



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA**

ANTONIO DO NASCIMENTO CAVALCANTE

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM COMPLEXO DE
INCLUSÃO E TESTES DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS A
PARTIR DE CONSTITUINTE QUE TEM ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICO ISOLADO DAS SEMENTES DE *Platonia
insignis* MART (BACURIZEIRO)**

TESE DE DOUTORADO

TERESINA – PI

ABRIL/2019

ANTONIO DO NASCIMENTO CAVALCANTE

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM COMPLEXO DE
INCLUSÃO E TESTES DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS A
PARTIR DE CONSTITUINTE QUE TEM ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICO ISOLADO DAS SEMENTES DE *Platonia
insignis* MART (BACURIZEIRO)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química – Centro de Ciências da Natureza da
Universidade Federal do Piauí como parte dos
requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor
em Química

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa

TERESINA – PI

ABRIL/2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCN

C377e Cavalcante, Antonio do Nascimento.
Elaboração e caracterização de um complexo de inclusão e testes de atividades farmacológicas a partir de constituinte que tem atividade anticolinesterásico isolado das sementes de *Platonia insignis* MART (bacurizeiro) / Antonio do Nascimento Cavalcante – Teresina, 2019.
199 f.: il. color

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.
Orientadora: Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa.

1. Química Orgânica. 2. Acetilcolinesterase 3. Atividade Antioxidante. 4. Radicais Livres. 5. *Platonia insignis* MART (bacurizeiro). I. Título.

CDD 547

Bibliotecária: Caryne Maria da Silva Gomes – CRB / 1461

FOLHA DE APROVAÇÃO – TESE

NOME: ANTONIO DO NASCIMENTO CAVALCANTE

TÍTULO: Elaboração e caracterização de um complexo de inclusão e testes de atividades farmacológicas a partir de constituinte que tem atividade anticolinesterásico isolado das sementes de *Platonia insignis* MART (bacurizeiro).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Química.

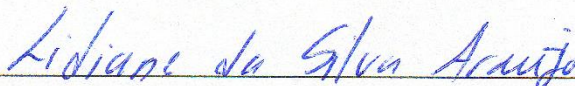
Aprovada em: 26 de abril de 2019.

BANCA EXAMINADORA



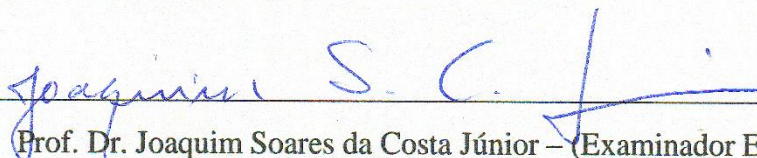
Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa – (Orientadora e Presidente)

Programa de Pós-Graduação em Química – UFPI



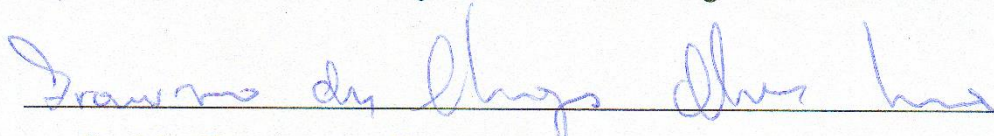
Profa. Dra. Lidiane da Silva Araújo – (Examinadora Externo)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – IFMA



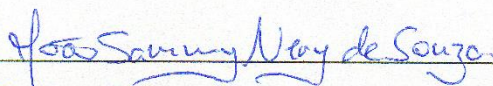
Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior – (Examinador Externo)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI



Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima – (Examinador Interno)

Programa de Pós-Graduação em Química – UFPI



Prof. Dr. João Sammy Nery de Souza – (Examinador Interno)

Departamento de Química – UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Hélder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

Prof. Dr. Edmilson Miranda de Moura

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Prof. Dr. José Milton Elias de Matos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Francisco Miguel e Maria França (*in memoriam*), aos meus irmãos, e especialmente a minha esposa, Cristiany Marinho, e meus filhos, Felipe Gabriel e Pedro Miguel.

AGRADECIMENTOS

- ↪ Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por sempre estar ao meu lado e por ter permitido que eu chegasse até aqui, sempre me dando força e coragem para que eu pudesse atingir meus objetivos;
- ↪ A todos os membros de minha família;
- ↪ A Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa, pela orientação, paciência, constantes incentivos e por ter acreditado nesse projeto;
- ↪ Aos meus queridos filhos, Felipe Gabriel e Pedro Miguel, por deixarem minha vida mais alegre e mais leve no dia-a-dia;
- ↪ A minha esposa, Cristiany, pelo amor, apoio, incentivo e companheirismo;
- ↪ A Universidade Federal do Piauí, pelos recursos disponibilizados durante a minha vida acadêmica;
- ↪ Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA) pela dispensa concedida para fazer este doutorado;
- ↪ Aos laboratórios da UFPI: Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental – LPNNEX, Laboratório de Produtos Naturais – LPN, Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV, Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada – LMMA, Laboratório de RMN – LAUREMN, Laboratório de Pesquisas em Cosméticos e Medicamentos – LAPCOM, Laboratório de Genética Toxicológica – LAPGENIC, Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo Medicamentos e Correlatos (LITTE), Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária – LAPES.
- ↪ Aos professores Dr. Sidney Gonçalo de Lima e Dr. Francisco das Chagas Alves de Lima pelas contribuições dadas no Exame de Qualificação;
- ↪ Aos professores: Dra. Lidiane da Silva Araújo; Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior; Dr. João Sammy Nery de Souza e Dr. Francisco das Chagas Alves Lima por, gentilmente, se disponibilizarem a participar como membros da banca de defesa deste trabalho;
- ↪ Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Química – UFPI;
- ↪ A senhora Gislene e a senhora Márcia, da coordenação do programa de Pós-Graduação em Química;
- ↪ A todos os colegas do Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental (LPNNEX) da UFPI;
- ↪ Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Química – UFPI;

- ↪ A todos aqueles que, de maneira direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho;
- ↪ A todos os amigos e parentes pela compreensão, carinho, amizade e, sobretudo por compreender a minha ausência em alguns momentos.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo”

(Nelson Mandela)

CAVALCANTE, A. N. **Elaboração e caracterização de um complexo de inclusão e testes de atividades farmacológicas a partir de constituinte que tem atividade anticolinesterásico isolado das sementes de *Platonia insignis* MART (bacurizeiro) [tese]**. Teresina: Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí; 2019.

RESUMO

Platonia insignis MART é uma planta pertencente à família Clusiaceae, popularmente conhecida como bacurizeiro. Extratos de suas sementes são bastante usados na medicina popular para o tratamento de queimaduras, doenças dermatológicas, diarreias e doenças inflamatórias. Possuindo também atividade antioxidante, apresentando, dessa forma, uma possível ação protetora contra o desenvolvimento de processos neurodegenerativos como a doença de Alzheimer (DA). DA está associada a déficits de neurotransmissores cerebrais, como acetilcolina, neurodrenalina e serotonina. O tratamento da DA consiste no restabelecimento da função colinérgica. Neste processo de restauração, a elevação dos níveis de neurotransmissores de acetilcolina pode ser útil para melhorar um dos sinais da doença. Acredita-se que a inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima chave na degradação da acetilcolina, aumente a concentração de acetilcolina nas sinapses. Do extrato hexânico das sementes da *P. insignis* foi isolada a substância, 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG), cujos testes *in vitro* apresentaram inibição significativa para AChE. Porém, ODG apresenta baixa solubilidade em água, a fim de aumentar a sua solubilidade foi preparado o complexo de inclusão (CI) entre ODG e β -ciclodextrina (β -CD). O propósito desse estudo foi preparar, caracterizar e avaliar a solubilidade e a taxa de dissolução do CI entre ODG e β -CD. O CI foi obtido por solubilização seguido de liofilização e caracterizado por espectroscopia no infravermelho (IV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H). Além disso, foram analisados a isoterma de solubilidade de fases e ensaios de dissolução. Os resultados de IV, DSC, TG, MEV, DRX e RMN ^1H sugeriram a formação do CI. De acordo com dados de RMN ^1H foi possível prever que a ODG foi encapsulada pelo lado mais largo da cavidade da β -CD. A isoterma de solubilidade permitiu determinar a constante de estabilidade aparente ($K = 339,38 \text{ L mol}^{-1}$), a eficiência de inclusão (EI = 57,82%) e a estequiometria molar (1:1). Portanto, o uso de ODG- β -CD pode efetivamente melhorar a solubilidade e a taxa de dissolução da ODG livre, sendo uma abordagem promissora para promover sua aplicação clínica. Adicionalmente foram avaliados os efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos de ODG frente a *Allium cepa*, bem como os efeitos antioxidantes *in vitro* frente à produção de radicais hidroxila, óxido nítrico e espécies reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS). No ensaio de *A. cepa* (0,002 – 0,2 mg mL $^{-1}$), ODG na maior concentração foi ligeiramente tóxico e citotóxico, contudo, em nenhuma das concentrações testadas, ODG revelou efeitos não mutagênicos. Observou-se que ODG (8,75 – 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$) reduz a produção de óxido nítrico em 41,6%, enquanto o ácido ascórbico (AA), padrão antioxidante, reduziu em 54,14%. ODG (15,625 – 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) promoveu a remoção do radical hidroxila em 35,69% na maior concentração e foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida pelo 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH), inibindo a quantidade de TBARS, em até 65%, resultado próximo ao obtido com AA (64%). Assim, ODG reduziu moderadamente os níveis de radicais hidroxila e óxido nítrico e inibiu significativamente os níveis de TBARS *in vitro*.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Atividade antioxidante. Solubilidade. *Allium cepa*. Radicais livres.

