Silva et al., 2004), tendo recebido permissão e apoio financeiro da Companhia de Energia Elétrica do Paraná (COPEL) para a realização das coletas. Todas as espécies foram classificadas pela Prof^a. Dr^a. Elizabeth de Araujo Schwarz, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná e as excicatas encontram-se depositadas no herbarium daquele Departamento. Este material botânico foi seco entre 30-35 °C, pulverizados e acondicionados em recipientes fechados e mantidos na Herboteca do Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia da UFPR.

Tabela 2. Material botânico utilizado para os ensaios anticolinesterásicos

Espécie	Família	Parte Utilizada	Registro
<i>Pfaffia paniculata</i> (Mart.) Kuntze	Amaranthaceae	Raiz	Comércio
<i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson	Apocynaceae	Casca do caule	HL-9
<i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg.	Apocynaceae	Casca da raiz	42384
<i>Philodendron sellowianum</i> Kunth	Araceae	raiz	42421
<i>Jacaranda micrantha</i> Cham.	Bignoniaceae	casca	42428
<i>Garcinia cambogia</i> Desr.	Clusiaceae	Casca	Comércio
<i>Wilbrandia ebracteata</i> (Cogn.) Cogn.	Curcubitaceae	raiz	42436
<i>Dioscorea glandulosa</i> Kunth	Dioscoreaceae	Folhas	42396
<i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) J.F. Macbr.	Fabaceae	Folhas	42388
<i>Fucus vesiculosus</i> L.	Fucacea	Talo	Comércio
<i>Trichilia catigua</i> A. Juss.	Meliaceae	Casca	Comércio
<i>Passiflora actinia</i> Hook.	Passifloraceae	Folhas	30.831
<i>Zea mays</i> L.	Poaceae	Estigma	Comércio
<i>Arundo donax</i> L.	Poaceae	Raiz	42374
<i>Picrasma crenata</i> Engl. in Engl. & Prantl	Simaroubaceae	Raiz	42368
<i>Anchietea pyrifolia</i> A. St.-Hil	Violaceae	Folhas	42427
<i>Hybanthus bigibbosus</i> (A. St.-Hil.) Hassl.	Violaceae	Raiz	42368
<i>Phoradendron falcifrons</i> (Hook. & Arn.) Eichle	Viscaceae	Folhas	Comércio
<i>Tribulus terrestris</i> L.	Zygophyllaceae	Sementes e frutos	Comércio

As cascas de caules de *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson foram comercialmente adquiridas nos arredores da cidade de São Paulo e foram identificadas de

acordo com a descrição da Farmacopéia Brasileira 1ª edição e comparadas microscopicamente e macroscopicamente com as amostras do Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná onde uma amostra foi depositada sob voucher HL-9. As amostras em pó de *Garcinia cambogia* Desr., *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze., *Fucus vesiculosus* L., *Trichilia catigua* A. Juss., *Zea mays* L. e *Tribulus terrestris* L. foram adquiridas do comercio local e identificadas por microscopia ótica comparando com amostra padrão.

Procedimentos gerais

Reagentes e equipamentos

Tampões

Os seguintes tampões foram utilizados. Tampão A: Tris 50 mM, pH 8,0; tampão B: Tris 50 mM, pH 8,0 contendo 0,1 % de soro albumina bovia (BSA); tampão C: Tris 50 mM, pH 8, contendo 0,1 M NaCl e 0,02 M de MgCl₂.6H₂O; tampão D: 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,6; tampão E: 0,05 M KH₂PO₄ e 1,25 M (NH₄)₂SO₄, pH 5,8; tampão F: Tris 0,05 M, pH 7,8 contendo 150 mg de BSA.

Enzimas

Acetilcolinesterase de peixe elétrico (Tipo VI-S, pó liofilizado, 292 U/mg sólido, 394 U/mg proteína, Sigma, lote: 046K7675) foi utilizada em todos os ensaios em CCD e microplaca utilizando o reagente colorimétrico de Ellman. A enzima liofilizada foi dissolvida em tampão A para preparar uma solução estoque 1000 U/ml e, posteriormente diluída em tampão B para obter uma solução de enzima 0,226 U/ml utilizada no ensaio em microplaca ou em tampão A para obter uma solução de enzima 3 U/ml para ser utilizada no ensaio em CCD.

Acetilcolinesterase de peixe elétrico (Tipo V-S, pó liofilizado, 658 U/mg sólido, 1.210 U/mg de proteína, Sigma, lote: 025K7671) foi utilizada no ensaio em CCD utilizando o método

colorimétrico de Marston. A enzima liofilizada foi dissolvida em tampão F para obter uma solução 6,6 U/ml.

Acetilcolinesterase de eritrócitos humanos (solução aquosa tamponada, 522,73 U/mg proteína, Sigma, lote: 078K4001) foi utilizada no ensaio com a enzima imobilizada utilizando o método colorimétrico de Ellman. A solução da enzima foi dissolvida em tampão E para obter uma solução 1 U/ml.

Substrato

Iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado nos ensaios em CCD, microplaca e no biorreator enzimático para o método com o reagente colorimétrico de Ellman nas concentrações 1 mM em tampão A, 15 mM em água Millipore e em diferentes concentrações em água Millipore respectivamente.

Acetato de alfa-naftila (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado no ensaio em CCD para o método colorimétrico de Marston em solução 2,5 % em etanol.

Reagentes colorimétricos

Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®) ou reagente de Ellman foi utilizado nos ensaios em CCD, microplaca e no biorreator enzimático nas concentrações 1 mM em tampão A, 3 mM em tampão C e $1,26 \times 10^{-4}$ M em 0,1 M de tampão fosfato, pH 7,4 respectivamente.

Sal Fast Blue B (Sigma) foi utilizado nos ensaios em CCD para o método colorimétrico de Marston na concentração 2,5 % em água MilliQ.

Placas de cromatografia de camada delgada

Placas de alumínio para cromatografia de sílica Gel 60 F₂₅₄, 0,2 mm de espessura foram adquiridas da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Leitor de microplacas

Placas de poliestireno com 96 poços (300 µl/TPP®) e equipamento leitor de microplacas Tecan modelo Sunrise foi utilizado para medir a absorvância em 412 nm para a reação enzimática no ensaio em microplaca.

Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os ensaios no biorreator enzimático para o método colorimétrico de Ellman com a enzima imobilizada em coluna cromatográfica foi utilizado uma coluna de aço inoxidável (Agilent®) de 250 mm e 4,6 diâmetro interno empacotada com sílica epoxidada e as análises em CLAE foram realizadas em equipamento Varian, bomba Prostar 230, detector PDA Prostar 335, Autosampler Prostar 410, Programa Workstation Star 6.5. Os solventes utilizados em todos os procedimentos cromatográficos utilizando CLAE foram grau HPLC. A água ultrapura utilizada foi purificada no sistema Millipore, filtro de 0,22 µm.

Sistemas de solventes

Para a realização das análises em cromatografia de camada delgada (CCD) dos extratos simples, frações obtidas da partição líquido-líquido de *H. lancifolius*, *R. sellowii* e do alcaloide uleína foram utilizadas cromatoplasmas de Sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck). As seguintes fases móveis foram utilizadas: EtOAc:n-hexano: (2:8) foi utilizada para os extratos de *P. sellowianum*, *J. micrantha*, *G. cambogia*, *W. ebracteata*, *D. glandulosa*, *B. microstachya*, *T. catigua*, *P. actinia*, *Z. mays*, *A. donax*, *P. crenata*, *A. pyrifolia*, *H. bigibbosus*, *P. falcifrons* e *T. terrestris*, EtOAc:n-hexano:MeOH:dietilamina (4:5:0,8:0,2) para o extratos fluido de *H. lancifolius*, suas frações líquido-líquido, sua fração rica em alcaloides e uleína e DCM:EtOAc:MeOH (8,5:1:0,5) para o extrato fluido de *R. sellowii* e para suas frações líquido-líquido. As cromatoplasmas foram observadas em câmara de luz UV ondas largas (365 nm) e ondas curtas (254 nm) e solução de ácido fosmolíbico 10% em EtOH, reagente de anisaldeído-sulfúrico e reagente de Dragendorff,

preparados segundo (Wagner & Bladt, 1996) foram utilizadas como reveladores quando necessário.

Preparo dos extratos

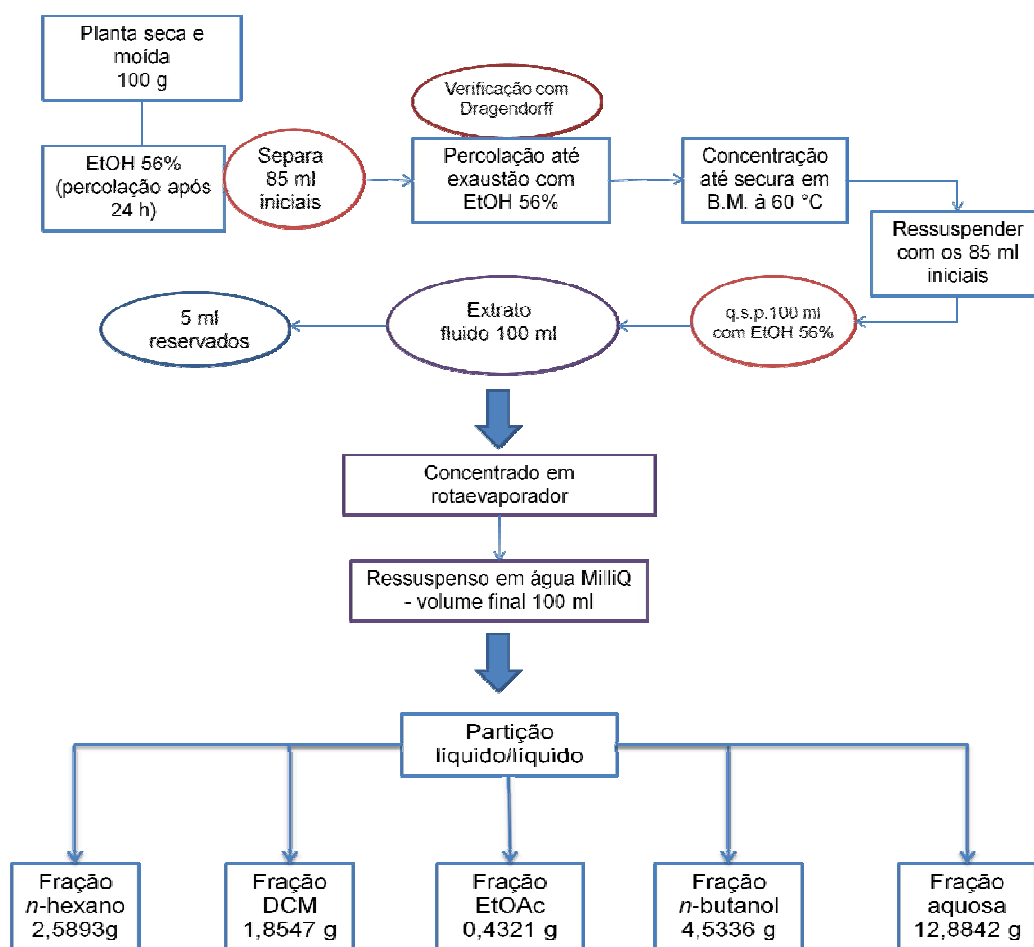
Extratos simples

Foram preparadas soluções mãe na concentração 1 mg/ml em metanol de cada espécie do material botânico coletado em Salto Caxias a partir do extrato simples preparado através da percolação de 2 a 30 kg de cada droga (dependendo da disponibilidade) com EtOH 70% por três dias e o extrato etanólico resultante foi concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida até *secura* (Silva et al., 2004).

Extratos fluidos e frações

As espécies *H. lancifolius*, *R. sellowii*, *P. paniculata* e *T. terrestris* foram selecionadas para preparo de extratos fluidos. O extrato fluido (100 ml) de cada espécie foi preparado segundo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 1ª ed. utilizando o método geral de preparação A e EtOH 56% como líquido extrator.

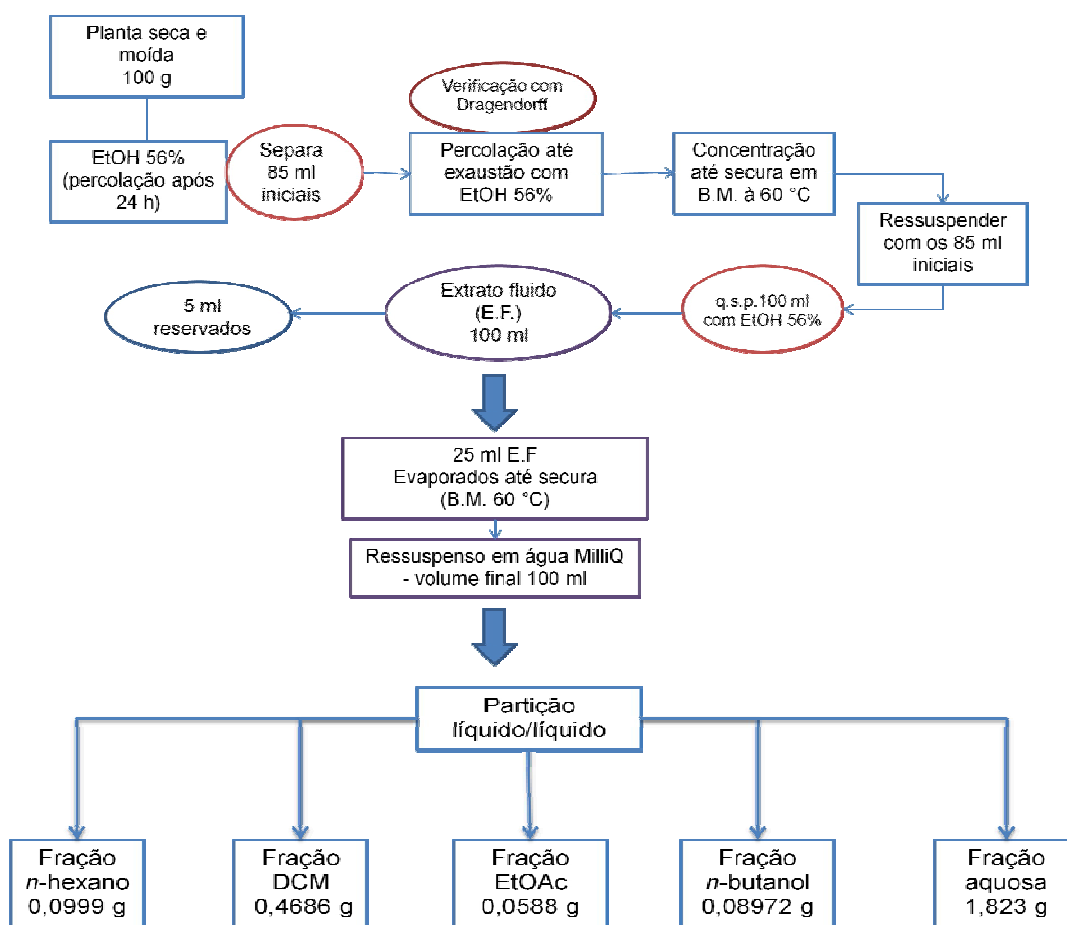
Para a espécie *H. lancifolius*, o restante foi concentrado em rotaevaporador a 60 °C até *secura* e ressuspenso em água (volume final 100 ml) e fracionado utilizando solventes de diversas polaridades (*n*-hexano, DCM, EtOAc e *n*-butanol) em funil de separação (3x30 ml) (Esquema 1). Todas as frações foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a 60 °C, obtendo-se para a espécie *H. lancifolius* rendimento de 2,59 g para a fração *n*-hexano, 1,85 g para a DCM, 0,43 g para a EtOAc, 4,53 g para a *n*-butanol e 12,88 g para a fração aquosa restante.