CAVALCANTE, A. N. **Elaboration and characterization of a complex of inclusion and tests of pharmacological activities from a constituent that has anticholinesterase activity isolated from the seeds of *Platonia insignis* MART (bacurizeiro) [thesis]**. Teresina: Post-Graduation Program in Chemistry, Federal University of Piauí; 2019.

ABSTRACT

Platonia insignis MART is a plant belonging to the family Clusiaceae, popularly known as bacurizeiro. Extracts of their seeds are widely used in folk medicine for the treatment of burns, dermatological diseases, diarrhea and inflammatory diseases. Also possessing antioxidant activity, thus presenting a possible protective action against the development of neurodegenerative processes such as Alzheimer's disease (AD). AD is associated with deficits of brain neurotransmitters such as acetylcholine, neurodrenaline and serotonin. The treatment of AD consists in the reestablishment of cholinergic function. In this restorative process, elevation of acetylcholine neurotransmitter levels may be useful to ameliorate one of the signs of the disease. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE), a key enzyme in the degradation of acetylcholine, is believed to increase the concentration of acetylcholine at the synapses. From the hexanic extract of *P. insignis* seeds, 2-oleyl-1,3-dipalmitoyl-glycerol (ODG) was isolated, whose *in vitro* tests showed significant inhibition of AChE. However, ODG has low solubility in water, in order to increase its solubility, the inclusion complex (IC) between ODG and β -cyclodextrin (β -CD) was prepared. The purpose of this study was to prepare, characterize and evaluate the solubility and dissolution rate of IC between ODG and β -CD. The IC was obtained by solubilization followed by lyophilization and characterized by infrared spectroscopy (IR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and nuclear magnetic resonance of hydrogen (^1H NMR). In addition, the phase solubility isotherm and dissolution tests were analyzed. The results of IR, DSC, TG, SEM, XRD and ^1H NMR suggested the formation of IC. According to ^1H NMR data it was possible to predict that ODG was encapsulated by the wider side of the β -CD cavity. The solubility isotherm allowed to determine the apparent stability constant ($K = 339.38 \text{ L mol}^{-1}$), the inclusion efficiency ($\text{EI} = 57.82\%$) and the molar stoichiometry (1:1). Therefore, the use of ODG- β -CD can effectively improve the solubility and dissolution rate of free ODG, being a promising approach to promote its clinical application. In addition, the toxic, cytotoxic and mutagenic effects of ODG against *Allium cepa*, as well as the *in vitro* antioxidant effects against the production of hydroxyl radicals, nitric oxide and thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were evaluated. In the assay of *A. cepa* ($0.002 - 0.2 \text{ mg mL}^{-1}$), ODG at the highest concentration was slightly toxic and cytotoxic, however, at none of the concentrations tested, ODG revealed non-mutagenic effects. ODG ($8.75 - 140 \mu\text{g mL}^{-1}$) was found to reduce nitric oxide production by 41.6%, while antioxidant standard ascorbic acid (AA) reduced by 54.14%. ODG ($15.625 - 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) promoted the removal of the hydroxyl radical in 35.69% in the highest concentration and was able to prevent lipid peroxidation induced by 2,2'-azobis-2-amidinopropane (AAPH), inhibiting the amount of TBARS in up to 65%, a result close to that obtained with AA (64%). Thus, ODG moderately reduced hydroxyl and nitric oxide radical levels and significantly inhibited TBARS levels *in vitro*.

Keywords: Acetylcholinesterase. Antioxidant activity. Solubility. *Allium cepa*. Free radicals.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1:	Atividades biológicas das partes do fruto do bacurizeiro.....	42
Tabela 1.2:	Propriedades farmacológicas dos principais compostos bioativos de <i>Platonia insignis</i>	45
Tabela 1.3:	Principais tipos de espécies reativas.....	50
Tabela 1.4:	Propriedades físico-química das ciclodextrinas naturais.....	69

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1:	Deslocamentos químicos (δ) de hidrogênios de β -CD na ausência e na presença de ODG.....	141
--------------------	---	-----

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1:	Resultados dos testes de toxicidade contra <i>A. salina</i> . n = 6 em triplicata.....	164
Tabela 3.2:	Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica do composto ODG em células meristemáticas de <i>A. cepa</i>	166
Tabela 3.3:	Resultados dos testes de toxicidade contra <i>A. aegypti</i> . n = 6 em triplicata.....	167
Tabela 3.5:	CE ₅₀ do potencial antioxidante <i>in vitro</i> da ODG na produção de TBARS, teor de radical hidroxila (OH \cdot) e formação de nitrito.....	176

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1:	Frutos e sementes de <i>P. insignis</i>	38
Figura 1.2:	Estrutura química do par tautomérico garcinielliptona (1/1a).....	40
Figura 1.3:	Estrutura química do 1,3-distearoil-2-oleil-glicerol (TG1).....	41
Figura 1.4:	Antioxidantes sintéticos derivados de fenóis.....	53
Figura 1.5:	Antioxidantes naturais: A (α -tocoferol); B (β -tocoferol); C (γ -tocoferol) e D (δ -tocoferol).....	54
Figura 1.6:	Mecanismos que levam a perda do sistema neuronal.....	57
Figura 1.7:	Diferença entre células normais e células com Alzheimer.....	61
Figura 1.8:	Demonstração em corte de um cérebro saudável e com Alzheimer.....	62
Figura 1.9:	Síntese e hidrólise da acetilcolina.....	63
Figura 1.10:	Desenho esquemático da acetilcolinesterase.....	63
Figura 1.11:	Inibidores comercializados da acetilcolinesterase: (I) galantamina, (II) tacrina, (III) rivastigmina e (IV) fisostigmina.....	64
Figura 1.12:	Formação do ânion amarelo do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a tiocolina e o íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato.....	66
Figura 1.13:	Molécula da α -D-glucopirranose na conformação cadeira com as posições dos carbonos 1 e 4 indicadas pelas setas.....	67
Figura 1.14:	Estruturas das ciclodextrinas naturais: α -CD; β -CD e γ -CD.....	67
Figura 1.15:	Estruturas tronco-cônicas das ciclodextrinas naturais.....	68
Figura 1.16:	Sítios de modificação mais frequentes na β -CD.....	72
Figura 1.17:	Possível formação de complexo de inclusão entre um fármaco com CD.....	73
Figura 1.18:	Formação de complexos CD-fármaco com estequiometria 1:1 (A) e 2:1 (B).....	74
Figura 1.19:	Esquema da formação de um complexo de inclusão fármaco:ciclodextrina com uma estequiometria de 1:1 e equação geral do equilíbrio descrito.....	75
Figura 1.20:	Tipos de diagramas de solubilidade de fases obtidos a partir da complexação de fármacos com ciclodextrinas.....	76

CAPÍTULO 2

Figura 2.1:	Estrutura da substância 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG).....	101
Figura 2.2:	Representação esquemática da β -CD.....	102
Figura 2.3:	Extração das sementes com hexano em sistema Soxhlet.....	103
Figura 2.4:	Coluna filtrante do extrato hexânico em funil de decantação.....	104
Figura 2.5:	Cromatografia em coluna na obtenção do composto ODG.....	106
Figura 2.6:	Cromatografia em coluna da fração diclorometânico na obtenção do composto FT-B ₍₂₁₋₂₇₎	114
Figura 2.7:	Cromatografia em coluna delgada das frações 15 à 24 da coluna FT-A.....	115
Figura 2.8:	Cromatografia em coluna delgada das frações 12 à 35 da coluna FT-B.....	116
Figura 2.9:	Cromatografia em camada delgada da reunião das frações da coluna FT-B.....	116
Figura 2.10:	Espectro de RMN ¹ H da substância FT-B ₍₂₁₋₂₇₎ em solvente clorofórmio deuterado (CDCl ₃).....	118
Figura 2.11:	Espectro de RMN ¹³ C da substância FT-B ₍₂₁₋₂₇₎ em solvente clorofórmio deuterado (CDCl ₃).....	119
Figura 2.12:	DEPT 135 da substância FT-B ₍₂₁₋₂₇₎ em solvente clorofórmio deuterado (CDCl ₃).....	120
Figura 2.13:	Espectro ¹ H – ¹ H COSY da substância FT-B ₍₂₁₋₂₇₎ em solvente clorofórmio deuterado (CDCl ₃).....	121
Figura 2.14:	Espectro de IV da substância FT-B ₍₂₁₋₂₇₎ em pastilha de KBr.....	122
Figura 2.15:	Resultado positivo de inibição qualitativa da AChE para o composto ODG.....	123
Figura 2.16:	Porcentagem de inibição da AChE nas 5 concentrações testadas da substância ODG e da rivastigmina na concentração de 1,0 mg mL ⁻¹	125
Figura 2.17:	Gráfico de determinação da CI ₅₀ da substância ODG.....	126
Figura 2.18:	Leitura espectrofotométrica da ODG nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 μ g mL ⁻¹	127
Figura 2.19:	Perfil de dissolução do ODG, da mistura física (ODG/ β -CD) e do complexo de inclusão (ODG- β -CD).....	128