Esquema 1: Fluxograma do preparo do extrato fluido e fracionamento do extrato de *Himatanthus lancifolius*.

Para a espécie *R. sellowii* uma alíquota de 25 ml do extrato fluido foi concentrada até secura em rotaevaporador a 60 °C, ressuspensão em água MilliQ (volume final 100 ml) e fracionado utilizando solventes de diversas polaridades (*n*-hexano, DCM, EtOAc e *n*-butanol) em funil de separação (3x30 ml) (Esquema 2) obtendo-se rendimento de 0,1 g para a fração *n*-hexano, 0,47 g para a DCM, 0,06 g para a EtOAc, 0,90 g para a *n*-butanol e 1,82 g para a fração aquosa restante.

Uma solução mãe para cada fração de cada espécie foi preparada na concentração de 1 mg/ml em metanol e armazenada em geladeira.



Esquema 2: Fluxograma do preparo do extrato fluido e fracionamento do extrato de *Rauvolfia sellowii*.

Fração rica em alcaloides obtidas de H. lancifolius

A fração rica em de alcaloides foi obtida das cascas secas (5 kg) da planta previamente deslipidificada com *n*-hexano e maceradas durante 48 h em 1% de HCl. A extração foi feita até exaustão (reação negativa com o reagente de Dragendorff). Esse extrato a 1% de HCl foi filtrado, basificado com carbonato de sódio até pH 10, particionado com clorofórmio e então evaporado, resultado em 4,02 g de uma fração básica de alcaloides (pH 10). Isto foi redissolvido em 1% de HCl, filtrado, concentrado e congelado (Baggio et al., 2005).

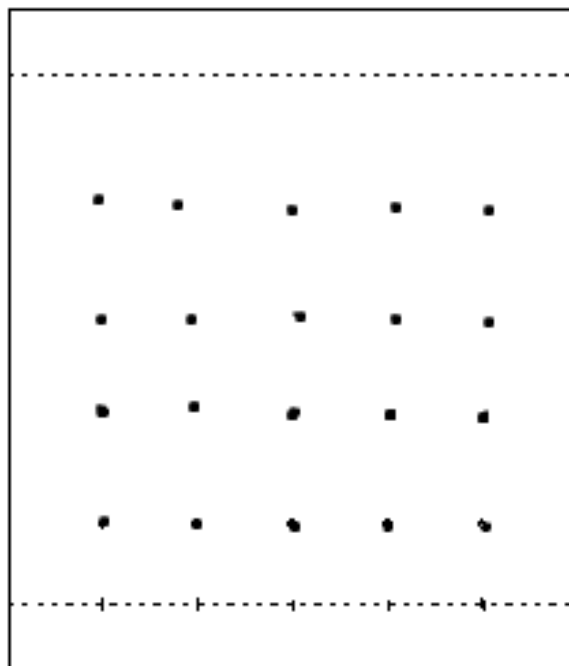
Isolamento e identificação do alcaloide uleína a partir de H. lancifolius

O alcaloide uleína foi isolado por cromatografia em coluna como descrito por Lopes (2008). A comparação com dados espectrais disponíveis em literatura confirmou que a substância isolada era a uleína (França et al., 2000; Gaskell & Joule, 1967; Joule & Djerassi, 1964; Lopes, 2008).

Preparo das placas de CCD

Para os extratos simples

Foram realizados três ensaios com metodologias diferentes e para tanto, foi necessário o preparo de três cromatoplasas iguais, uma para cada ensaio. Uma para o ensaio com o reagente de Ellman (Rhee et al. 2001), outra para o ensaio falso-positivo com o reagente de Ellman (Rhee et al., 2003b) e outra com o reagente de Marston (Marston et al., 2002). O extrato de cada espécie foi aplicado (100 µl) de maneira pontual na mesma concentração (1 mg/ml) sendo distribuídos por toda a cromatoplasa conforme o Esquema 3. Fisostigmina na concentração 1 mg/ml foi aplicada (40 µl) como controle em cada placa.



Esquema 3. Representação do preparo das cromatoplasmas com os extratos fluidos. Cada ponto preto representa a aplicação de um extrato fluido de uma espécie (100 μ l). Foram analisados dezenove espécies e o alcaloide fisostigmina (controle positivo) na mesma concentração (1 mg/ml).

Para os extratos fluidos e frações líquido-líquido

Para cada extrato fluido (*H. lacifolius*, *R. sellowii*, *T. terrestris* e *P. paniculata*) foram preparadas três cromatoplasmas, sendo uma para cada ensaio: uma com o reagente de Ellman (Rhee et al. 2001), outra para o ensaio falso-positivo com o reagente de Ellman (Rhee et al., 2003b) e outra com o reagente de Marston (Marston et al., 2002). Cada extrato fluido foi aplicado na base de suas respectivas cromatoplasmas (100 μ l) na mesma concentração (1 mg/ml) e estas foram eluídas em sistema de solvente adequado. Fisostigmina na concentração 1 mg/ml foi aplicada (40 μ l) como controle em cada placa.

Para as frações obtidas a partir da partição líquido-líquido

A partir dos extratos fluidos das espécies *H. lacifolius* e *R. sellowii* obteve-se 5 frações líquido-líquido: *n*-hexano, DCM, EtOAc, *n*-butanol e aquosa. As cinco frações líquido-líquido de

cada espécie foram aplicadas (100 µl) na mesma concentração (1 mg/ml) em três cromatoplasmas diferentes, sendo uma para cada ensaio: uma com o reagente de Ellman (Rhee et al. 2001), outra para o ensaio falso-positivo com o reagente de Ellman (Rhee et al., 2003b) e outra com o reagente de Marston (Marston et al., 2002). Fisostigmina na concentração 1 mg/ml foi aplicada (40 µl) como controle em cada placa.

Para a fração rica em alcaloides e uleína

Foram aplicados 100 µl da fração rica em alcaloides e uleína obtidas da espécie *H. lancifolius* em concentrações diferentes (2,0 mg/ml; 1,75 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml e 0,25 mg/ml) em três cromatoplasmas diferentes, sendo uma para cada ensaio: uma com o reagente de Ellman (Rhee et al. 2001), outra para o ensaio falso-positivo com o reagente de Ellman (Rhee et al., 2003b) e outra com o reagente de Marston (Marston et al., 2002). Em cada placa de fração rica em alcaloides foram aplicados 100 µl de uleína na concentração 2,0 mg/ml e em cada placa da uleína 100 µl da fração de alcaloides na concentração 2,0 mg/ml foram aplicados. Fisostigmina na concentração 1 mg/ml foi aplicada (100 µl) como controle em cada placa.

Ensaio em cromatografia de camada delgada

Reagente colorimétrico sal Fast Blue B

O ensaio foi realizado conforme descrito por Marston e colaboradores (2002). Resumidamente, as amostras foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD), eluídas em solvente adequado e secas a temperatura ambiente. Cada placa foi borrifada com a solução estoque da enzima e novamente secas. Para incubação da enzima, a placa foi colocada sob um suporte no interior de um recipiente plástico contendo 5 ml de água (a água não entra em contato com a placa, somente mantém úmido o interior do recipiente), fechado e mantido a 37 °C por 20 min. Para detecção da enzima, após esse período, 10 ml de uma solução

do substrato e 40 ml da solução do reagente colorimétrico sal Fast Blue B foram misturadas momentos antes do uso e borrifadas sobre a placa. Após alguns minutos o desenvolvimento de manchas brancas sob o fundo roxo indicou a presença de compostos inibidores da enzima acetilcolinesterase (Marston et al., 2002).

Reagente colorimétrico de Ellman

Teste positivo

O ensaio foi realizado conforme Rhee e colaboradores (2001). Resumidamente, as amostras foram aplicadas em placas de CCD e após o desenvolvimento com o solvente adequado, as placas foram completamente secas. Uma mistura de solução de substrato e do reagente de Ellman foi borrifada sobre a placa. Após completa secagem da placa uma solução de enzima AChE foi borrifada e alguns minutos se passaram até o desenvolvimento de manchas brancas sob um fundo amarelo indicando a presença de compostos inibidores da enzima acetilcolinesterase (Rhee et al., 2001).

Teste falso positivo

Resultados falsos positivos foram eliminados pelo método descrito por Rhee e colaboradores (2003b). As mesmas amostras foram aplicadas em placas de CCD e desenvolvidas com o mesmo sistema de solvente para o teste positivo (preferencialmente na mesma cuba cromatográfica). Após secagem, a placa foi borrifada com uma sequência diferente dos mesmos reagentes do teste positivo. Primeiro foi borrifado a solução de reagente de Ellman e, após secagem, uma solução de substrato (ACTI) e da enzima AChE a 37 °C (Rhee et al., 2003b).

Ensaio em microplaca

Para o ensaio em microplaca foi preparada uma solução mãe (10 mg/ml) em metanol (100%) das espécies *H. lancifolius* e *R. sellowii* e as diluições subseqüentes foram feitas utilizando água MilliQ (5 mg/ml; 1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,1 mg/ml e 0,05 mg/ml).

Em microplaca de 96 poços, foram adicionados em sequência os reagentes a seguir: 25 µl da solução aquosa do substrato, 125 µl de uma solução do reagente de Ellman, 50 µl de tampão B e 25 µl da solução de amostra e a absorvância monitorada a cada 10 s durante 230 s em 412 nm. Após esse período 25 µl de uma solução aquosa de enzima AChE foram adicionados e a absorvância novamente monitorada a cada 10 s durante 230 s em 412 nm. As taxas das reações foram calculadas utilizando software apropriado (GraphPad Prism versão 5.0). Qualquer aumento da absorvância antes da adição da enzima devido à hidrólise espontânea do substrato foi corretamente corrigido subtraindo-se a taxa da reação antes da adição da enzima da taxa obtida após a adição da enzima. As porcentagens de inibição foram calculadas comparando-se as taxas das reações das amostras com a taxa de reação do controle (solvente utilizado para solubilizar cada amostra) através da fórmula: % inibição = $100 - (\text{taxa da reação amostra} / \text{taxa da reação controle} \times 100)$. Cada concentração de cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados obtidos através de média \pm desvio padrão.

Determinação da IC₅₀ do alcaloide uleína isolado de *H. lancifolius*

Solução estoque de uleína na concentração 1 mg/ml foi preparada em metanol. As soluções para o ensaio foram preparadas diluindo a solução estoque em água MilliQ (0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,063 mg/ml; 0,031 mg/ml; 0,016 mg/ml; 0,008 mg/ml). Cada concentração foi analisada em triplicata e a porcentagem de inibição calculada.

A curva de inibição foi obtida plotando a % de inibição versus o logaritmo negativo da concentração do inibidor presentes nas soluções do ensaio. Os parâmetros de regressão linear foram traçados (GraphPad Prism versão 5.0) para cada curva e o valor para IC₅₀ extrapolado.

Imobilização enzimática

Síntese da sílica modificada

Para a síntese da sílica modificada 10 g de sílica (37-44 μm , Chromosorb[®] LC-2, Johns – Manville, USA) foram ativadas a 170 °C durante 15 h a vácuo utilizando o aparelho Chem-Dry[®] (Laboratory Devices INC, USA). Posteriormente a sílica ativada foi transferida para um balão de fundo redondo (100 ml). Uma solução 10% de 3-glicidoxipropil-trimetoxissilano (GPTMS) (Sigma-Aldrich[®]) em tolueno juntamente com 80 ml de tolueno seco foram adicionados ao mesmo balão e este submetido a aquecimento (100 °C sob refluxo durante 12 h). Após o esfriamento, a mistura da reação foi filtrada a vácuo e lavada com 80 ml de tolueno seco. A sílica epoxidada foi seca a vácuo a 80 °C durante 15 h utilizando o aparelho Chem-Dry[®] e armazenada em frasco âmbar em geladeira (Felix & Descorps, 1999b).

Empacotamento da coluna com a sílica modificada

Uma coluna de aço inoxidável Agilent[®] (4,6 x 250 mm) com preenchimento de sílica (5 μm) C-18 foi desempacotada utilizando a bomba do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Água MilliQ foi utilizada como solvente sob fluxo de 5 ml/min. Após a remoção de toda sílica, a coluna foi lavada com acetona durante 10 min sob mesmo fluxo. A coluna foi então totalmente aberta e seu interior lavado com metanol e a secagem realizada a temperatura ambiente.

O empacotamento da coluna com a sílica epoxidada foi realizado a seco. A coluna de aço inoxidável (4,6 X 250 mm) foi acoplada a outra coluna de aço inoxidável de menor comprimento, porém de maior diâmetro somente para auxiliar o empacotamento. A sílica epoxidada (10 g) foi adicionada a coluna de maior diâmetro e o assentamento dentro da coluna menor foi feito inicialmente empregando batidas suaves sobre uma superfície resistente. Após o assentamento inicial das partículas de sílica epoxidada, o conjunto com as duas colunas foi acoplado à bomba do equipamento de CLAE sob fluxo de 10 ml/min de acetona pura. Para

finalizar o empacotamento, a coluna foi lavada utilizando água MilliQ durante 10 min sob fluxo de 5 ml/min.

Imobilização da enzima acetilcolinesterase

A enzima foi imobilizada no suporte de sílica modificada utilizando como base a técnica de derivatização *in situ* descrita por Felix e colaboradores (1999a) e Andrisano e colaboradores (2001) (Andrisano et al., 2001; Felix & Descorps, 1999a).

A temperatura ambiente uma coluna de aço inoxidável (4,6 X 250 mm) empacotada com a sílica previamente epoxidada foi acoplada ao equipamento de CLAE e a solução de enzima AChE foi mantida em recirculação pela coluna sob fluxo de 0,5 ml/min durante 42 h.

A coluna foi então lavada sucessivamente com uma solução de KH_2PO_4 0,05 M (pH 6,0), com 50 ml de uma solução 1 M de glicina em 0,05 M KH_2PO_4 (pH 7,0) e finalmente com uma solução de KH_2PO_4 0,05 M (pH 7,0). Antes do seu armazenamento, a coluna foi lavada com uma solução 0,05 M KH_2PO_4 (pH 7,0) contendo 0,01 % de azida de sódio para sua conservação.

Determinação da quantidade de enzimas imobilizadas ativamente na coluna

A coluna com a enzima imobilizada foi acoplada ao equipamento de CLAE, equilibrada durante 30 min com tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e condicionada com o mesmo tampão contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M do reagente de Ellman (DTNB) (Sigma-Aldrich®, USA).

Alíquotas de 20 μl de cinco concentrações crescentes de ACTI (Sigma-Aldrich, USA) (1,75 a 450 mM) foram injetadas manualmente ao sistema sob fluxo de 0,5 ml/min. Cada concentração foi injetada cinco vezes e frações de 2,5 ml foram coletadas durante 5 min. A absorvância relativa foi determinada espectrofotometricamente em 412 nm no equipamento Shimadzu modelo UV-1800, utilizando como branco uma solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M do reagente de Ellman. A taxa da reação enzimática (V) expressa em ($\Delta A/\text{min}$) foi calculada pela fórmula:

$$V (\Delta A/\text{min}) = \frac{AU \times df}{\text{tempo (min)}}$$

Onde AU (unidades de absorvância) é o valor da absorvância obtida para cada concentração e df é o fator de diluição que foi utilizado para diluir as soluções onde a cor impedia a leitura da absorvância.

O gráfico de Lineweaver e Burk $1/V$ versus $1/[S]$ foi traçado para obtenção dos valores estimados de K_m e V_{max} , onde [S] corresponde a concentração da solução de ACTI injetada (1,75 a 450 mM).

A quantidade de unidades (U) de enzimas imobilizadas ativamente foi calculada pela fórmula:

$$U (\mu\text{mol/l/min}) = \frac{(\Delta A/\text{min})_{max}}{\epsilon} \times 10^6$$

Onde $(\Delta A/\text{min})_{max}$ corresponde a taxa de reação máxima (V_{max}) e ϵ é o valor preconizado para o coeficiente de extinção do íon amarelo ($13.600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) (Ellman et al., 1961)

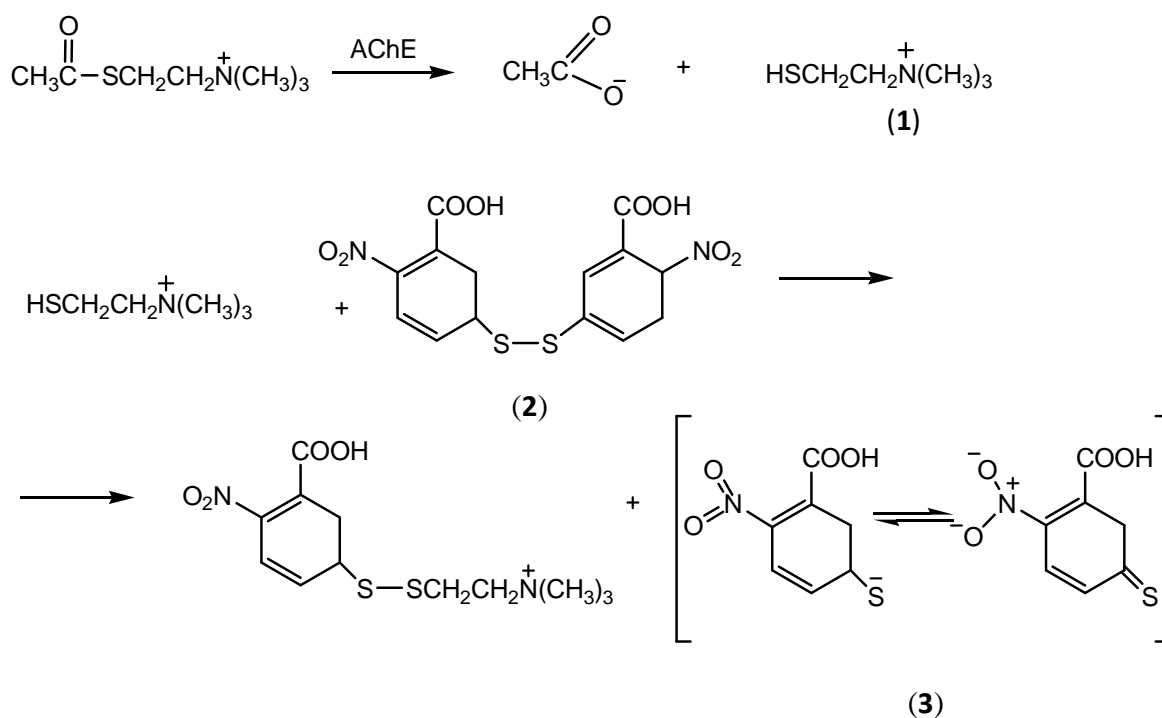
Determinação da atividade anticolinesterásica com a enzima AChE imobilizada

A coluna com a enzima imobilizada foi acoplada entre a bomba e o detector PDA do equipamento de CLAE. A fase móvel consistiu em uma solução do reagente de Ellman. Primeiramente uma solução de concentração conhecida do substrato ACTI foi injetada em triplicata no cromatógrafo e o tempo de eluição do pico correspondente ao produto da reação (Esquema 4) foi determinado. As soluções contendo concentrações crescentes do inibidor conhecido fisostigmina e uma concentração fixa do substrato foram injetadas no sistema cromatográfico e suas áreas relativas do pico integradas. As áreas dos picos foram comparadas entre aquelas obtidas na presença e na ausência do inibidor. A porcentagem de inibição enzimática foi calculada pela seguinte equação: $100 - (A_i/A_0 \times 100)$; onde A_i é a área do pico

calculada na presença do inibidor e A_0 é a área do pico calculada na presença somente do substrato (Andrisano et al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 1961, Ellman e colaboradores descreveram um método fotométrico para a determinação da atividade anticolinesterásica (Ellman et al., 1961). O método se baseia na medição da taxa de produção de tiocolina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase. Isto ocorre pela continuação da reação da tiocolina (1) com reagente de Ellman (2) (DTNB), produzindo o ânion amarelo (3) como mostrado no Esquema (4). A taxa da produção do composto colorido III é realizada em espectrofotômetro UV/VIS em 412 ou 405 nm.



Esquema 4: Sequência de reações para detecção de atividade anticolinesterásica de substâncias naturais pelo método de Ellman.

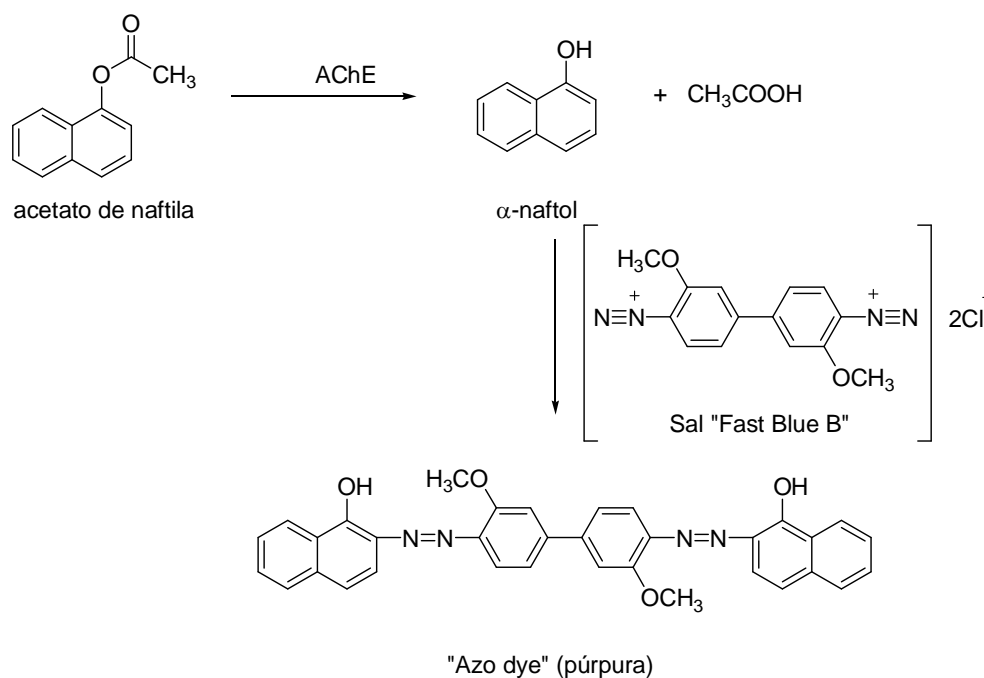
Este método fotométrico exige uma elevada solubilidade em água de todos os reagentes e principalmente das amostras uma vez que os tampões e soluções são em meio aquoso (Ellman et al., 1961). Com o objetivo de superar este problema, Rhee e colaboradores (Rhee et al., 2001) desenvolveram um sistema rápido e eficaz para a detecção de substâncias inibidoras

da acetilcolinesterase em matrizes complexas utilizando a cromatografia em camada delgada. O método teve como base uma metodologia previamente descrita por Kiely e colaboradores (Kiely et al., 1991). Este sistema em CCD também utiliza o reagente de Ellman e seu uso acabou se tornando bastante difundido por sua rapidez, por permitir a análise preliminar de um grande número de amostras, por permitir o uso de extratos não aquosos e, além disso, por permitir um rápido acesso a informações relacionadas à atividade bem como a localização desta atividade em extratos e frações. Favorece também a identificação e correlação de inibidores já consagrados em extratos, ou frações, dispensando o isolamento prévio e demorado. Neste ensaio os inibidores da enzima acetilcolinesterase são detectados pelo aparecimento de manchas brancas de inibição sobre o fundo amarelo da placa cromatográfica. Entretanto, pode apresentar resultados falso-positivos que devem ser descartados pelo ensaio falso-positivo desenvolvido pelo mesmo grupo (Rhee et al., 2003b). Alguns compostos como aminas e aldeídos, podem interagir na segunda etapa da reação (Esquema 3) impedindo a formação do composto colorido e formando as manchas brancas, porém indicando resultado falso. Ambos os ensaios em CCD devem ser realizados concomitantemente de modo a se obter resultados confiáveis.

O mesmo grupo (Rhee et al., 2001) também adaptou para microescala a metodologia espectrofotométrica descrita por Ellman e colaboradores (1961) simplesmente fazendo o monitoramento da produção do composto colorido em placas de 96 poços utilizando um leitor de microplaca. Essa adaptação contribuiu para a maior automação do sistema e possibilitou a análise mais rápida de um número ainda maior de amostras em volumes muito menores. O ensaio em microplaca é mais sensível do que o ensaio em CCD, já que seu método de detecção é muito mais sensível permitindo a identificação de inibidores em concentrações muito menores do que o teste em CCD. (Di Giovanni et al., 2008; Rhee et al., 2001).

Em 2002, Marston, Hosttetmann e colaboradores (2002) desenvolveram outro método utilizando a cromatografia em camada delgada (CCD) para a triagem da atividade anticolinesterásica de extratos de plantas. Este ensaio se baseia em uma reação diferente onde o reagente acetato de naftila é o substrato que sofre quebra pela acetilcolinesterase formando o 1-naftol, o qual continua a reagir com o reagente colorimétrico sal Fast Blue B para formar um

sal de diazônio de coloração violeta (Esquema 5). Os inibidores são diretamente detectados na cromatoplaça pela formação de manchas brancas sobre o fundo violeta da cromatoplaça (Marston et al., 2002).



Esquema 5: Reação de detecção de atividade anticolinesterásica de substâncias naturais pelo método de Marston e Hosttetamenn. (Marston et al., 2002)

Esse método em CCD foi desenvolvido quase que concomitantemente ao método de Rhee e colaboradores (2001), porém o reagente colorimétrico e substrato são diferentes. O método de Marston ainda possui a vantagem de não apresentar a necessidade de realização de ensaios falso-positivo, bem como permite uma melhor visualização dos resultados pelo melhor contraste entre manchas de inibição brancas sob o fundo violeta da cromatoplaça ao invés do fundo amarelo respectivamente.

Nos últimos anos, vários métodos para a determinação da atividade anticolinesterásica foram descritos. Além dos métodos colorimétricos que utilizam o reagente de Ellman (Ellman et al., 1961) ou o reagente sal Fast Blue B (Marston et al., 2002) podemos citar também ensaios fluorimétricos utilizando substratos fluorogênicos (Rhee et al., 2003a), detecção potenciométrica ou eletroquímica (Kaneda et al., 1985). Entretanto, a maioria dos estudos

realizados para determinar a atividade anticolinesterásica de extratos vegetais, frações e substâncias isoladas utiliza a combinação das duas técnicas baseadas do método colorimétrico de Ellman (Gilania & Ghayura, 2004; Hillhouse et al., 2004; Howes & Houghton, 2003; Ingkaninan et al., 2003; Khalid et al., 2004; Lopez et al., 2002; Melanie-Jayne et al., 2003; Oh et al., 2004; Orhan et al., 2004; Salah & Jager, 2005; Siqueira et al., 2003).

Triagem preliminar dos extratos simples em cromatografia de camada delgada

Inicialmente foi realizada uma triagem preliminar de diferentes espécies medicinais na forma de extratos simples (1 mg/ml) utilizando o ensaio em CCD pelos métodos de Rhee e colaboradores (2001) e Marston e colaboradores (2002) (Marston et al., 2002; Rhee et al., 2001).

Tabela 3. Espécies medicinais avaliadas pelos métodos de Marston e Rhee em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (Marston et al., 2002; Rhee et al., 2001).

Espécie	Família	Ensaio	
		Marston	Ellman
		CCD	CCD
<i>Pfaffia paniculata</i> (Mart.) Kuntze	Amaranthaceae	+++	+++
<i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson	Apocynaceae	+++	+++
<i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg.	Apocynaceae	+++	+++
<i>Tribulus terrestris</i> L.	Zygophyllaceae	+++	+++
<i>Philodendron sellowianum</i> Kunth	Araceae	+	+
<i>Jacaranda micrantha</i> Cham.	Bignoniaceae	++	++
<i>Garcinia cambogia</i> Desr.	Clusiaceae	---	---
<i>Wilbrandia ebracteata</i> (Cogn.) Cogn.	Curcubitaceae	+	+
<i>Dioscorea glandulosa</i> Kunth	Dioscoreaceae	+	+
<i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) J.F. Macbr.	Fabaceae	+	+
<i>Trichilia catigua</i> A. Juss.	Meliaceae	+++	+++
<i>Fucus vesiculosus</i> L.	Fucaceae	++	++
<i>Passiflora actinia</i> Hook.	Passifloraceae	---	---
<i>Zea mays</i> L.	Poaceae	---	---
<i>Arundo donax</i> L.	Poaceae	++	++
<i>Picrasma crenata</i> Engl. in Engl. & Prantl	Simaroubaceae	+	+
<i>Anchietea pyrifolia</i> A. St.-Hil	Violaceae	++	++
<i>Hybanthus bigibbosus</i> (A. St.-Hil.) Hassl.	Violaceae	++	++
<i>Phoradendron falcifrons</i> (Hook. & Arn.) Eichler	Viscaceae	+++	+++

Todas as espécies foram avaliadas na mesma concentração (10 mg/ml). Sinal (+++), forte mancha branca de inibição; (++) , mancha branca de inibição mediana; (+), sutil mancha branca de inibição; (---), não detecção de mancha de inibição.

Somente para os extratos de *P. actinia*, *Z. mays* e *G. cambogia* não foi possível a visualização das manchas de inibição na concentração testada. Os outros extratos apresentaram manchas brancas de inibição de intensidade variando de sutil a forte.

Para a realização do ensaio em CCD por ambos os métodos, um grande volume de solução de cada enzima é gasto e, além da solução da enzima utilizada não poder ser reutilizada, possui ainda um curto tempo de armazenamento devido ao seu elevado poder de degradação. Portanto, a análise simultânea do maior número de amostras é recomendada. Com os dois ensaios foi possível analisar simultaneamente dezenove extratos simples de espécies medicinais diferentes obtendo-se resultados em um intervalo de curto de tempo (30 min) o que é excelente para o início do planejamento de ensaios mais sensíveis utilizando outros métodos. A detecção para ambos os métodos é visual e pode ser prejudicada quando os reagentes não estiverem completamente solubilizados ou quando o pH das soluções não estiver correto. Quando todas as soluções são preparadas de forma adequada, o desenvolvimento da coloração violeta ou amarela (Marston et al., 2002; Rhee et al., 2001) é intensa e a detecção das manchas indicando inibição é realizada com facilidade. A escolha do sistema de solventes também é um fator que influencia muito na correta detecção e visualização dos resultados, uma vez que interfere diretamente na separação dos constituintes dos extratos na cromatoplaca.

Ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee para os extratos fluídos

A partir dos resultados de triagem pelos ensaios em CCD, as espécies *H. lacifolius*, *R. sellowii*, *P. paniculata* e *T. terrestris* foram selecionadas para a elaboração de extratos fluidos e avaliados pelo método de Ellman modificado por Rhee em microplaca (Rhee et al., 2001). Os resultados estão apresentados na Tabela (4).

O preparo de extratos na forma de extratos fluidos foi a forma escolhida para se obter um extrato de concentração conhecida, o que contribui para o preparo correto de soluções em diferentes concentrações levando a resultados com maior confiabilidade e reprodutibilidade. Uma das maiores dificuldades enfrentadas para a execução do ensaio em microplaca com os

extratos fluidos foi a necessidade da solubilidade das amostras em água ou metanol. Os extratos fluidos não eram totalmente solúveis em ambos os solventes, o que era observado pelo leve turvamento das soluções. Portanto, a partir da solução mãe de cada extrato (1 g/ml) foram feitas várias diluições utilizando concentrações decrescentes de DMSO (dimetilsulfóxido) até que fosse possível a total solubilização em água. Todas as soluções utilizadas no ensaio eram aquosas.

Tabela 4. Ensaio em microplaca dos extratos fluidos pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001).

Espécie	% de inibição ± DP					
	10 mg/ml	5 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,1 mg/ml	0,05 mg/ml
<i>Himatanthus lacifolius</i>	---	---	---	50,71±8,18	37,43±12,4	12,23±9,28
<i>Rauwolfia sellowii</i>	52,05±2,2	40,11±6,53	---	---	---	---
<i>Tribulus terrestris</i>	86,30±1,84	75,21±10,73	51,59±21,82	---	---	---
<i>Pfaffia paniculata</i>	---	---	---	85,45±4,84	52,49±10,46	---

Resultados são as médias (%) ($p < 0,001$, $n=3$) ± D.P. obtidas para os extratos fluidos das espécies *Himatanthus lacifolius* (Mull. Arg.) (Apocynaceae), *Rauwolfia sellowii* (Mull. Arg.) (Apocynaceae), *Pfaffia paniculata* (Martz.) Kuntze (Amaranthaceae) e *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) e suas diluições. Os resultados (---) não foram reprodutíveis.

Como pode ser observado na Tabela 4, a espécie *P. paniculata* apresentou a maior porcentagem de atividade anticolinesterásica dentre todos os extratos. Na concentração 0,5 mg/ml esta espécie apresentou a maior porcentagem de atividade anticolinesterásica (85,45±4,84%) enquanto que a espécie *H. lancifolius* apresentou na mesma concentração, somente (50,71±8,18%). As espécies *T. terrestris* e *R. sellowii* apresentaram a maior porcentagem de atividade anticolinesterásica na concentração 10 mg/ml (51,59±21,82%) e (52,05±2,2%) respectivamente.

Geralmente extratos vegetais que apresentam porcentagens de inibição maiores do que 50% têm seu potencial anticolinesterásico descrito como alto e porcentagens de inibição entre 15 a 50% são descritos como de atividade baixa a moderada. Entretanto, atividades até 15% podem ser considerados resultados falso-positivos (Adersen et al., 2006; Ingkaninan et al., 2003; Khalid et al., 2004; Orhan et al., 2004, Trevisan et al., 2003). Um estudo recente com plantas brasileiras com o ensaio em microplaca e em CCD utilizando o reagente de Ellman (Rhee et al., 2001) estudou 58 extratos de trinta espécies de diversos gêneros vegetais dos quais os

autores consideraram os resultados de inibição maior ou igual a 50 % como critério de seleção para fracionamento (Trevisan et al., 2003). Apesar de todas as espécies da Tabela 4 apresentarem resultados acima do critério de seleção, somente as espécies *H. lancifolius* e *R. sellowii* foram selecionadas para fracionamento. Entretanto, não foi descartado o estudo com as frações das outras duas espécies o que está sendo realizado em projeto paralelo a esta dissertação.

Ensaio em CCD e microplaca das frações líquido-líquido obtidas da espécie *R. sellowii*

A partir 25 ml do extrato fluído da espécie *R. sellowii* foram obtidas frações líquido-líquido utilizando uma série de solventes, de polaridade crescente, obtendo-se um rendimento de 0,10 g (2,98% p/p) para a fração *n*-hexano, 0,47 g (14,0% p/p) para a DCM, 0,060 g (1,76% p/p) para a EtOAc, 0,90 g (26,80% p/p) para a *n*-butanol e 1,82 g (54,45% p/p) para a fração aquosa restante.

Utilizando o ensaio em CCD com o reagente de Ellman (Rhee et al., 2001) e com o sal Fast Blue B (Marston et al., 2002) com cada fração na concentração 1 mg/ml foi possível detectar o desenvolvimento de algumas manchas de inibição em todas as frações indicando que todas possuíam algum grau de atividade anticolinesterásica. O ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) confirmou estes resultados uma vez que todas as frações apresentaram valores elevados de porcentagem de inibição (Tabela 5). A atividade observada pode ser atribuída possivelmente a alcaloides ou compostos nitrogenados que foram evidenciados pelo corante Dragendorff em todas as frações.

Tabela 5. Ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) das frações líquido-líquido da espécie *R. sellowii*.

Frações do extrato fluído de <i>R. sellowii</i>	% inibição AChE	±D.P.(%)
<i>n</i> -hexano	61,56	2,25
DCM	56,36	3,71
EtOAc	46,77	7,44
<i>n</i> -butanol	76,28	4,88
água	84,90	0,49

Resultados são a média(%) ($p < 0,001$, $n=3$)±D.P. Frações líquido-líquido obtidas de *Rauvolfia sellowii* (1 g/ml).

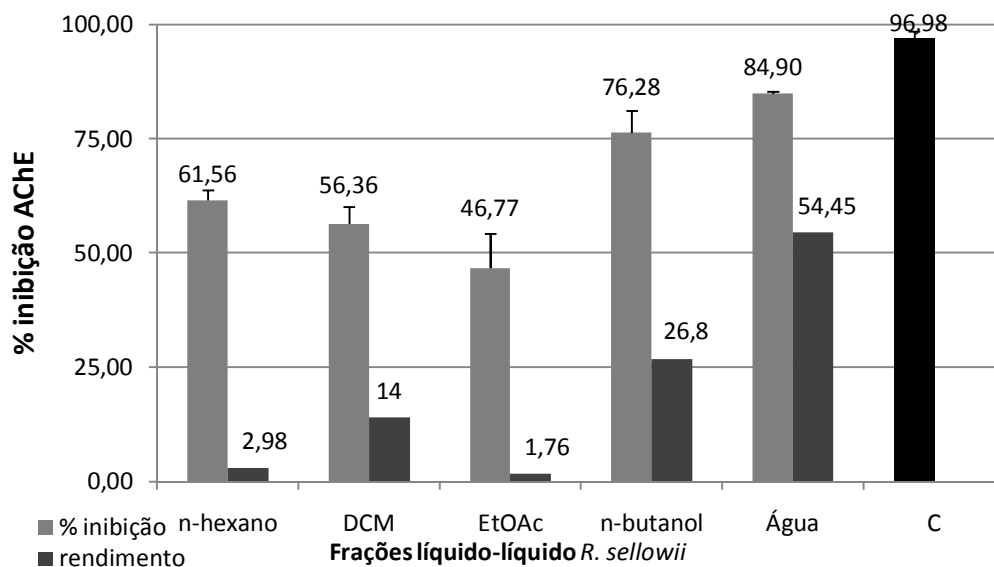


Figura (4): Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase das frações obtidas do particionamento do extrato fluido de *Rauvolfia sellowii* (Müll. Arg.), Apocynaceae avaliadas pelo ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001). Resultados são a média (%) ($p < 0,001$, $n=3$) \pm D.P. Frações líquido-líquido obtidas de *Rauvolfia sellowii* (1 mg/ml); C - controle fisostigmina (1 mg/ml).

A espécie *R. sellowii*, popularmente conhecida como “jasmim-grado”, é uma árvore rara que pode atingir até 15 m de altura podendo ser encontrada em matas do Sudeste brasileiro. Algumas espécies de *Rauvolfia* são fontes de alcaloides indólicos bioativo, dentre eles a reserpina, substância incluída na lista de drogas essenciais classificadas como antihipertensivas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002). As raízes de *R. sellowii* são usadas etnofarmacologicamente como antihipertensivo e diversos alcaloides indólicos já foram isolados e identificados das cascas de suas raízes como: reserpina, ajmalina, ajmalinina, serpentina e aricina (Batista et al., 1996; Djerassi et al., 1954; Hochstein, 1955; Pakrashi et al., 1955). Entretanto, é a primeira vez que a atividade anticolinesterásica é descrita para esta espécie.

Ensaio em CCD e microplaca das frações líquido-líquido obtidas da espécie *H. lancifolius*

Da mesma forma que foi feito com a espécie *R. sellowii*, 100 ml do extratos fluídos da espécie *H. lancifolius* foram também particionados líquido-líquido utilizando uma série de solventes de polaridade crescente e obtendo-se frações com rendimento de 2,59 g (11,61%

p/p) para a fração *n*-hexano, 1,85 g (8,32% p/p) para a DCM, 0,43 g (1,94% p/p) para a EtOAc, 4,53 g (20,36% p/p) para a *n*-butanol e 12,88 g (57,79% p/p) para a fração aquosa restante.

Utilizando o ensaio em CCD com o reagente de Ellman (Rhee et al., 2001) e com o sal Fast Blue B (Marston et al., 2002) com cada fração na concentração 1 mg/ml foi possível detectar o desenvolvimento de algumas manchas de inibição nas frações DCM, EtOAc e *n*-butanol indicando que estas possuíam maior grau de atividade anticolinesterásica. Entretanto, as frações DCM e EtOAc apresentaram as manchas brancas de maior intensidade e assim pode ser confirmada a importante relação entre o conteúdo de alcaloides com a atividade anticolinesterásica pela maior reatividade destas frações frente ao Reagente de Dragendorff. O ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) confirmou estes resultados, uma vez que as mesmas frações apresentaram valores maiores e mais relevantes de porcentagem de inibição (Tabela 6).

Tabela 6. Ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) das frações líquido-líquido da espécie *H. lancifolius*

Frações do extrato fluido de <i>H. lancifolius</i>	% inibição AChE	± D.P.(%)
<i>n</i>-hexano	4,06	5,16
DCM	54,73	0,57
EtOAc	74,20	2,28
<i>n</i>-butanol	34,26	3,48
água	9,80	2,45

Resultados são a média (%) ($p < 0,001$, $n=3$) \pm D.P. Frações líquido-líquido obtidas de *Himatanthus lancifolius* (1 g/ml).

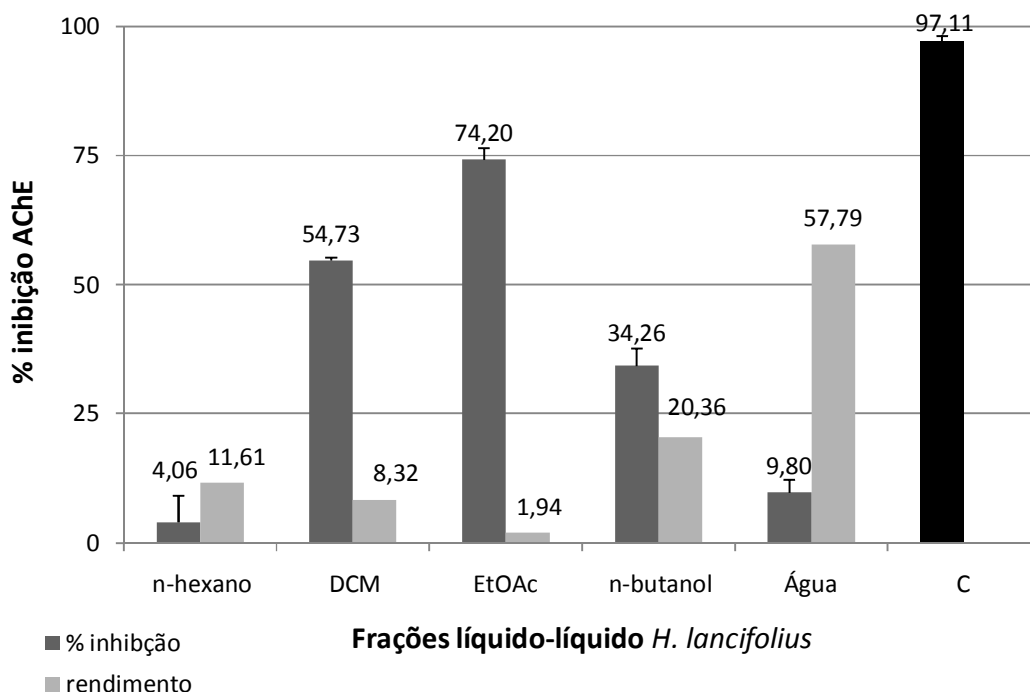
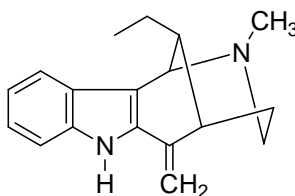


Figura (5): Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase das frações o extrato fluido de *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae avaliadas pelo ensaio em microplaca pelo Método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001). Resultados são a média (%) ($p < 0,001$, $n = 3$) \pm D.P. Frações líquido-líquido obtidas de *Himatanthus lancifolius* (1 mg/ml); C - controle fisostigmina (1 mg/ml).

Ensaio em CCD da fração rica em alcaloides e uleína de *H. lancifolius*

Utilizando o ensaio em CCD com o reagente de Ellman (Rhee et al., 2001) (Figuras 4 e 5) e com o sal Fast Blue B (Marston et al., 2002) (Figura 6) a fração rica em alcaloides de *H. lancifolius* e seu principal alcalóide, uleína (**VIII**), nas concentrações 2 mg/ml, 1,75 mg/ml, 1,26 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml and 0,25 mg/ml foram testadas quanto a sua atividade anticolinesterásica.



VIII

Todas as concentrações apresentaram intensas manchas brancas demonstrando inibição da enzima. Foi observada uma relação dose-dependente diretamente proporcional entre a atividade e a intensidade das manchas brancas de inibição tanto com a fração rica em alcaloides bem como com a uleína. Na cromatoplaça com as diferentes concentrações da fração rica em alcaloides também foi aplicada uma alíquota (100 μ l) de uma solução de uleína (2 mg/ml) e na cromatoplaça com as diferentes concentrações de uleína foi aplicada uma alíquota (100 μ l) de uma solução da fração rica em alcaloides (2 mg/ml). Com isso, foi possível detectar que a uleína é a maior responsável pela capacidade de inibição da fração rica em alcaloides pelo aparecimento da mancha de inibição de mesmo R_f .