Figura 2.20:	Curvas de calibração do ODG obtidas através da espectroscopia de absorção no $\lambda = 225$ nm.....	129
Figura 2.21:	Diagrama de solubilidade de fases para o ODG em presença de concentrações crescente de β -CD determinada a temperatura ambiente.....	130
Figura 2.22:	Espectros de IV (a) ODG, (b) β -CD, (c) mistura física (ODG/ β -CD) e (d) complexo de inclusão (ODG- β -CD).....	133
Figura 2.23:	Difratogramas de (a) ODG, (b) β -CD, (c) mistura física (ODG/ β -CD e (d) complexo de inclusão (ODG- β -CD).....	135
Figura 2.24:	Microscopia eletrônica de varredura de (A) β -CD, (B) ODG, (C) mistura física (ODG/ β -CD) e (D) complexo de inclusão (ODG- β -CD).....	136
Figura 2.25:	Curvas termoanalíticas de TG e DTG referentes a, (A) β -CD, (B) ODG, (C) mistura física (ODG/ β -CD) e (D) complexo de inclusão (ODG- β -CD).....	139
Figura 2.26:	Curvas termoanalíticas de DSC referentes a, (a) ODG, (b) β -CD, (c) mistura física (ODG/ β -CD) e (d) complexo de inclusão (ODG- β -CD).....	139
Figura 2.27:	Espectros de RMN ^1H da β -CD (A) e do complexo de inclusão, ODG- β -CD, (B).....	142
Figura 2.28:	Possível modo de inclusão da molécula ODG na cavidade da β -CD.....	142

CAPÍTULO 3

Figura 3.1:	Estrutura química do 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG) obtido a partir das sementes de <i>Platonia insigninis</i>	158
Figura 3.2:	Mecanismo de reação para determinação dos radicais nitritos, segundo método de Griess.....	169
Figura 3.3:	Capacidade antioxidante da substância ODG e do controle positivo ácido ascórbico (AA), em diferentes concentrações (8,75 – 140 $\mu\text{g/mL}$), contra a produção do radical nitrito.....	170
Figura 3.4:	Determinação da CE_{50} da redução do radical nitrito para ODG (A) e AA (B).....	171
Figura 3.5:	Reações envolvidas na quantificação do malonaldeído.....	172

Figura 3.6:	Capacidade antioxidante da substância ODG e do ácido ascórbico (AA), em diferentes concentrações (15,625 – 250 µg/mL), contra a formação do radical hidroxila.....	173
Figura 3.7:	Determinação da CE ₅₀ de redução do radical hidroxila para ODG (A) e AA (B).....	174
Figura 3.8:	Capacidade antioxidante da substância ODG e do ácido ascórbico (AA) contra a produção de TBARS em diferentes concentrações (15,625 – 250 µg/mL).....	175
Figura 3.9:	Determinação da CE ₅₀ de redução de TBARS para ODG (A) e AA (B).....	176

LISTA DE QUADRO

CAPÍTULO 1

Quadro 1.1: Estruturas de compostos encontrados em <i>Platonia insignis</i>	46
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α-CD	Alfa-ciclodextrina
βA	Beta-amiloide
β-CD	Beta-ciclodextrina
γ-CD	Gama-ciclodextrina
ΔAbs	Varição da absorbância da amostra
®	Marca registrada
δ	Deslocamento químico
μg	Micrograma
μL	Microlitro
Å	Angstrom
AA	Ácido ascórbico
AAPH	Dihidrocloridrato de 2,2'-azobis-2-metilpropinamida
Abs	Absorbância
ABTS	2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico)
AC	Fração acetato de etila
a. C.	Antes de Cristo
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
ATCI	Iodeto de acetiltiocolina
BHA	3- <i>terc</i> -butil-4-metoxifenol
BHT	2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Colina acetiltransferase
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia de camada delgada
CD'S	Ciclodextrinas
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CE₅₀	Concentração eficiente média
Ce(SO₄)₂	Sulfato cérico

CF	Fração clorofórmica
CGTase	Enzima ciclodextrina- α -glicosiltransferase
CI	Complexo de inclusão
CI₅₀	Concentração inibitória média
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CoA	Coenzima A
COSY	CO rrelation S pectroscop Y
CN	Controle negativo
CP	Cromatografia em papel
CP	Controle positivo
CuSO₄.5H₂O	Sulfato de cobre penta hidratado
d	Dupleto ou dubleto
dd	Duplo dupleto
DA	Doença de Alzheimer
DL₅₀	Dose letal média
DM	Fração diclorometânico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DN	Doenças neurodegenerativas
D.P.	Desvio padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DRX	Difração de raios-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EI	Eficiência de inclusão
EM	Espectroscopia de massas
EO	Estresse oxidativo
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
FDA	Food and Drug Administration
FeSO₄	Sulfato de ferro II
FT-A	Coluna cromatográfica FT-A

FT-B	Coluna cromatográfica FT-B
FT-B₍₂₁₋₂₇₎	Composto obtido da reunião das frações 21 à 27 da coluna FT-B
GFC	Garcinielliptona FC
GPX	Glutathione peroxidase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HP-CD	Hidroxi-propil-CD
HPLC	High performance liquid chromatography
IM	Índice mitótico
IR	Infrared
IV	Infravermelho
K₂Cr₂O₇	Dicromato de potássio
K	Constante de estabilidade aparente
KBr	Brometo de potássio
kV	Kilovolt
L	Litro
LAPES	Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária
LAUREMN	Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear
LIMAV	Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados
LMMA	Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada
LPN	Laboratório de Produtos Naturais
LPNEX	Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental
m	Multiples
mA	Miliampere
MDA	Malonaldeído
ME	Fração metanólica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MHz	Mega hertz
mL	Mililitro
mMol/L	Milimol por litro
m/m	Razão massa/massa

m/v	Razão massa/volume
NaCl	Cloreto de sódio
NO·	Radical óxido nítrico
PG	Ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico-propil galato
PHGPX	Fosfolípídeo hidroxiperoxidase glutationa peroxidase
ppm	Partes por milhão
NPS	Nitroprussiato de sódio
ODG	2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol
ODG-β-CD	Complexo de inclusão entre ODG e β-CD
ODG/β-CD	Mistura física entre ODG e β-CD
OH·	Radical hidroxila
P.A.	Pureza analítica
pH	Potencial hidrogeniônico
Rf	Fator de retenção
RL	Radical livre
RMCD	Metil-CD randomizada
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
rpm	Rotação por minuto
s	Simpleto ou singleto
SB-CD	Sulfo-butil-éter-CD
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
t	Tripleto
TAC	Total de alterações cromossômicas
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico
TBHQ	<i>Terc</i> -butil-hidroquinona
TGA	Análise termogravimétrica
TG1	1,3-diestearoil-2-oleil-glicerol
TG	Termogravimetria
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tamanho das raízes

Trolox	Ácido 6-hidróxi-2,5,8,7-tetrametilcromano-2-carboxílico
TROPEN	Trópico Ecotonal do Nordeste
Tween 80	Monolato de polioxietilenosorbitano
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UV-vis	Ultravioleta e visível
v/v	Razão volume/volume

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	26
REFERÊNCIAS	28
OBJETIVOS	31
OBJETIVO GERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
CAPÍTULO 1	33
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	33
1.1 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE EXTRATOS E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Platonia insignis</i> MART. – UMA PERSPECTIVA PARA O DESENVOLVIMENTO DE FITOMEDICAMENTOS	34
1.1.1 Plantas medicinais	34
1.1.2 Família Clusiaceae	36
1.1.3 <i>Platonia insignis</i> MART	37
1.1.4 Propriedades farmacológicas de <i>Platonia insignis</i>	39
1.1.5 Composição química presentes em <i>Platonia insignis</i>	43
1.2 OS ANTIOXIDANTES E AS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	49
1.2.1 Introdução	49
1.2.2 Radicais livres	50
1.2.3 Os antioxidantes	51
1.2.4 Defesas proporcionadas pelos antioxidantes	54
1.2.4.1 Sistema enzimático.....	55
1.2.4.2 Sistema não-enzimático.....	55
1.2.5 Mecanismos de reparo	56
1.2.6 Doenças neurodegenerativas	56
1.2.7 Evidências do uso de antioxidantes em neurodegeneração	58
1.2.8 Doença de Alzheimer	60
1.3 ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	62
1.3.1 Inibidores da acetilcolinesterase	64
1.3.2 Método de Ellman na determinação da atividade da AChE	65