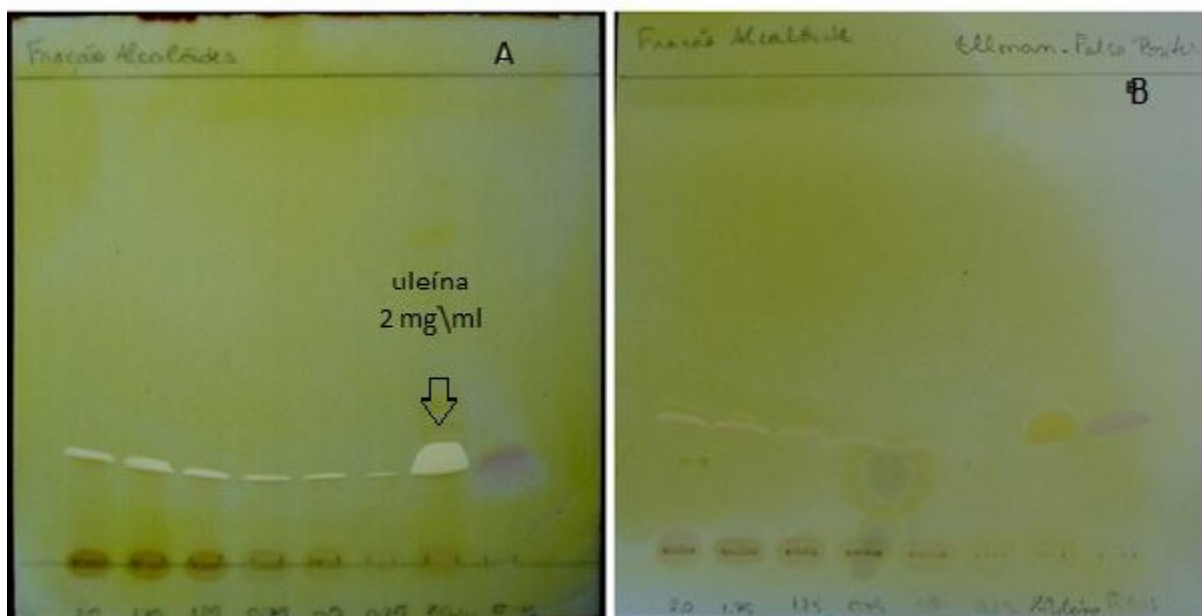


Figura 6. Ensaio em CCD pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) com a fração de alcaloides obtidas a partir da espécie *Himatanthus lancifolius* (Apocynaceae). (A) Ensaio positivo; (B) ensaio falso-positivo. Ordem de aplicação: fração rica em alcaloides (2,0; 1,75; 1,25; 0,75 0,25 mg/ml), uleína (2,0 mg/ml) e fisostigmina (2,0 mg/ml).

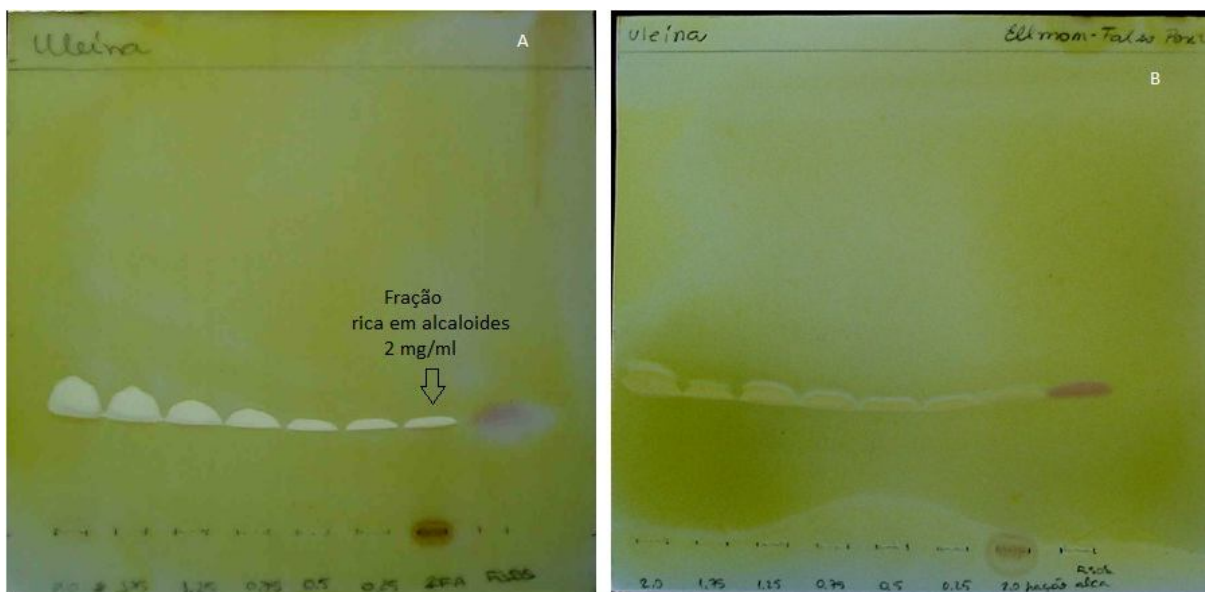


Figura 7. Ensaio em CCD pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) com o alcaloide uleína obtidas a partir da espécie *Himatanthus lancifolius* (Apocynaceae). (A) Ensaio positivo; (B) ensaio falso-positivo. Ordem de aplicação: uleína (2,0; 1,75; 1,25; 0,75 0,25 mg/ml), fração rica em alcaloides (2,0 mg/ml) e fisostigmina (2,0 mg/ml).

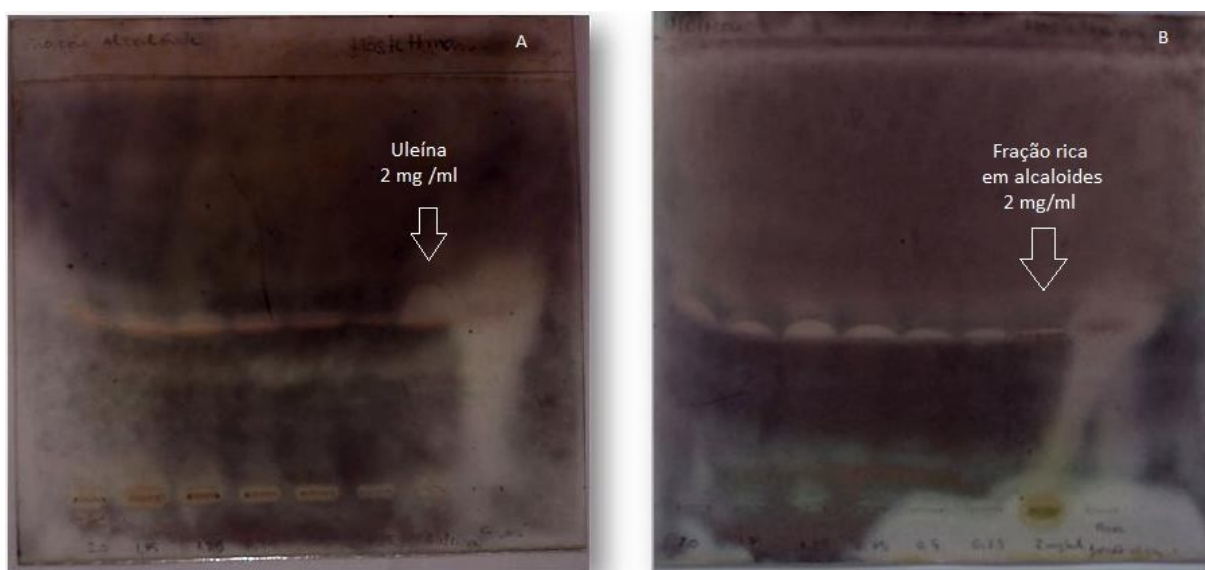


Figura 8. Ensaio em CCD pelo método de Marston (Marston et al., 2002) com a fração de alcaloide (A) e com alcaloide uleína (B) obtidas a partir da espécie *Himatanthus lancifolius* (Apocynaceae). Ordem de aplicação (A): fração rica em alcaloides (2,0; 1,75; 1,25; 0,75 0,25 mg/ml), uleína (2,0 mg/ml) e fisostigmina (2,0 mg/ml). Ordem de aplicação (B): uleína (2,0; 1,75; 1,25; 0,75 0,25 mg/ml), fração rica em alcaloides (2,0 mg/ml) e fisostigmina (2,0 mg/ml).

Com ensaio falso-positivo em CCD utilizando o reagente de Ellman (Rhee et al., 2003b) descartou-se a possibilidade de falsos resultados e o ensaio em CCD utilizando o método de Marston (Marston et al., 2002) contribuiu para a definitiva comprovação da importância da uleína no potencial anticolinesterásico da espécie *H. lancifolius*.

Durante a execução dos experimentos com os dois reagentes utilizando a CCD foi demonstrado que o método de Marston (Marston et al., 2002) possibilita a melhor visualização dos resultados pelo melhor contraste entre as manchas brancas de inibição e o fundo violeta da cromatoplaça. Entretanto, este ensaio é mais trabalhoso do que o ensaio em CCD que utiliza o reagente de Ellman (Rhee et al., 2003b), pois necessita que a placa seja incubada após a aplicação da solução da enzima por 20 min a 37 °C. Além disso, a enzima (AChE, Tipo V-S) utilizada neste ensaio tem maior custo do que a enzima utilizada no ensaio com o reagente de Ellman (AChE, Tipo VI-S).

Determinação da IC₅₀ do alcaloide uleína isolado de *H. lancifolius*

Devido aos resultados promissores obtidos com a uleína nos ensaios utilizando a CCD, o ensaio em microplaca utilizando o método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) foi realizado com diferentes concentrações (0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,0625 mg/ml; 0,03125 mg/ml; 0,01562 mg/ml; 0,0078125 mg/ml) de soluções de uleína em metanol. A partir das porcentagens de inibição encontradas (Tabela 7) foi obtida a curva de inibição (Figura 9) plotando a % de inibição *versus* o logaritmo negativo da concentração do inibidor presentes nas soluções do ensaio.

Tabela 7. Ensaio em microplaca pelo Método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) da uleína da espécie *H. lancifolius*

Uleína (mg/ml)	% inibição AChE	± D.P.(%)
0,015	11,90	12,36
0,03	17,43	4,66
0,06	34,54	0,84
0,12	50,56	0,84
0,25	68,05	1,94
0,5	80,03	0,43
1,0	88,93	0,06

Resultados são a média (%) ($p < 0,001$, $n=3$)±D.P. Frações líquido-líquido obtidas de *Himatanthus lancifolius* (1 g/ml).

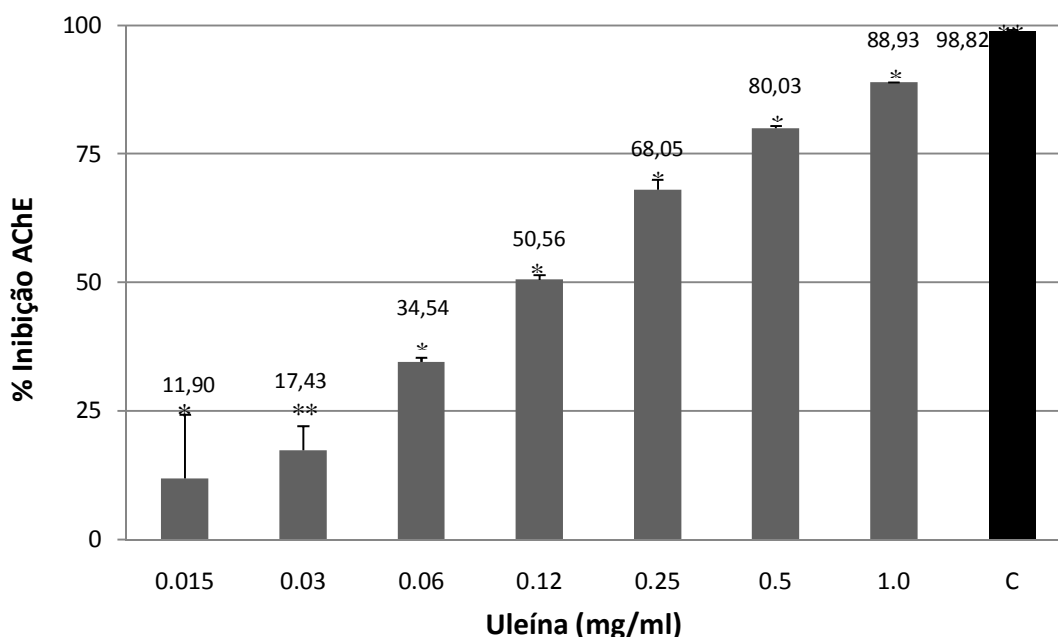


Figura (9): Inibição da acetilcolinesterase pela uleína em soluções metanólicas de *Himatanthus lacifolius* (Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae, avaliadas pelo ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001). Resultados são a média (%) (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$, $n=3$) \pm D.P. C - Soluções metanólicas de diferentes concentrações de uleína (mg/ml) obtida de *Himatanthus lancifolius*; C- controle: fisostigmina (1 mg/ml).

A partir da curva de inibição os parâmetros de regressão linear foram traçados e o valor de IC_{50} 0,45 μ M obtido para a uleína (Figura 10).

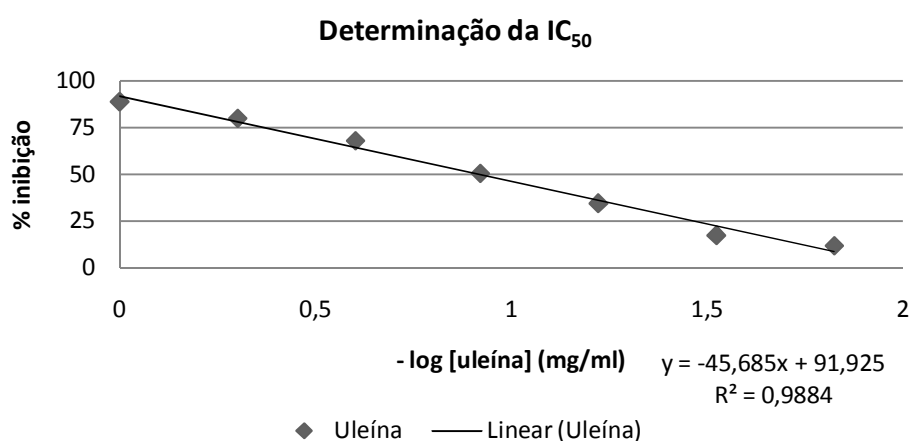


Figura (10): Curva de inibição da acetilcolinesterase obtida para a uleína isolada de *Himatanthus lacifolius* (Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae. Resultados são a média (%) ($p < 0,001$, $n=3$) \pm D.P. C - Soluções metanólicas de diferentes concentrações de uleína (mg/ml) obtida de *Himatanthus lancifolius*.

Orhan e colaboradores (2007) avaliaram o potencial anticolinesterásico de vários alcaloides nas mesmas condições e concentração (1 mg/ml): retamina, cistina e esparteína (quinolizidínicos), escopolamina e atropina (tropânicos), alantoína (imidazolidínico) trigonelina (piridínico) bem como octapamina, sinefrina e capsaicina (aminas exocíclicas) e indólicos, ioimbina e vincamina. Os ensaios foram realizados em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados do ensaio em microplaca pelo Método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001) de alguns alcaloides avaliados por Orhan e colaboradores (Orhan et al., 2007) e da uleína da espécie *H. lancifolius*

Alcaloides	% inibição da AChE (1 μ M)
Retamina	3,75 \pm 0,27*
Esparteína	9,76 \pm 0,38*
Vincamina	---*
Ioimbina	---*
Uleína	23,65 \pm 0,01
Galantamina	28,67 \pm 0,09*

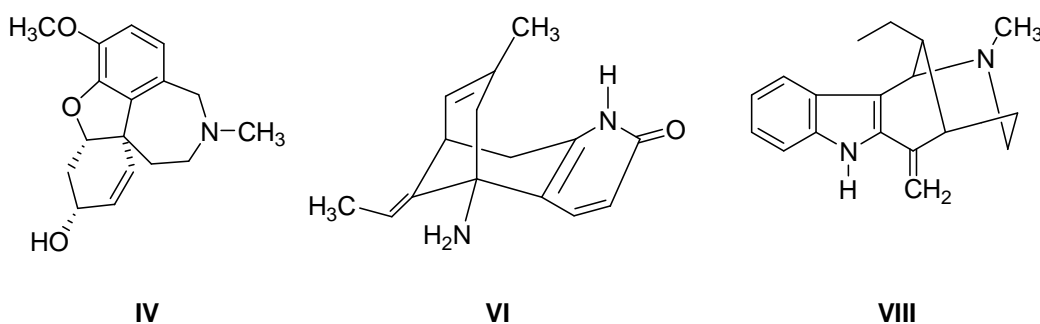
Resultados são a média \pm D.P. (n=3). (*) alcaloides analisados por Orhan e colaboradores (2007). Uleína, resultado obtido utilizando o ensaio em microplaca com o reagente de Ellman nas mesmas condições e concentração.