1.4 CICLODEXTRINAS (CD'S).....	66
1.4.1 Estrutura e propriedades físico-químicas das ciclodextrinas.....	68
1.4.2 Derivados das ciclodextrinas.....	71
1.5 COMPLEXO DE INCLUSÃO (CI).....	72
1.6 DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE FASES.....	75
1.7 TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	77
CAPÍTULO 2.....	97
ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE β -CICLODEXTRINA E O ANTICOLINESTERÁSICO 2-OLEIL-1,3-DIPALMITOIL-GLICEROL EXTRAÍDO DAS SEMENTES DE <i>Platonia insignis</i> MART.....	98
ABSTRACT.....	98
2.1 INTRODUÇÃO.....	99
2.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	103
2.2.1 Extração da banha da semente da espécie <i>Platonia insignis</i>	103
2.2.2 Preparação da coluna filtrante.....	104
2.2.3 Isolamento do composto 2-oleil-1,3-dimalpitoleil-glicerol (ODG).....	105
2.2.4 Elucidação estrutural da substância isolada FT-B ₍₂₁₋₂₇₎ a partir das sementes de <i>Platonia insignis</i>	107
2.2.4.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	107
2.2.4.2 Espectroscopia de infravermelho.....	108
2.2.5 Testes de inibição <i>in vitro</i> da acetilcolinesterase da substância isolada FT-B ₍₂₁₋₂₇₎	108
2.2.5.1 Ensaio <i>in vitro</i> qualitativo de inibição da acetilcolinesterase.....	108
2.2.5.2 Ensaio <i>in vitro</i> quantitativo de inibição da acetilcolinesterase.....	109
2.2.6 Elaboração da mistura física e do complexo de inclusão com β -ciclodextrina (β -CD).....	110
2.2.6.1 Preparação da mistura física (ODG/ β -CD).....	110
2.2.6.2 Preparação do complexo de inclusão (ODG- β -CD).....	110

2.2.7 Caracterização e análise físico-química da mistura física e do complexo de inclusão	111
2.2.7.1 Ressonância magnética nuclear.....	111
2.2.7.2 Espectroscopia de infravermelho (IV).....	111
2.2.7.3 Análises termogravimétrica (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	111
2.2.7.4 Análises de difração de raios X (DRX).....	112
2.2.7.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	112
2.2.7.6 Ensaio de dissolução.....	112
2.2.7.7 Estudos da isoterma de solubilidade de fases.....	113
2.2.8 Análises estatísticas	114
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
2.3.1 Obtenção do composto FT-B₍₂₁₋₂₇₎	114
2.3.2 Elucidação estrutural da substância isolada FT-B₍₂₁₋₂₇₎	117
2.3.3 Determinação <i>in vitro</i> da atividade anticolinesterásica da substância ODG	123
2.3.4 Ensaio de dissolução	126
2.3.5 Perfil de solubilidade de fases	128
2.3.6 Espectroscopia no infravermelho (IV)	131
2.3.7 Difração de raios X (DRX)	134
2.3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	135
2.3.9 Análises térmicas	137
2.3.10 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)	140
2.4 CONCLUSÃO	143
REFERÊNCIAS	143
CAPÍTULO 3	154
MODELOS ANTIOXIDANTES <i>IN VITRO</i>, TOXICIDADE, CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO 2-OLEIL-1,3-DIPALMITOIL-GLICEROL ISOLADO A PARTIR DO EXTRATO HEXÂNICO DAS SEMENTES DE <i>Platonia insignis</i> MART	155
ABSTRACT	155
3.1 INTRODUÇÃO	155

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	158
3.2.1 Reagentes e produtos químicos	158
3.2.2 Preparo das amostras	158
3.2.3 Ensaios de Toxicidade	159
3.2.3.1 Ensaio de letalidade de <i>Artemia salina</i>	159
3.2.3.2 Ensaio toxicogenético em <i>Allium cepa</i>	159
3.2.4 Avaliação da atividade larvicida do composto ODG frente as larvas do <i>Aedes aegypti</i>	160
3.2.5 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do composto ODG	160
3.2.5.1 Ensaio de inibição dos radicais de oxido nítrico (NO \cdot).....	160
3.2.5.2 Ensaio de inibição dos radicais hidroxilas (OH \cdot).....	161
3.2.5.3 Ensaio de peroxidação lipídica (TBARS).....	162
3.2.6 Análises estatísticas	163
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	164
3.3.1 Toxicidade contra <i>Artemia salina</i> do composto 2-oleil-1,3-dimalpitoil-glicerol	164
3.3.2 Testes de citotoxicidade frente a <i>Allium cepa</i> do composto 2-oleil-1,3-dimalpitoil-glicerol	165
3.3.3 Avaliação da atividade larvicida frente ao <i>Aedes aegypti</i>	167
3.3.4. Ensaio de inibição dos radicais de oxido nítrico (NO\cdot)	168
3.3.5 Ensaio de inibição dos radicais hidroxilas (OH\cdot)	171
3.3.6 Ensaio de peroxidação lipídica (TBARS)	175
3.4 CONCLUSÃO	177
REFERÊNCIAS	178
CONSIDERAÇÕES FINAIS	187
ANEXOS	189

INTRODUÇÃO

O uso cada vez mais frequente de plantas ou ervas com fins terapêuticos na cura ou na prevenção de diversas enfermidades tem tornado o extrativismo desses vegetais uma escolha indispensável na agricultura nacional e na medicina popular ou tradicional. Nesse contexto, estão as plantas medicinais que são utilizadas em comunidades tradicionais, como remédios caseiros, sendo consideradas as matérias-primas para fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos (LEÃO *et al.*, 2007). Dentre as plantas medicinais cultivadas, boa parte são espécies exóticas, contudo, muitas espécies de plantas nativas têm seu uso amplamente aplicado pela população, baseado em pesquisas químicas e farmacológicas, ou no conhecimento tradicional pela população (SIMÕES *et al.*, 2000).

De acordo com Lopes e colaboradores (2005) planta medicinal é toda planta que ao ser administrada no organismo por qualquer via ou forma, exerça alguma ação terapêutica e que o tratamento feito com uso de plantas medicinais é denominado de fitoterapia. Os fitoterápicos são os medicamentos produzidos a partir dessas plantas e que são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim, como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Dessa forma, a fitoterapia é caracterizada pelo tratamento com o uso de plantas medicinais e suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de princípios ativos isolados (SCHENKEL *et al.*, 2003) permitindo assim que o ser humano se relacione com o ambiente buscando sempre conhecer o poder da natureza para ajudar o organismo na melhora de algumas funções fisiológicas como: restauração da imunidade enfraquecida, promover a desintoxicação e o rejuvenescimento (FRANÇA *et al.*, 2008) dentre outros benefícios.

Desde os primórdios da civilização, as espécies vegetais têm sido uma fonte de recurso ao alcance do homem, permitindo o acúmulo e o aprendizado baseado na experiência de informações sobre o ambiente através da observação constante dos fenômenos naturais com a finalidade de aprimorar as condições de alimentação e, sobretudo, na busca permanente da cura de muitas doenças, demonstrando assim uma estreita relação entre o uso de plantas medicinais e a sua própria evolução. Índícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontrados nas civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas mais remotas utilizadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças, servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (ANDRADE *et al.*, 2007).

Existem evidências do uso de extratos vegetais como remédios entre 4500 e 1600 a. C. (MIGUEL; MIGUEL, 2000; ROKAYA *et al.*, 2010; ALLABI *et al.*, 2011). Poderes milagrosos

INTRODUÇÃO

eram atribuídos aos feiticeiros, pajés, xamãs, magos, curandeiros, dentre outros, que possuíam a chamada – sabedoria sobre o poder das drogas e/ou venenos. Através desse método tradicional tornou-se possível o acúmulo de conhecimento sobre o uso de plantas medicinais com fins de prevenção, tratamento e cura de diversos males; servindo de referencial e fonte inesgotável de novos compostos na busca de fitomedicamentos (CORRÊA *et al.*, 2003, LEONTI *et al.*, 2010).

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos, na sua grande maioria, por plantas e extratos vegetais, sendo que os últimos representavam os medicamentos caseiros mais utilizados naquela época. O emprego desses extratos com fins terapêuticos era ancorado no conhecimento popular e científico. Nessa perspectiva, as plantas de caráter medicinal eram empregadas de variados modos e formas tais como: fornecedoras de substâncias ativas isoladas, como extratos totais, como extratos purificados ou selecionados, como droga íntegra na preparação de infusos ou decoctos (SIMÕES *et al.*, 2000). Assim, os recursos terapêuticos disponíveis até o século XIX eram exclusivamente oriundos de plantas medicinais e extratos vegetais. No século XX, porém, iniciou-se a tendência de isolar os princípios ativos, ou seja, substâncias que tem atividades farmacológicas bastantes interessantes na terapia de diversas enfermidades.