Ao compararmos os alcaloides testados na mesma concentração molar (1 μ M), observamos que a porcentagem de inibição do alcaloide uleína (23,65 \pm 0,01%) obtida utilizando o mesmo ensaio, nas mesmas condições e na mesma concentração que o ensaio realizado por Orhan e colaboradores (2007) está muito próxima do alcaloide galantamina (28,67 \pm 0,09%), enquanto que para os alcaloides retamina e esparteína a porcentagem de inibição se encontra bem abaixo destes valores o que confirma o potencial anticolinesterásico do alcaloide uleína.

O valor de IC₅₀ obtido para a uleína (0,45 μ M) pode ser considerado extremamente significativo por caracterizar uma droga potente e uma vez que este valor se encontra dentro do intervalo de valores de IC₅₀ encontrado na literatura para a galantamina (0,39 a 1,5 μ M), uma substância de origem natural utilizada para o tratamento da doença de Alzheimer (Adersen et al., 2006; Hillhouse et al., 2004; Kissling et al., 2005).

Esses resultados evidenciam o potencial da uleína (**VIII**) como droga anticolinesterásica. Essa substância, além da atividade demonstrada, ainda pertence à classe dos alcaloides, fonte mais promissora de substâncias anticolinesterásicas, desempenhando, desde o início, um papel

importante nos estudos que buscam em produtos naturais, inibidores desta enzima (Barbosa-Filho et al., 2006). Além disso, a uleína é um alcaloide do grupo indólico com uma estrutura única. Sua estrutura difere dos padrões clássicos de biossíntese dos outros alcaloides do mesmo grupo. Quando comparamos a sua estrutura com a estrutura do alcaloide huperzina A, não encontramos os alguns dos requisitos relacionados com a atividade anticolinesterásica previamente mencionados por Ohrn e colaboradores (2007), tais como a presença de um grupo metila axial. Entretanto, sua origem biossintética pode ser relacionada estruturalmente com substâncias inibidoras da acetilcolinesterásica consagradas, como a galantamina (IV) e a huperzina A (VI), uma vez que esses alcaloides possuem estrutura de núcleo fundamental quinólicos.



Imobilização enzimática

Todos os métodos desenvolvidos para determinar a atividade anticolinesterásica (fluorimétricos, eletroquímicos, espectrofotométricos e cromatográficos) (Kaneda et al., 1985; Marston et al., 2002; Rhee et al., 2003a; Rhee et al., 2001) até o presente exigem o uso de substratos radioativos e uma elevada quantidade de enzima pura. Além disso, exigem uma elevada solubilidade da enzima e das amostras o que afetam sua reprodutibilidade. Uma possibilidade de avaliar essa atividade de forma mais simples, eficiente, de relativo baixo custo e de alta sensibilidade é a utilização da enzima imobilizada em uma coluna cromatográfica acoplada ao equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Bertucci et al., 2003).

Enzimas podem ser empacotadas em colunas e utilizadas em um sistema de fluxo contínuo como reatores imobilizados. Esse método não exige enzimas altamente purificadas e diminui a quantidade de proteínas necessárias. O mais importante é que enzimas imobilizadas podem ser reutilizadas inúmeras vezes seguindo um simples procedimento de lavagem e geralmente demonstram elevada estabilidade. Além disso, as fases estacionárias de enzimas podem ser utilizadas para a investigação de propriedades do inibidor enzimático como o tipo da inibição (competitivo, não-competitivo) e também para uma avaliação quantitativa das constantes de inibição (Girelli & Mattei, 2005).

O desenvolvimento do biorreator enzimático envolve essencialmente três etapas: a escolha do suporte, do espaçador e a imobilização da enzima alvo (Girelli & Mattei, 2005).

Síntese da sílica modificada

A escolha da estrutura do suporte é um importante fator na preparação do biorreator uma vez que determina a acessibilidade dos sítios ativos enzimáticos ao substrato. O suporte ideal deve ser inerte, estável e resistente a forças mecânicas. Entretanto, outras propriedades físicas como forma, porosidade, distribuição dos poros, capacidade de entumecer e cargas também são importantes, pois influenciam no processo cinético. O conhecimento do tipo de enzima a ser imobilizado também é importante, pois cada enzima apresenta uma estrutura particular que favorece certos tipos de ligação com o suporte. No caso da enzima acetilcolinesterase, vários tipos de suportes já foram empregados para sua imobilização (Bartolini et al., 2004; Bartolini et al., 2005a; Bartolini et al., 2005b; Bartolini et al., 2007; Gunaratna & Wilson, 1990; Salamoun & Remien, 1992). Entretanto, a sílica, um composto simples e de baixo custo, vem sendo utilizado como suporte permitindo as mesmas análises com a mesma eficácia do que os suportes mais complexos (Andrisano et al., 2001; Luckarift et al., 2006).

A sílica pode ser utilizada sem modificações para a imobilização enzimática. Entretanto, sua modificação através da introdução de um espaçador favorece este processo, uma vez que a enzima pode se ligar de maneira mais estável e de forma estericamente favorável com seus

sítios ativos disponíveis para o processo reacional. Os agentes epoxilantes são compostos amplamente utilizados para aumentar a estabilidade e a integridade de uma variedade de polímeros. As superfícies ativadas por grupos epóxido são muito atraentes para a imobilização covalente de biomoléculas. Dentro deste contexto, a modificação utilizando grupos silano-epóxi funcionais fornece uma superfície químicamente reativa para a imobilização covalente de enzima. Os grupos funcionais silanóis da sílica foram modificados através da reação com o reagente 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS) para síntese da sílica epoxidada, resultando na introdução de um grupamento epóxido, susceptível a reações com os grupos nucleófilos das enzimas (Felix & Descorps, 1999b; Zhang et al., 2009).

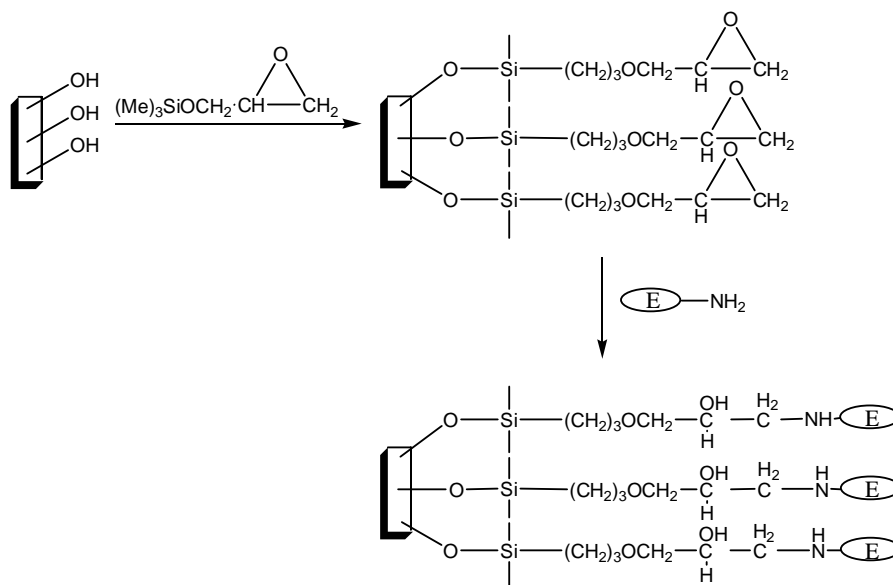
Empacotamento da coluna com a sílica modificada

O empacotamento da coluna é uma etapa muito importante na montagem do biorreator enzimático. A escolha da forma de empacotamento depende do suporte escolhido como fase estacionária. O tamanho da partícula do suporte é o fator que determina a técnica que será utilizada para o empacotamento da coluna. Quanto menor o diâmetro da partícula, maior a pressão a ser empregada para que haja um empacotamento eficaz (Bartolini et al., 2005b). A sílica utilizada para a montagem do biorreator apresentava um diâmetro de partículas entre 37 a 44 μm o que possibilitou o empacotamento a seco. Após a adição da sílica epoxidada no interior da coluna de aço inoxidável, foi preciso acoplar a coluna à bomba do equipamento de CLAE e a circulação do solvente acetona previamente seco sob fluxo de 10 ml/min para promover o empacotamento final das partículas. Isto permitiu que as partículas de sílica ficassem melhor empacotadas e também possibilitou a remoção de qualquer excesso remanescente de 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMS).

Imobilização da enzima acetilcolinesterase

A imobilização enzimática através de ligação covalente com o suporte é um dos métodos mais utilizados no preparo de biorreatores. Envolve a formação de ligações covalentes

entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima. No desenvolvimento do biorreator utilizando como suporte a sílica epoxidada, os grupos amino dos resíduos de lisina da enzima acetilcolinesterase irão reagir com o grupo epóxido para fornecer uma ligação covalente carbono – nitrogênio (Esquema 5) (Cardoso et al., 2009).



Esquema 6. Esquema da reação entre a sílica e a substância ativadora 3-glicidoxipropiltrimetoxissilano (GPTMS). Após a formação da sílica epoxidada ocorre a imobilização enzimática aqui representada pela ligação covalente entre o grupo amino e o grupo epóxido (Girelli & Mattei, 2005).

Determinação da quantidade de enzimas imobilizadas ativamente no biorreator

Foi possível calcular a quantidade de unidades de enzimas imobilizadas no biorreator (35) através do monitoramento da diminuição da absorção UV-Vis da solução da enzima antes e depois de 24 h do procedimento de imobilização (Andrisano et al., 2001). O rendimento da imobilização foi de 29 %. Entretanto, era necessário determinar a quantidade de enzimas imobilizadas ativamente no biorreator. Isto foi determinado pelo método descrito previamente, basicamente injetando o substrato no biorreator, coletando os produtos da hidrólise enzimática e fazendo a leitura da absorvância (412 nm) das soluções do produto conforme descrito por Andrisano e colaboradores (Andrisano et al., 2001). O produto da

hidrólise enzimática do substrato (ACTI) deve ser coletado, pois não é disponível comercialmente para que sua concentração possa ser determinada.

A quantidade do ânion amarelo formado (Esquema 3) foi proporcional à concentração de substrato injetado de conforme o gráfico de Michaelis-Menten (Figura 11).

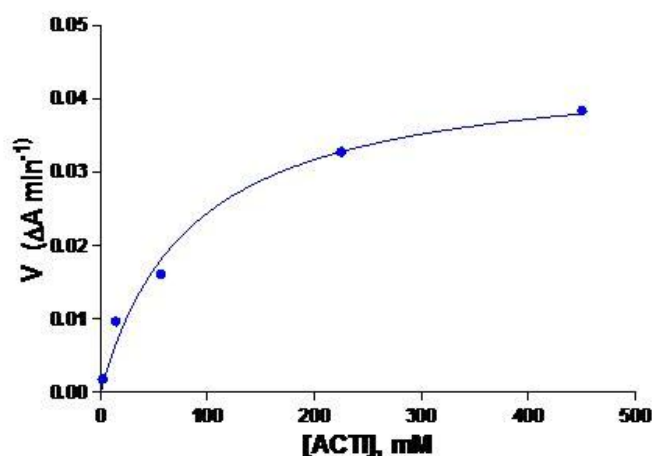


Figura 11. Gráfico de Michaelis-Menten para a enzima AChE imobilizada. Taxa da reação *versus* a concentração de acetiltiocolina (ACTI). Os valores são a média de três experimentos.

Para a determinação da quantidade de unidades de enzimas imobilizadas ativamente no biorreator bem como a concentração de saturação do substrato (K_m), as taxas da hidrólise (V) da acetiltiocolina (ACTI) obtida a partir da injeção de concentrações crescentes de substrato (1,75 a 450 mM) foram plotadas *versus* suas respectivas concentrações. O gráfico do duplo-recíproco ou Lineweaver e Burk de $1/V$ a $1/[ACTI]$ (Figura 12) forneceu os valores estimados de K_m ($37,06 \pm 4,39$ mM) e V_{max} ($0,038 \pm 0,004$ mM $\Delta A/\text{min}$).

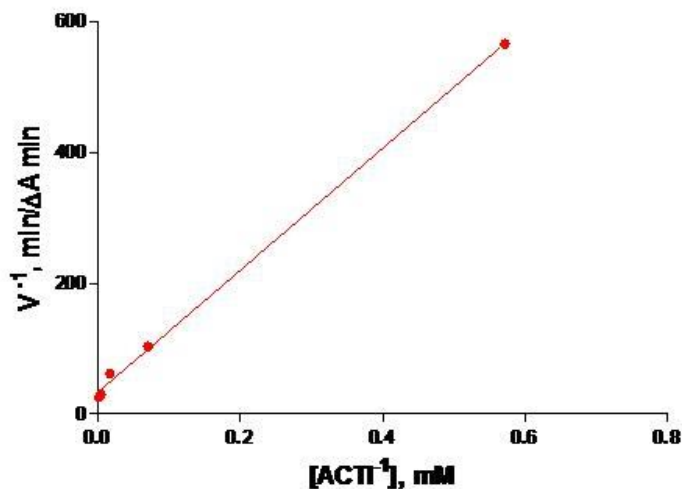


Figura 12. Gráfico de Lineweaver e Burk para a enzima AChE imobilizada. Os valores são a média de três experimentos.

Desta forma os valores de K_m e V_{max} foram obtidos e a partir do valor de V_{max} foi calculado a quantidade de unidades de enzima imobilizadas ativamente. A quantidade de enzimas imobilizadas ativamente no biorreator foi $27,97 \pm 3,52$ unidades o que corresponde a uma imobilização ativa de 96,44% das enzimas presentes no biorreator. Essa porcentagem comprova que a metodologia para a imobilização da enzima foi eficaz.

Determinação da atividade anticolinesterásica utilizando o biorreator enzimático

A fisostigmina, um inibidor reversível da enzima AChE foi utilizada para a determinação da atividade anticolinesterásica utilizando o biorreator enzimático. Uma solução de substrato (ACTI) 30 mM foi injetada em triplicata. Posteriormente, uma solução de inibidor (0,1 mM) contendo a mesma concentração do substrato (30 mM) foi injetada e a área do pico relativa integrada (Figura 10). As áreas dos picos foram comparadas entre aquelas obtidas na presença e na ausência do inibidor. A porcentagem de inibição enzimática foi calculada pela seguinte equação: $100 - (A_i/A_0 * 100)$; onde A_i é a área do pico calculada na presença do inibidor (Figura 14) e A_0 é a área do pico calculada na presença somente do substrato (Figura 13) (Andrisano et al., 2001), obtendo-se o resultado de $97,46 \pm 0,56\%$.