Nesse sentido, o Brasil por possuir a maior e mais rica biodiversidade do planeta, destaca-se por ser um país com maior potencialidade para pesquisa com espécies vegetais (NASCIMENTO, 2013). Segundo alguns pesquisadores, como Noldin e colaboradores (2006) e Nualkaew e colaboradores (2012), uma das famílias de plantas medicinais que vem despertando um amplo interesse na comunidade científica devido, sobretudo, as promissoras propriedades químicas e biológicas é a família Clusiaceae. Contemplando aproximadamente 1000 espécies pertencentes a 47 gêneros, distribuídas em regiões de clima tropicais e subtropicais do planeta e um gênero que alcança as regiões de clima temperado. Sendo que em nove desses gêneros, cerca de 90 espécies os frutos são comestíveis (COSTA JÚNIOR, 2011a; BARROSO *et al.*, 2002). Além disso, muitas destas espécies são comumente empregadas na medicina popular para tratamento de várias doenças tais como: dores, infecções, inflamações e no combate a úlceras (NOLDIN *et al.*, 2006), dentre outras.

As plantas do Nordeste do Brasil apresentam grande potencial terapêutico e muitas espécies já vem sendo descritas como fitoterápicas. O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.), da família Clusiaceae, é uma planta bastante consumida, no Nordeste do Brasil, em doces e sorvetes. *P. insignis* é uma espécie madeireira e frutífera nativa da Amazônia oriental brasileira, ocorre espontaneamente em todos os estados da Região Norte do Brasil e no Mato Grosso, Maranhão e Piauí (CAVALCANTE, 1996). Os frutos dessa espécie têm grande aceitação nas

INTRODUÇÃO

áreas de ocorrência natural da espécie, principalmente no Estado do Pará, que se constitui no maior produtor e principal consumidor. Estimativas indicam que somente na cidade de Belém-PA, são comercializados, anualmente, sete milhões de frutos (SHANLEY; MEDINA, 2005).

O óleo das sementes de *P. insignis* é usado para fazer sabão, tratar doenças de pele e fazer remédios cicatrizantes para ferimentos de animais e antiinflamatório. O látex, de coloração amarelo, extraído da árvore em algumas regiões é comumente utilizado para o tratamento de eczemas, vírus do herpes e outros problemas de pele (SHANLEY; MEDINA, 2005).

Nessa perspectiva, este trabalho foi dividido em 3 capítulos estruturados da seguinte forma. No capítulo 1, foi abordado a fundamentação teórica, onde na primeira parte, foram mostradas algumas informações sobre a espécie *P. insignis* bem como sua importância econômica, além disso, fez-se um apanhado geral sobre as propriedades biológico-farmacológicas, assim como, os principais constituintes encontrados nesta espécie vegetal. Na segunda parte deste capítulo, foram abordados os antioxidantes e as doenças neurodegenerativas, enquanto que, na parte final da fundamentação teórica, foi explorado um pouco sobre as ciclodextrinas e complexo de inclusão. No capítulo 2, foi abordado o artigo científico, elaboração e caracterização do complexo de inclusão entre β -ciclodextrina e o anticolinesterásico 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol extraído das sementes de *P. insignis*, o qual foi publicado na Revista Journal of Molecular Structure. No capítulo 3, foi abordado o artigo científico intitulado, toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e modelos antioxidantes *in vitro* do 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol isolado do extrato hexânico das sementes de *P. insignis*, submetido à Revista Toxicology Reports.

REFERÊNCIAS

ALLABI, A. C.; BUSIA, K., EKANMIAN, V.; BAKIONO, F. The use of medicinal plants in self-care in the Agonlin region of Benin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 234-243, 2011.

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.

INTRODUÇÃO

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil Minas Gerais: Viçosa**, 309 p. 2002.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6ed. Belém:CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 279 p. (Coleção Adolpho Ducke), 1996.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L.E. **Plantas Medicinais: Do cultivo à terapêutica-Contém formulação e modo de preparo de cosméticos**. Petrópolis: Vozes. 6. Petrópolis-RJ, 103 p. 2003.

COSTA-JÚNIOR, J. S. **Análise Fitoquímica, Farmacológica e toxicológica das sementes de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri)**, Tese (Doutorado em Genética e Toxicologia Aplicada). Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil, 2011a.

FRANÇA, I. S. X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

LEÃO, R.B.A.; FERREIRA, M.R.C.; JARDIM, M.A.G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2007.

LEONTI, M.; CABRAS, S.; WECKERLEC, C. S.; SOLINAS, M. N; CASU, L. The causal dependence of present plant knowledge on herbals – Contemporary medicinal plant use in Campania (Italy) compared to Matthioli (1568). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 379-391, 2011.

LOPES, C.R. et al. **Folhas de chá**. Viçosa: UFV, 2005.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. 1ª Ed. Robe editorial, 2000.

NASCIMENTO, J. L. **Complexo de inclusão do extrato hexânico de *Platonia insignis* Mart e β -ciclodextrina: caracterização e avaliação das atividades gastroprotetora e**

INTRODUÇÃO

antioxidante *in vitro*. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 137 p. 2013.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 549-554, 2006.

NUALKAEW, N.; MORITA, H.; SHIMOKAWA, Y.; KINJO, K.; KUSHIRO, T.; DEEKNAMKUL, W.; EBIZUKA, Y.; ABE, I. Benzophenone Synthase from *Garcinia Mangostana* L. Pericarps. **Phytochemistry**, v. 77, p. 60-69, 2012.

ROKAYA, M. B.; MÜNZBERGOVÁ, Z.; TIMSINA, B. Ethnobotanical study of medicinal plants from the Humla district of western Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 485-504, 2010.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M.O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2003.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Pará: Belém. p. 54, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ed. Porto Alegre/Florianópolis. 221-320, p. 2000.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Elaborar e caracterizar complexo de inclusão entre substância extraída das sementes de *P. insignis* que com atividade anticolinesterásica com o carreador beta-ciclodextrina e testar propriedades farmacológicas da substância isolada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar constituinte químico a partir dos extratos das sementes do bacurizeiro (*P. insignis*) por técnicas como cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada;
- ✓ Monitorar as frações dos extratos das sementes de *P. insignis* frente à acetilcolinesterase (AChE);
- ✓ Elucidar a fórmula estrutural da substância isolada através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e espectroscopia de infravermelho (IV);
- ✓ Testar os constituintes isolados das sementes de *P. insignis* frente à acetilcolinesterase (AChE);
- ✓ Determinar quantitativamente a inibição da AChE no composto obtido;
- ✓ Determinar o potencial antioxidante *in vitro* do composto isolado das sementes de *P. insignis*;
- ✓ Analisar a toxicidade da substância isolada frente *Artemia salina*;
- ✓ Avaliar os efeitos de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade da substância isolada frente a *Allium cepa*;
- ✓ Avaliar a atividade larvicida do composto obtido frente as larvas do *Aedes aegypti*;
- ✓ Elaborar complexo de inclusão a partir da substância isolada das sementes de *P. insignis* que seja anticolinesterásica com excipiente β -ciclodextrina;
- ✓ Caracterizar o complexo de inclusão através de análises termogravimétrica (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho (IV), difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H);

OBJETIVOS

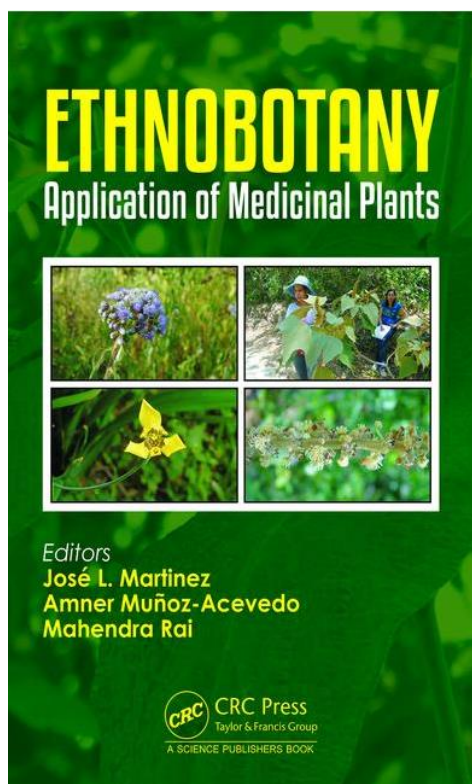
- ✓ Avaliar as propriedades de dissolução/liberação do composto anticolinesterásico obtido e de seu complexo de inclusão;
- ✓ Estudar o perfil de solubilidade de fases da substância obtida a partir das sementes de *P. insignis* e do complexo de inclusão;
- ✓ Determinar a constante de estabilidade aparente, a estequiometria e a eficiência de inclusão do complexo;
- ✓ Analisar a viabilidade do complexo elaborado ser útil no desenvolvimento de um agente fitoterápico para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE EXTRATOS E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Platonia insignis* MART. – UMA PERSPECTIVA PARA O DESENVOLVIMENTO DE FITOMEDICAMENTOS

(Capítulo 16 do livro **ETHNOBOTANY Application of Medicinal Plants** da editora **CRC Press Taylor & Francis Group**)



Pharmacological Properties of Extracts and Compounds Isolated from Platonia insignis Mart. 273

16

Pharmacological Properties of Extracts and Compounds Isolated from *Platonia insignis* Mart.—A Perspective for Developing Phytomedicines

Antonio do Nascimento Cavalcante,^{1,2} Chistiane Mendes Feitosa,^{1,3,*} Layana Karine Farias Lima,³ Ronaldo dos Santos Sousa Júnior¹ and Ana Gabriela Sousa Alencar¹

1.1.1 Plantas medicinais

A OMS (Organização Mundial de Saúde) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2005; CORP; PENDRY, 2013). A definição de acordo com Lopes e colaboradores (2005) é toda planta que administrada ao homem ou animal, por qualquer via ou forma, exerça alguma ação terapêutica. O tratamento feito com uso de plantas medicinais é denominado de fitoterapia.

O uso de produtos naturais, provenientes principalmente da flora, com fins medicinais nasceu com o início da civilização. Indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontradas nas civilizações mais remotas, esta prática foi considerada uma das mais antigas utilizada pela humanidade para cura, prevenção e tratamento de diversas enfermidades,

servindo, dessa forma, como uma potencial fonte de compostos biologicamente ativos (ANDRADE *et al.*, 2007). Segundo Moraes e Santana (2001) as plantas medicinais representavam as mais remotas “armas” empregadas pelo homem no tratamento de doenças de todos os tipos, ou seja, a utilização de plantas da prevenção ou na cura de doenças é um costume que sempre existiu na história da humanidade.

O conhecimento sobre plantas medicinais representava, muitas vezes, o único recurso com fins terapêuticos de muitas comunidades e grupos étnicos. As observações populares sobre a utilização e a eficácia de plantas medicinais de todo mundo, mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas, dessa forma, as informações terapêuticas adquiridas durante muitos séculos (MACIEL *et al.*, 2002). Helfand e Cowen (1990) apontam que existem vários registros sobre a utilização das plantas no tratamento de doenças desde 4.000 a. C.

Segundo Araújo e colaboradores (2007) o conhecimento sobre as plantas de caráter medicinal sempre acompanhou a evolução da humanidade através dos tempos onde civilizações primitivas se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, outras dotadas de toxicidade em graus variados que, ao serem experimentadas no combate às doenças, revelaram, ainda que empiricamente, a sua potencial propriedade de cura. Toda essa informação foi sendo, de início, transmitida oralmente às gerações posteriores e depois, com o aparecimento da escrita, passou a ser compilada e guardada como um tesouro precioso.

Até o século XIX os recursos terapêuticos eram compostos predominantemente por plantas e extratos vegetais, isto é, as plantas medicinais e seus extratos constituíam a maioria dos medicamentos, que naquela época, pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular (SCHENKEL *et al.*, 2003).

Embora houve grande avanço na medicina a partir da segunda metade do século XX, as plantas ainda apresentam uma grande contribuição para a manutenção da saúde e alívio às enfermidades em países em desenvolvimento (SOUZA; FELFILI, 2006). Entre os principais motivos, encontram-se as condições de pobreza e a falta de acesso aos medicamentos, associados à fácil obtenção e tradição do uso de plantas com fins medicinais (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005). A Organização Mundial de Saúde divulgou, no início da década de 1990, que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam do uso das plantas medicinais como única forma de terem acessos aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2005).

Essa cultura do uso de plantas medicinais tem despertado interesse de pesquisadores, em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, tais como, botânica, farmacologia e

fitoquímica, que em conjunto enriquecem os conhecimentos sobre a flora mundial. Dessa forma, diversas abordagens para a seleção de espécies vegetais têm sido apresentadas na literatura, dentre estas abordagens, as que despertaram maiores interesses são: a) abordagem randômica – que corresponde a escolha da planta sem qualquer critério, tendo neste caso, como fator crucial a disponibilidade da espécie vegetal; b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética – neste caso, a seleção da espécie está diretamente correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família e c) abordagem etnofarmacológica – onde a seleção da espécie se dá de acordo com o uso terapêutico, evidenciado por um determinado grupo étnico. As probabilidades de novas descobertas de substâncias inéditas, bioativas ou não, é, sem dúvida, maior na seleção randômica. A seleção etnofarmacológica, no entanto, favorece com maior probabilidade a descoberta de novas substâncias bioativas (MACIEL *et al.*, 2002; BOUDJELAL *et al.*, 2013).

Nesse panorama nota-se um crescente interesse na utilização e pesquisa de plantas medicinais com fins terapêuticos, aliadas à boa aceitabilidade destes produtos no mercado farmacêutico e as altas cifras que circundam a comercialização de fitomedicamentos, observada nas últimas décadas (NOLDIN *et al.*, 2006). Uma das famílias de plantas medicinais é a família Clusiaceae.

1.1.2 Família Clusiaceae

O Brasil, por deter a maior e mais rica biodiversidade do planeta, é o país que possui uma das maiores potencialidades para pesquisa com espécies vegetais. Uma das famílias de plantas pertencente a esta biodiversidade e que vem despertando grande interesse na comunidade científica devido, sobretudo, aos promissores resultados químicos e biológicos é a família Clusiaceae (NOLDIN *et al.*, 2006; MULHOLLAND *et al.*, 2013).

A família Clusiaceae engloba em torno de 47 gêneros e um pouco mais 1000 espécies distribuídas, sobretudo, em regiões de clima tropical e subtropical do planeta. Possuindo, também, um gênero encontrado em regiões de clima temperado. Em nove desses gêneros, cerca de 90 espécies são de plantas cujos seus frutos são comestíveis (BARROSO *et al.*, 2002; COSTA JÚNIOR, 2011a). Muitas destas espécies são empregadas na medicina popular para tratar danos como dor, processos infecciosos, inflamatórios e úlceras (NOLDIN *et al.*, 2006).

As plantas pertencentes a esta família possuem metabólitos secundários com importante atividade biológica. Clusiaceae engloba árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras, produtos químicos de interesse farmacêutico e

tintas (LUSTOSA, 2012). Pesquisas relacionadas sobre a composição química das plantas desta família apontam que elas são ricas em xantonas e benzofenonas poliisopreniladas que foram isolados não só a partir das resinas, mas também, em outras partes da planta (PICCINELLI *et al.*, 2009; COSTA JUNIOR, 2011a). Dentre as atividades biológicas conhecidas apresentam atividade antidepressiva, antioxidante, antifúngica, anti-HIV e antibacteriana.

Estudos também mostram que as plantas pertencentes a família Clusiaceae consistem principalmente de cumarinas, xantonas, esteróides, triterpenos e flavonoides. Esta gama de substâncias naturais tem despertado um crescente interesse de muitos pesquisadores. Muitos destes metabólitos são dotados de importantes atividades biológicas, tais como, atividade antidepressiva, antioxidante, antifúngica, citotóxica, anti-HIV e antibacteriana (MONACHE *et al.*, 1988; GUSTAFSON *et al.*, 1992; NOLDIN *et al.*, 2006; COSTA JÚNIOR, 2011a).

1.1.3 *Platonia insignis* MART

O bacurizeiro é uma planta que pertence à família Clusiaceae, subfamília *Clusioideae*, gênero *Platonia* e espécie *Platonia insignis* Mart. (BRAGA, 1976). A terminologia *Platonia* é um atributo a Platão, filósofo grego, e *insignis*, significa notável, insigne, importante, grande, ou seja, aquilo que chama bastante atenção, em referência a estrutura física e à utilidade da planta, bem como, ao tamanho, sabor e aroma do fruto (BARROSO *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2007).

O bacurizeiro é uma árvore frutífera de grande poste, com altura variando de 15 a 25 metros e possuindo diâmetro de até 100 centímetros (CAVALCANTE, 1988). Esta árvore é oriunda da região amazônica do Brasil e Guiana, mas também é encontrada na Colômbia e no Paraguai, sempre ocorrendo em áreas abertas de vegetação rasteira, clareiras e, principalmente, na vegetação secundária, sendo raramente encontrada em floresta primária densa (CAVALCANTE, 1988; MOURÃO; BELTRATI, 1995; CHITARRA; CHITARRA, 2005; FONTENELE *et al.*, 2010;). No Brasil, o centro de disseminação é o Estado do Pará, onde é encontrada ampla variação de forma e tamanho de frutos, rendimento e qualidade de polpa, além de outras características de interesse econômico; podendo também ser encontrado nos estados do Maranhão, Mato Grosso, Piauí e Goiás (FERREIRA *et al.*, 1987; SILVA; DONATO, 1993; VILLACHICA *et al.*, 1996; AGUIAR *et al.*, 2008). No estado do Piauí, o bacurizeiro encontra-se em terrenos limitados ao Norte pelos municípios de Murici dos Portelas, Amarante e Palmeirais. É vulgarmente conhecido por “bacuri”, “bacuri-açu”, “pakoori”, e “*wild mamme aple*” na Guiana, “*pakoelie*” e “*geelhart*” no Suriname, “*parcori*” na Guiana Francesa e “*matazona*” no Equador (MOURÃO; BELTRATI, 1995).