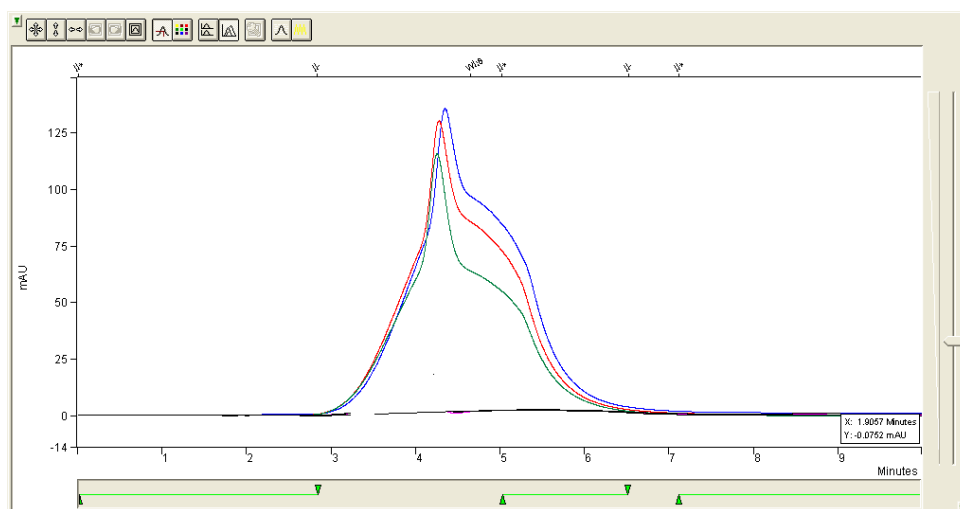


Figura 13. Cromatogramas sobrepostos do substrato ACTI (30 mM). Coluna (250 X 4,6 mm I.D.). FM: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M de reagente de Ellman, fluxo 0,5 ml/min, $\lambda=412$ nm e 37 °C.

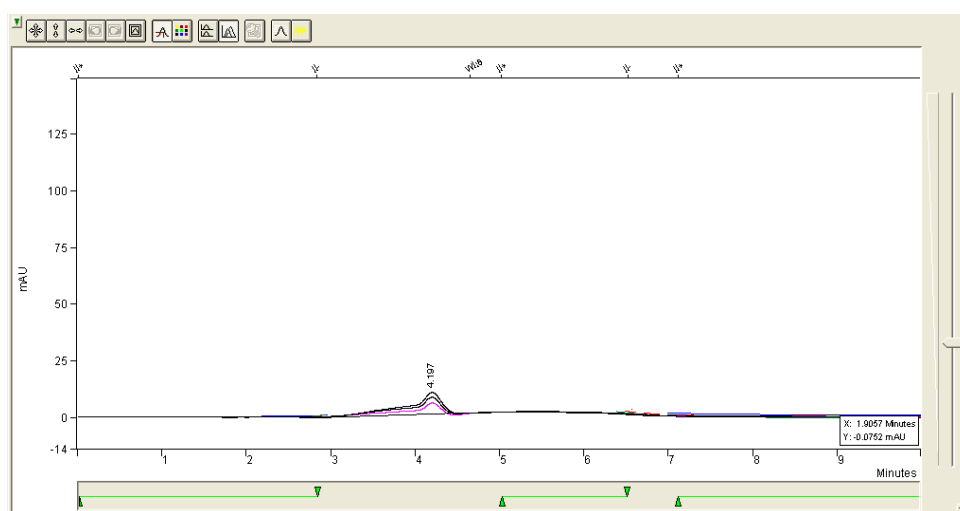


Figura 14. Cromatogramas sobrepostos do inibidor fisostigmina (0,1 mM). Coluna (250 X 4,6 mm I.D.). FM: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M de reagente de Ellman, fluxo 0,5 ml/min, $\lambda=412$ nm e 37 °C.

No cromatograma a seguir (Figura 15) é possível comparar a redução da área dos picos obtidos na presença do inibidor (B) e na ausência do inibidor (A).

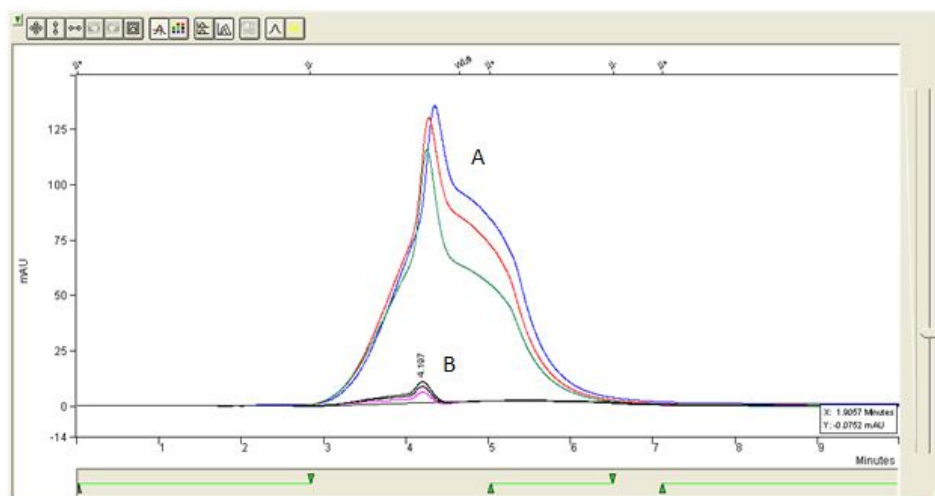


Figura 15. Cromatogramas sobrepostos do (A) substrato ACTI (30 mM) e (B) do inibidor fisostigmina (0,1 mM). Coluna (250 X 4,6 mm I.D.). FM: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M de reagente de Ellman, fluxo 0,5 ml/min, $\lambda=412$ nm e 37 °C.

Nos cromatogramas (Figura 13, 14 e 15) é possível observar o aparecimento de uma fonte (ombro) que antecede o pico cromatográfico que pode estar relacionado com o surgimento de espaços vazios no interior da coluna. Estes espaços ocorrem geralmente na sua entrada e está geralmente relacionado com duas causas. Uma delas é a compactação do material de empacotamento e a outra é a solubilização do material de empacotamento com sua consequente lixiviação. Essa compactação ocorre mais comumente quando a coluna é preparada no próprio laboratório e quando ocorre alguma falha neste processo. Neste caso, acaba ocorrendo um rearranjo das partículas de empacotamento no interior da coluna, após a coluna ser preparada, fechada e colocada para uso. Com o uso, pode ocorrer um rearranjo das partículas e consequente formação de um espaço vazio no leito cromatográfico. Esse tipo de espaço formado pode ocorrer no início do leito, ou ainda caminhos preferenciais vazios podem ser formados ao longo dele. É importante ressaltar que as distorções causadas por espaços vazios afetam similarmente todos os picos do cromatograma, uma vez que as anomalias causadas ao fluxo atingem todas as substâncias da mistura, em conjunto, antes que elas sejam separadas através da coluna (Neto, 2009).

Visando minimizar o efeito da fonte (ombro) que aparece antecedendo o pico cromatográfico (Figura 15), optou-se por aumentar o fluxo da fase móvel. Com isso, além de

diminuir o tempo de corrida, obteve-se uma melhor resolução dos picos no cromatograma (Figura 16).

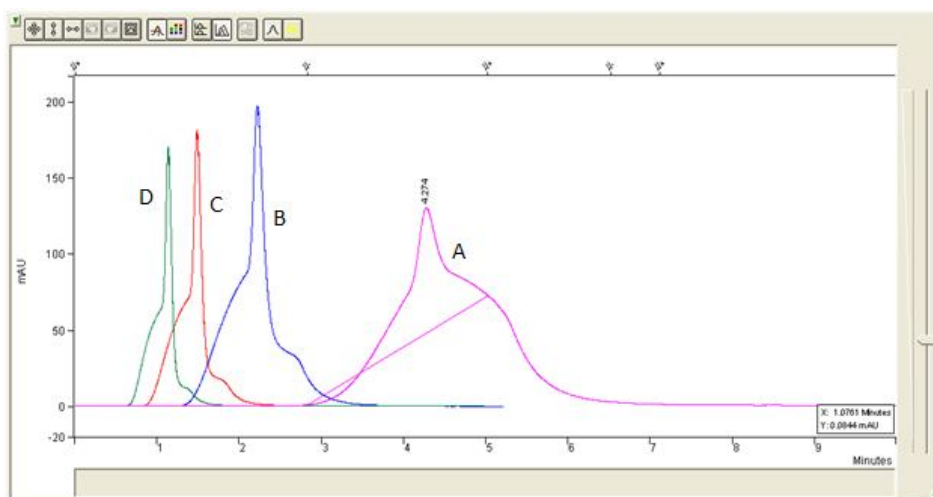


Figura 16. Cromatogramas sobrepostos do substrato ACTI (30 mM) com diferentes fluxos (A) 0,5 ml/min, (B) 1,0 ml/min, (C) 1,5 ml/min e (D) 2,0 ml/min. Coluna (250 X 4,6 mm I.D.). FM: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M de reagente de Ellman, $\lambda=412$ nm e 37 °C.

O desenvolvimento do biorreator enzimático foi baseado no trabalho publicado por Andrisano e colaboradores (Andrisano et al., 2001) que também utilizou enzima AChE imobilizada em um suporte cromatográfico utilizando a sílica epoxidada como fase estacionária. O biorreator utilizado neste experimento foi desenvolvido a partir de uma solução de enzima na concentração 1 U/ml enquanto que o outro foi desenvolvido a partir de uma solução de enzima 3,125 U/ml. Apesar disso, o rendimento de unidade de enzimas imobilizadas foi proporcionalmente o mesmo 29% e 25% respectivamente, e o rendimento de enzimas imobilizadas ativamente também foi proporcionalmente igual 96,44% e 96% respectivamente. Além disso, como optou-se por uma coluna de maior comprimento (250 mm versus 50 mm) foi possível utilizar um fluxo maior da fase móvel e com isso o tempo de corrida para o nosso experimento foi menor (5 min) do que o tempo de corrida para o experimento descrito por Andrisano e colaboradores (Andrisano et al., 2001) (20 min) (Figura 17) o que contribuiu também para um melhor perfil cromatográfico com picos mais resolvidos.

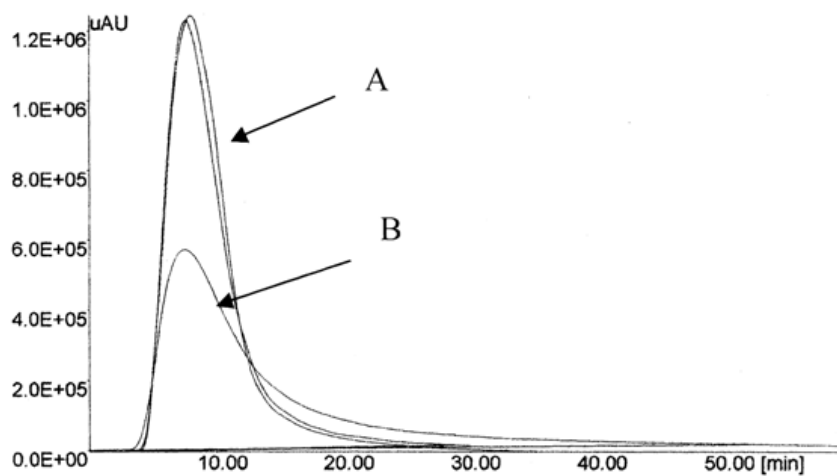


Figura 17. Cromatogramas sobrepostos de (A) substrato ACTI (30 mM), (B) substrato ACTI (30 mM) e donazepila (9 μM). Coluna (50 X 4,6 mm I.D.).FM: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo $1,26 \times 10^{-4}$ M de reagente de Ellman, fluxo 0,1 ml/min, $\lambda=412$ nm e 37 °C (Andrisano et al., 2001).

CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Os ensaios em cromatografia de camada delgada com o reagente de Ellman e pelo método de Marston possibilitaram a avaliação simultânea da atividade anticolinesterásica de dezenove extratos simples das seguintes espécies medicinais: *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze (Amaranthaceae), *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson (Apocynaceae), *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. (Apocynaceae), *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae), *Philodendron sellowianum* Kunth (Araceae), *Jacaranda micrantha* Cham. (Bignoniaceae), *Fucus vesiculosus* L. (Fucaceae), *Garcinia cambogia* Descr. (Clusiaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cogn.) Cogn. (Cucurbitaceae), *Discorea glandulosa* Kunth (Discoreaceae), *Bauhinia microstachya* (Raddi) J.F. Macbr. (Fabaceae), *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae), *Passiflora actinia* Hook (Passifloraceae), *Zea mays* L. (Poaceae), *Arundo donax* L. (Poaceae), *Picrasma crenata* Engl. in Engl. & Prantl (Simaroubaceae), *Anchietea pyrifolia* A. St.-Hil (Violaceae), *Hybanthus bigibbosus* (A. St.-Hil.) Hassl. (Violaceae) e *Phoradendron falcifrons* (Hook. & Arn.) Eichler (Violaceae). Dentre todos os extratos avaliados, somente as espécies de *P. actinia*, *Z. mayz* e *G. cambogia* não apresentaram resultados de inibição da enzima satisfatórios.

Os ensaios em CCD por ambos os métodos são úteis para a triagem preliminar, bem como permitem estabelecer uma correlação entre a atividade anticolinesterásica de substâncias isoladas nos extratos, como foi realizado para a espécie *H. lancifolius* e o alcaloide uleína. Ambos os ensaios permitiram a mesma interpretação, mas a visualização dos resultados foi favorecida no método de Marston.

A associação dos dois ensaios (CCD e microplaca) possibilitou não somente a detecção, mas também a quantificação da atividade anticolinesterásica dos extratos fluidos, das frações líquido-líquido e da substância isolada uleína. Também permitiu a diferenciação das frações mais ativas obtidas das espécies *H. lancifolius* e *R. sellowii*. Essas frações ativas coincidiram com àquelas onde era maior a concentração de compostos nitrogenados revelados pelo corante Dragendorff.

O método utilizando enzima acetilcolinesterase imobilizada mostrou-se eficiente, especialmente para a avaliação da substância isolada. Para estudos futuros, pretende-se

otimizar as etapas para o preparo do biorreator, a avaliar a atividade de extratos, frações e outras substâncias isoladas para a enzima acetilcolinesterase, bem como para outras enzimas envolvidas no processo neurodegenerativo da doença de Alzheimer como a β -secretase.