O bacuri é um fruto grande, arredondado, com casca grossa possuindo coloração amarelada como pode ser observado na Figura 1.1. Dentro da casca contém a polpa, de coloração esbranquiçada, sendo viscosa apresentando odores e sabores bastante agradáveis (FONTENELE *et al.*, 2010). O fruto apresenta grande potencial, tanto sob o ponto de vista do seu processamento industrial, na preparação de sorvetes, cremes, refrescos, compotas e geleias; como para o consumo *in natura* (SILVA *et al.*, 2010). Quando está em processo de maturação, ele exala um perfume suave e fragante, bastante rico em terpenos (ALVES; JENNINGS, 1979).

Figura 1.1: Frutos e sementes de *P. insignis*.



Fonte: Arquivo pessoal.

A quantidade de sementes por fruto, em geral, varia de uma a cinco, com predominância de duas a quatro sementes (VILLACHICA *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 1998). Em casos atípicos são encontrados frutos contendo até seis sementes (MOURÃO, 1992) ou ainda em outros casos sem a presença delas (CALZAVARA, 1970). De acordo com Teixeira e colaboradores (2005), o bacuri é um fruto não-climatérico, ou seja, só amadurece quando estão vinculados à planta e, na maior parte das árvores, os frutos caem quando estão maduros, de modo que a colheita desses frutos consiste em recolhê-los do solo (FAO, 1987). A expressão “bacuri” é de origem tupi que significa — ba: “cair” e — curi: “logo”, ou seja, o que cai assim que amadurece, indicando dessa forma que atingiu a maturação plena. Após esta fase eles não melhoram suas características sensoriais e nutricionais, embora um leve amolecimento e a perda de coloração verde possam ser notados (NAGY *et al.*, 1990; SOUZA *et al.*, 2001).

A polpa tem sabor e odor bastante agradáveis, tem grande aceitação popular, tanto na forma “*in natura*” quanto no preparo de doces, tortas, compotas, sucos, geleias e sorvetes. A

casca também pode ser usada para fabricação de doces, cremes e sorvetes, aumentando o rendimento do fruto e consequentemente agregando valores. Esse processo deve ocorrer após a separação da resina existente nessa parte do fruto (AGUIAR, 2006). A procura cada vez mais crescente pelo fruto tem estimulado produtores a estabelecer áreas de cultivo. As sementes do bacuri não tem utilidade na alimentação, porém, podem ser usadas na produção de sabão ou produção da banha de bacuri. O processo de extração do óleo ocorre com grande dificuldade uma vez que as sementes são colocadas de molho em água por um longo período e depois são fervidas, sendo o óleo retirado da superfície da água fervente. A manteiga de bacuri dá um tom dourado à pele, em poucos minutos após sua aplicação, ela é absorvida e a pele fica com um toque aveludado, além de tirar manchas e diminuir cicatrizes (FERREIRA, 2008; MORAES; GUTJAHR, 2009; COSTA JÚNIOR, 2011a).

1.1.4 Propriedades farmacológicas de *Platonia insignis*

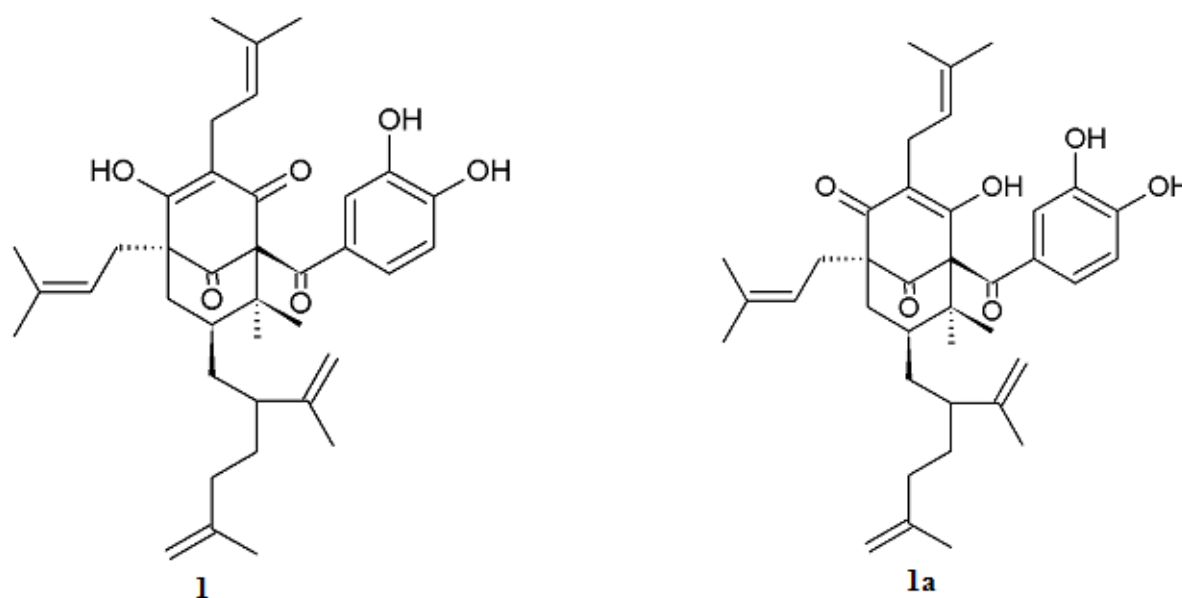
Espécies pertencentes à família Clusiaceae, como *P. insignis*, são importantes plantas medicinais bastante utilizadas na medicina popular brasileira, principalmente, para o tratamento de eczemas, herpes, doenças gastrointestinais, dermatite, esquistossomose, leishmaniose e malária. Estudos envolvendo as propriedades biológico-farmacológicas dessa espécie podem ser observados na literatura, sendo que, a maior parte desses estudos se concentram, sobretudo, nos extratos vegetais de suas sementes. Os extratos vegetais têm demonstrado atividade farmacológica importante como: antiinflamatória, antimalária, anti-hipertensiva, antidiabética, imunomoduladora-respiratória, antiviral, antitumoral, antidepressivo, antialérgica, efeitos antimutagênico e antioxidante (BILANDA *et al.*, 2010; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013a). Ademais estes extratos são bastante utilizados na medicina popular para tratamento de diversas doenças tais como: diarreia, problema de pele, dores de ouvido, picadas de aranhas e cobras, reumatismos, artrites e ainda como cicatrizante (MORAES; GUTJAHR, 2009; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013a; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013b).

A “banha de bacuri” obtida do óleo das sementes comumente é usada na medicina popular como cicatrizante de queimaduras e no tratamento de doenças dermatológicas (AGRA *et al.*, 2007). Em ensaios *in vivo* a banha demonstrou potencial para acelerar a cicatrização de feridas de pele em ratos (SANTOS *et al.*, 2013; FEITOSA *et al.*, 2016). Popularmente a decocção de sementes é usada para tratar a diarreia, enquanto o óleo de semente é usado tanto contra picadas de aranha ou de cobra, quanto no tratamento de problemas de pele, otite, reumatismo e artrite (AGRA *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2014)

Estudos farmacológicos demonstraram que a fração de acetato de etila das sementes de *P. insignis* possuiu potencial atividade anticonvulsivante em ratos induzida por pilocarpina (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2011b).

Através da propriedade, leishmanicida, dos extratos das sementes de *P. insignis* deu origem a um pedido de patente (CITÓ *et al.*, 2011), baseada nas atividades dos extratos hexânicos, diclorometano e acetato de etila, e sobretudo nas substâncias tautoméricas isoladas, garcinielliptona (Figura 1.2), as quais apresentaram uma potencial atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013a; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013b).

Figura 1.2: Estrutura química do par tautomérico garcinielliptona (1/1a).



Fonte: NASCIMENTO, 2013.