REFERÊNCIAS¹

-
- Adersen A, Gauguin B, Gudiksen L, Jager AK 2006. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol* 104: 418-422.
- Alcala MM, Maderuelo A, Vivas NM, Camps P, Munoz-Torrero D, Clos MV, Badia A 2005. Effects of (+/-)-huprine Y and (+/-)-huprine Z, two new anticholinesterasic drugs, on muscarinic receptors. *Neurosci Lett* 379: 106-109.
- Andrade MT, Lima JA, Pinto AC, Rezende CM, Carvalho MP, Epifanio RA 2005. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Muell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorgan Med Chem* 13: 4092-4095.
- Andrisano V, Bartolini M, Gotti R, Cavrini V, Felix G 2001. Determination of inhibitors' potency (IC50) by a direct high-performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column. *J Chromatogr B* 753: 375-383.
- Anekonda TS, Reddy PH 2005. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 50: 361-376.
- Baggio CH, Otofujii GDM, Souza WM, Santos CAM, Torres LMB, Rieck L, Marques MCA, Mesa-Vela S 2005. Gastroprotective Mechanism of Indole Alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. *Planta Med* 71: 733-738.
- Baratto LC 2010. Estudo químico-analítico e morfoanatómico de espécies medicinais brasileiras da família Apocynaceae: *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson e *Rauwolfia sellowii* Müll. Arg. Curitiba, 155p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Barbosa-Filho JM, Medeiros KCP, F.M. MdF, Batista LM, Athayde-Filho PF, Silva MS, Cunha EVLd, Almeida JRGS, Quintans-Júnior LJ 2006. Natural Products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev Bras Farmacogn* 16: 258-285.
- Bartolini M, Cavrini V, Andrisano V 2004. Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies. *J Chromatogr A* 1031: 27-34.
- Bartolini M, Cavrini V, Andrisano V 2005a. Batchwise covalent immobilization of human acetylcholinesterase: Kinetic and inhibition spectrophotometric studies. *Anal Biochem* 342: 163-166.
- Bartolini M, Cavrini V, Andrisano V 2005b. Choosing the right chromatographic support in making a new acetylcholine sterase-micro-immobilised enzyme reactor for drug discovery. *J Chromatogr A* 1065: 135-144.
- Bartolini M, Cavrini V, Andrisano V 2007. Characterization of reversible and pseudo-irreversible acetylcholine sterase inhibitors by means of an immobilized enzyme reactor. *J Chromatogr A* 1144: 102-110.
- Batista CVF, Schripsema J, Verpoorte R, Rech SB, Henriques AT 1996. Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii*. *Phytochemistry* 41: 969-973.

¹ Referências de acordo com o formato da Revista Brasileira de Farmacognosia.

- Bertucci C, Bartolini M, Gotti R, Andrisano V 2003. Drug affinity to immobilized target biopolymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 797: 111-129.
- Brandão MGL, Consenza GP, Moreira RA, Monte-Flor RLM 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 16: 408-420.
- Cardoso CL, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Furlan M, Epifanio RD, Pinto AD, de Rezende CM, Lima JA, Bolzani VD 2004. Indole glucoalkaloids from *Chimarrhis turbinata* and their evaluation as antioxidant agents and acetylcholinesterase inhibitors. *J Nat Prod* 67: 1882-1885.
- Cardoso CL, de Moraes MC, Cass QB 2009. Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds. *Quim Nova* 32: 175-187.
- Chattipakorn S, Pongpanparadorn A, Pratchayasakul W, Pongchaidacha A, Ingkaninan K, Chattipakorn N 2007. *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *J Ethnopharmacol* 110: 61-68.
- Corrêa MP 1926. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, vol. 1. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- Cummings JL, Back C 1998. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Am J Geriatr Psychiat* 6: S64-S78.
- Di Giovanni S, Borloz A, Urbain A, Marston A, Hostettmann K, Carrupt PA, Reist M 2008. *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. *Eur J Pharm Sci* 33: 109-119.
- Di Stasi LC, Hiruma-Lima, CA 2002. Gentianales medicinais. In: Di Stasi. L.C., Hiruma-Lima, C.A. (orgs.) *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo. Editora da Unesp, p. 375-385.
- Djerassi C, Gorman M, Nussbaum AL, Reynoso J 1954. Alkaloid studies .4. The isolation of reserpine, serpentine and ajmaline from *Rauwolfia heterophylla* Roem. and Schult. *J Am Chem Soc* 76: 4463-4465.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
- Facundo VA, Rios KA 2005. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: Anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. *J Brazil Chem Soc* 16: 1309-1312.
- FDA (2007) Alzheimer's Disease: FDA's Role In New Product Development. U.S. Food and drug administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm110879.htm>> Acesso em: 4 mai 2008.
- Felix G, Descorps V 1999a. Stereochemical resolution of racemates, in HPLC, using a chiral stationary phase based upon immobilized alpha-chymotrypsin. I. Structural chiral separations. *Chromatographia* 49: 595-605.
- Felix G, Descorps V 1999b. Stereochemical resolution of racemates, in HPLC, using a chiral stationary phase based upon immobilized alpha-chymotrypsin. II. Enzyme chiral separations. *Chromatographia* 49: 606-614.

- França OO, Brown RT, Santos CAM 2000. Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. *Fitoterapia* 71: 208-210.
- Garcia-Sanchez C, Estevez-Gonzalez A, Boltes A, Otermin P, Lopez-Gongora M, Gironell A, Kulisevsky J 2003. Cognitive and functional decline in the stage previous to the diagnosis of Alzheimers disease. *Neurologia* 18: 716-722.
- Gaskell AJ, Joule JA 1967. Structure of uleine - relative stereochemistry. *Chem Ind-London* 1089.
- Gilania AH, Ghayura MN 2004. Presence of cholinomimetic and acetylcholinesterase inhibitory constituents in betel nuts. *Life Sci* 75: 2377-2389.
- Girelli AM, Mattei E 2005. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *J Chromatogr B* 819: 3-16.
- Gouras GK 2001. Current theories for the molecular and cellular pathogenesis of Alzheimers disease. *Expert Rev Mol Med* 2001: 1-11.
- Gunaratna PC, Wilson GS 1990. Optimization of multienzyme flow reactors for determination of acetylcholine. *Anal Chem* 62: 402-407.
- Hillhouse BJ, Ming DS, French CJ, Towers GHN 2004. Acetylcholine esterase inhibitors in *Rhodiola rosea*. *Pharm Biol* 42: 68-72.
- Hochstein FA 1955. Alkaloids of *Rauwolfia-Sellowii*. *J Am Chem Soc* 77: 5744-5745.
- Howes MJ, Houghton PJ 2003. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol Biochem Behav* 75: 513-527.
- IBGE 2008. Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade 1980-250. In: *Estudos e Pesquisas Informação Demográfica e Socioeconômica*. Brasília. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 93p.
- Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenchom K, Yuyaem T, Thongnoi W 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J Ethnopharmacol* 89: 261-264.
- Joule JA, Djerassi C 1964. Alkaloid studies. 45. Mass spectrometry in structural + stereochemical problems. 42. Some aspects of chemistry + mass spectrometry of uleine. *J Chem Soc* 2777-2790.
- Kaneda N, Noro Y, Nagatsu T 1985. Highly sensitive assay for acetylcholinesterase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr A* 344: 93-100.
- Kasa P, Rakonczay Z, Gulya K 1997. The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 52: 511-535.
- Khalid A, Zaheer-ul-Haq, Ghayur MN, Feroz F, Atta-ur-Rahman, Gilani AH, Choudhary MI 2004. Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids. *J Steroid Biochem* 92: 477-484.
- Kiely JS, Moos WH, Pavia MR, Schwarz RD, Woodard GL 1991. A silica-gel plate-based qualitative assay for acetylcholinesterase activity - a mass method to screen for potential inhibitors. *Anal Biochem* 196: 439-442.
- Kim J, Lee HJ, Lee KW 2010. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 112: 1415-1430.
- Kissling J, Ioset JR, Marston A, Hostettmann K 2005. Bio-guided isolation of cholinesterase inhibitors from the bulbs of *Crinum x powellii*. *Phytother Res* 19: 984-987.

- Lahiri DK 1994. Related reversibility of the effect of tacrine on the secretion of the beta-amyloid precursor protein in cultured cells. *Neurosci Lett* 181: 149–152.
- Lahiri DK, Lewis S, Farlow MR 1994. Tacrine alters the secretion of the beta-amyloid precursor protein in cell lines. *J Neurosci Res* 15: 777–787.
- Lopes JF 2008. *Uleína e ioimbina de Himatanthus lancifolius Wood., Apocynaceae*. Curitiba, 79p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Farmacácia, Universidade Federal do Paraná.
- Lopez S, Bastida J, Viladomat F, Codina C 2002. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci* 71: 2521-2529.
- Luckarift HR, Johnson GR, Spain JC 2006. Silica-immobilized enzyme reactors; application to cholinesterase-inhibition studies. *J Chromatogr A* 843: 310-316.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81: 230-242.
- Marco L & Carreiras CM 2006. Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent Pat CNS Drug Discov* 1: 105-111.
- Marston A, Kissling J, Hostettmann K 2002. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem Anal* 13: 51-54.
- Mesulam MM & Larry RS 2009. Acetylcholine Neurotransmission in CNS. In: *Encyclopedia of Neuroscience*, pp. 1-4. Academic Press, Oxford.
- Melanie-Jayne RH, Nicolette SLP, Peter JH 2003. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytother Res* 17: 1-18.
- Mori F, Lai CC, Fusi F, Giacobini E 1995. Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. *Neuroreport* 6: 633-636.
- Mroue M, Alam M 1991. Crooksiine, a Bisindole Alkaloid from *Haplophyton crooksii*. *Phytochemistry* 30: 1741-1744.
- Nardin JM, de Souza WM, Lopes JF, Florao A, Santos CAM, Weffort-Santos AM 2008. Effects of *Himatanthus lancifolius* on human leukocyte chemotaxis and their adhesion to integrins. *Planta Med* 74: 1253-1258.
- Nardin JM, Lima MP, Machado JCJ, Hilst LF, Santos CAM, Weffort-Santos AM 2010. The uleine-rich fraction of *Himatanthus lancifolius* blocks proliferative responses of human lymphoid cells. *Planta Med* DOI: 10.1055/s-0029-1240648.
- Neto AJS 2009. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica* 1: 69-77.
- Newman DJ & Cragg GM 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70: 461-477.
- NIA 2009. 2008 Progress Report on Alzheimer's disease: Moving Discovery Forward, National Institute of Aging. National Institute of Health. U.S. Department of Health and Human Services. 52p.

- Nitsch RM, Farber SA, Growdon JH, Wurtman RJ 1993. Release of amyloid beta-protein precursor derivatives by electrical depolarization of rat hippocampal slices. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5191–5193.
- Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH 1992. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by ²activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258: 304-307.
- Oh MH, Houghtona PJ, Whang WK, Cho JH 2004. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. *Phytomedicine* 11: 544–548.
- Orhan G, Orhan I, Sener B 2006. Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease. *Lett Drug Design Discov* 3: 268-274.
- Orhan I, Naz Q, Kartal M, Tosun F, Sener B, Choudhary MI 2007. *In vitro* anticholinesterase activity of various alkaloids. *Z Naturforsch C* 62: 684-688.
- Orhan I, Sener B, Choudhary MI, Khalid A 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 91: 57-60.
- Pakrashi SC, Djerassi C, Wasicky R, Neuss N 1955. Alkaloid studies .9. *Rauwolfia* alkaloids .4. isolation of reserpine and other alkaloids from *Rauwolfia sellowii* Müell Arg. *J Am Chem Soc* 77: 6687-6689.
- Pallas M, Camins A 2006. Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Design* 12: 4389-4408.
- Racchi M, Mazzucchelli M, Porrello E, Lanni C, Govoni S 2004. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol Res* 50: 441-451.
- Rattmann YD, Terluk MR, Souza WM, Santos CAM, Biavatti MW, Torres LB, Mesia-Vela S, Rieck L, Silva-Santos JE, Marques MCA 2005. Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. *J Ethnopharmacol* 100: 268-275.
- Reichman WE 2003. Current pharmacologic options for patientes with Alzheimer's disease. *Ann Gen Hospital Psychiatry* 2: 1-14.
- Rhee IK, Appels N, Luijendijk T, Irth H, Verpoorte R 2003a. Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts using a fluorimetric flow assay. *Phytochem Anal* 14: 145-149.
- Rhee IK, van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte R 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatogr A* 915: 217-223.
- Rhee IK, van Rijn RM, Verpoorte R 2003b. Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochem Anal* 14: 127-131.
- Roman S, Vivas NM, Badia A, Clos MV 2002. Interaction of a new potent anticholinesterasic compound (+/-)huprine X with muscarinic receptors in rat brain. *Neurosci Lett* 325: 103-106.
- Salah SM, Jager AK 2005. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol* 97: 145-149.
-

- Salamoun J, Remien J 1992. Indirect detection of antiacetylcholinesterase compounds in microcolumn liquid-chromatography using packed-bed reactor with immobilized human red-blood-cell acetylcholinesterase and choline oxidase. *J Pharmaceut Biomed* 10: 931-936.
- Salvietti N, Cattaneo E, Govoni S, Racchi M 1996. Changes in beta amyloid precursor protein secretion associated with the proliferative status of CNS derived progenitor cells. *Neurosci Lett* 212: 199-203.
- Selkoe DJ 2004a. Alzheimer disease: Mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* 140: 627-638.
- Selkoe DJ 2004b. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol* 6: 1054-1061.
- Silva GL, Gaertner P, Marson PG, Scharwz EA, Santos CAM 2004. An ethno-pharmacobotanical survey in Salto Caxias Hydroelectric Power Plant in Paraná State, Brazil, before the flooding. *Acta Farm Bonaer* 23: 148-153.
- Siqueira IR, Fochesatto C, da Silva AL, Nunes DS, Battastini AM, Netto CA, Elisabetsky E 2003. *Ptychopetalum* olacoides, a traditional Amazonian "nerve tonic", possesses anticholinesterase activity. *Pharmacol Biochem Behav* 75: 645-650.
- Souza WM 2007. *Estudo químico e das atividades biológicas dos alcaloides indólicos de Himatanthus lancifolius (Muell. Arg.) Woodson*. Curitiba, 176p. Tese de Doutorado - Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná.
- Souza WM, Brehmer F, Nakao LS, Stingham AEM, Santos CAM 2007. Uleine effect on the production of nitric oxide in RAEC and B16F10 cells. *Rev Bras Farmacogn* 17: 191-196.
- Souza WM, Stingham AEM, Santos CAM 2004. Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. *Fitoterapia*. 75 750-753.
- Spina AP 2004. *Estudos taxonômicos, micro-morfológicos e filogenético do gênero Himatanthus Wild. ex Schult. (Apocynaceae: Ralvolfideae-Plumerieae)*. Campinas, 197p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas.
- Trevisan MTS, Macedo FVV, Van de Meent M, Rhee IK, Verpoorte R 2003. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Quim Nova* 26: 301-304.
- Viegas C, Bolzani VD, Barreiro EJ, Fraga CAM 2005. New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: The role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 5: 915-926.
- Viegas C, Bolzani VD, Furlan M, Furlan M, Fraga CAM, Barreiro EJ 2004. Natural products as candidates for useful drugs in the treatment of Alzheimer's disease. *Quim Nova* 27: 655-660.
- Vieira IJC, Nideiros NLB, Monnerat CS, Souza JJ, Mathias L, Braz R, Pinto AC, Sousa PM, Rezende CM, Epifanio RDA 2008. Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures. *An Aca Bras Cien* 80: 419-426.
- Wagner H, Bladt S 1996. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*. Heidelberg: Springer.

- Wang BS, Wang H, Wei ZH, Song YY, Zhang L, Chen HZ 2009. Efficacy and safety of natural acetylcholinesterase inhibitor huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *J Neural Transm* 116: 457-465.
- WHO 2001. *Alzheimer's disease: the brain killer*. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/searo/2001/SEA_Ment_116.pdf>. Acesso em: 23 jun 2008.
- WHO 2002. *WHO Model List of Essential Medicines*. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/a76618.pdf>>. Acesso em: 12 mar 2009.
- Wolf BA, Wertkin AM, Jolly YC, Yasuda RP, Wolfe BB, Konrad RJ 1995. Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid beta-protein production in human neuronal NT2N cells. *J Biol Chem* 270: 4916-4922.
- Zhang Q, Huang RF, Guo LH 2009. One-step and high-density protein immobilization on epoxysilane-modified silica nanoparticles. *Chinese Sci Bull* 54: 2620-2626.