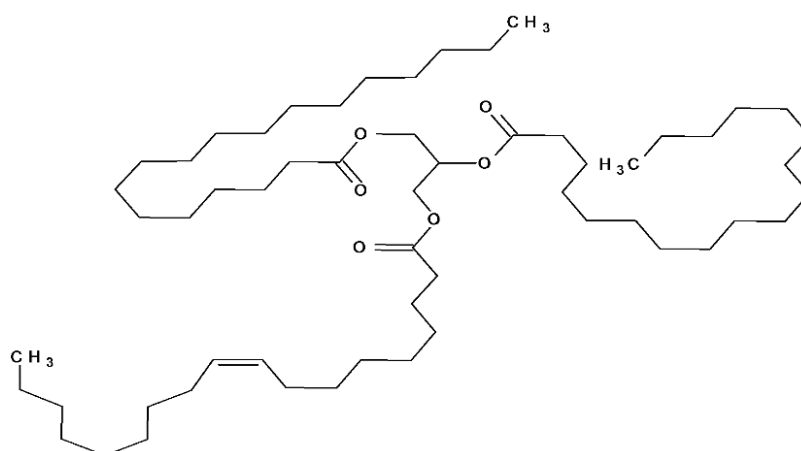
Estudos que analisaram o perfil toxicológico do GFC em animais, após sua administração em camundongos *swiss* tratados por via oral e intraperitoneal mostraram que o composto não produziu efeitos tóxicos como evidenciado pela ausência de sinais de toxicidade ou mortalidade nos animais durante o período experimental. No entanto, estudo realizado por Prado e colaboradores (2017) onde foram investigados os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do GFC, onde concentrações de GFC acima de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram citotóxicas em todos os tempos experimentais. Nenhuma concentração de GFC foi mutagênica ou genotóxica nos ensaios salmonella/microsossoma e cometa.

A propriedade antioxidante *in vitro* do bacurizeiro vem sendo comumente reportada, através do sequestro de radicais livres. Apresentando dessa forma uma possível ação protetora contra o aparecimento e/ou desenvolvimento de processos degenerativos associados com vários tipos de doenças (RUFINO *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2011; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013a).

Estudos realizados por Santos Júnior e colaboradores (2010) permitiram sugerir uma potencial atividade cicatrizante para o óleo das sementes de *P. insignis*. Em seus experimentos usando “banha do bacuri” para cicatrizar feridas cutâneas na região dorsal de ratos. Os resultados mostraram que a banha foi eficiente no tratamento e que os animais tratados demonstraram reepitelização considerável.

Mendes (2013) testou a atividade cicatrizante de uma formulação farmacêutica pastosa contendo o composto TG1, 1,3-distearoil-2-oleil-glicerol (Figura 1.3), um triacilglicerol isolado do extrato hexânico das sementes de *P. insignis* em ratos *wistar*. As análises macroscópicas e histológicas das feridas dos ratos tratados com o creme contendo TG1 demonstraram uma possível atividade cicatrizante do composto.

Figura 1.3: Estrutura química do 1,3-distearoil-2-oleil-glicerol (TG1).



Fonte: Arquivo pessoal.

Estudos realizados por Mendes e colaboradores (2014) a fração acetato de etila das cascas do bacuri promoveu um poderoso efeito hipotensivo, relacionada aos receptores α -adrenérgicos.

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do extrato hexânico das sementes de *P. insignis* e de seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina contra a peroxidação lipídica (inibição da formação de TBARS); remoção do radical hidroxila, e na inibição da produção do radical nitrito *in vivo*, tanto o extrato quanto o complexo de inclusão foram capazes de inibir a

CAPÍTULO 1

peroxidação lipídica reduzindo a quantidade de TBARS, do radical hidroxila e de produção de nitrito (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Resultados encontrados por Costa Júnior e colaboradores (2013b) indicaram que as frações de acetato de etila e diclorometano de semente de *P. insignis* apresentaram atividades antioxidantes *in vitro*, medidas por ensaios de ABTS e DPPH *in vivo*, medidas por efeitos protetores contra a citotoxicidade induzida por H₂O₂ em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*; efeito leishmanicida e genotoxicidade em células V79 onde os compostos α -mangostina e γ -mangostina são os responsáveis por essas ações.

Outras atividades biológicas reportadas na literatura para as sementes de *P. insignis* são: antimicrobiana, frente às cepas de *Saccharomyces cerevisiae*; citotoxicidade em *Artemia salina*; efeito genotóxico, em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79); efeito anticonvulsivante induzido por pilocarpina; cicatrizante; atividade anti-inflamatória e efeito estimulador no Sistema Nervoso Central (SNC) em camundongos (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2010; SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2010; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2011a; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2011b; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2011c; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013a; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013b). Na Tabela 1.1 mostra as atividades biológicas descritas na literatura para todas as partes do fruto do bacurizeiro.

Tabela 1.1: Atividades biológicas das partes do fruto do bacurizeiro.

Parte	Atividade biológica	Referências
Sementes	Diarreia, problema de pele,	COSTA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2013a;
	Dores de ouvido;	COSTA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2013b
	Picadas de insetos, aranhas e cobras;	COSTA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2011a;
	Reumatismos e artrites;	COSTA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2011b;
	Cicatrizante; atividade leishmanicida;	COSTA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2010;
	Antioxidante; Anti-inflamatória;	SANTOS JÚNIOR <i>et al.</i> , 2010;
	citotoxicidade em <i>Artemia salina</i> ;	MORAES; GUTJAHR, 2009;
	efeito genotóxico em fibroblastos de pulmão de hamster chinês;	
	efeito anticonvulsivante induzidas por pilocarpina;	
	Efeito protetor, reduzindo a peroxidação lipídica;	
Atividade anticonvulsivante;		

CAPÍTULO 1

	Efeito estimulador no SNC em camundongos.	
Polpa	Atividade antioxidante	RUFINO <i>et al.</i> , 2010.
Casca do tronco	Tratamento de eczemas, vírus do herpes e tratamento de dermatites.	SHANLEY; MEDINA, 2005
Casca do fruto	Atividade hipotensiva	MENDES <i>et al.</i> , 2014.

Fonte: Adaptada de KLENICY *et al.*, 2014.

1.1.5 Composição química presentes em *Platonia insignis*

P. insignis é uma espécie vegetal composta majoritariamente pelas classes de terpenos, xantonas e fenóis. Dessa forma, o interesse por essa espécie excede a indústria de alimentos devido ao potencial das atividades biológicas encontradas (YAMAGUCHI *et al.*, 2014). O gênero *Platonia* é bastante abundante em diversas substâncias naturais (metabólitos) como xantonas (euxantonas), ácidos graxos, e triacilgliceróis (HILDITCH; PATHAK, 1949; ROBERTS, 1961; BENTES *et al.*, 1986).

Pesquisas recentes com a polpa da fruta de *P. insignis* detectaram a presença de ácido ascórbico (Quadro 1.1 (1)) e polifenóis como principais compostos bioativos (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011). A classe das xantonas é responsável por diversas propriedades farmacológicas de grande importância, tais como: antitumorais, anti-inflamatória, antitrombótica, antimicrobiana e efeitos neurofarmacológicos, induzindo dessa forma a formação de neurites no tecido nervoso (MAK *et al.*, 2000; HA *et al.*, 2006).

Na investigação de componentes com atividade biológica ativa da família Clusiaceae, Costa Júnior e colaboradores, (2011b) pesquisaram componentes bioativos das sementes de *P. insignis* e isolaram um par de compostos tautoméricos de uma benzofenona poliisoprenilada, denominado Garcinialiptona (1/1a) (Figura 1.2). Estas substâncias foram identificadas por métodos espectroscópicos. Outro composto que também foi isolado a partir do mesmo extrato das sementes de *P. insignis* foi o triacilglicerol, 1,3-diestearoil-2-oleil-glicerol (Figura 1.3). O fruto desta espécie também é rico em β -caroteno (Quadro 1.1 (2)) (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008).

Pesquisas fitoquímicas dos extratos hexânicos do pericarpo e extrato metanólico das sementes do bacupari, *Garcinia brasiliensis*, (espécie pertencente à mesma família do bacurizeiro) mostraram, respectivamente, a presença das benzofenonas preniladas, 7-epiclusianona (Quadro 1.1 (3)) e guttiferona-A (Quadro 1.1 (4)). Tanto os extratos vegetais

como os compostos isolados foram apontados como sendo potenciais fitoterápicos para cura de doenças causadas por microorganismos *gram* negativos (NALDONI *et al.*, 2009). O acilfloroglucinol, que é uma classe de policíclico poliprenilado isolado da família Clusiaceae, tem despertado interesse de muitos pesquisadores, devido esta classe apresentar uma importante gama de propriedades farmacológicas: antimicrobiana (OLIVEIRA *et al.*, 1999), leishmanicida (PEREIRA *et al.*, 2010), antidepressiva (CUESTA-RUBIO *et al.*, 2002), antioxidante (CUESTA-RUBIO *et al.*, 2002, CIOCHINA; GROSSMAN, 2006; CHEN *et al.*, 2010), citotóxica (BAGGETT *et al.*, 2005), antiretroviral (PICCINELLI *et al.*, 2005), anti-inflamatória (WENG *et al.*, 2004) e antitumoral (ZEISSER-LABOUÉBE *et al.*, 2006; HENRY *et al.*, 2009).

Em estudos com a polpa do bacuri observou-se a presença de constituintes químicos com propriedades antioxidantes tais como: vitaminas C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferóis), flavonóides, antocianinas e polifenóis, além disso, foi verificada a presença de glutamina e ácido glutâmico (como aminoácidos majoritários). Sacarídeos (glicose, frutose e sacarose) e metais (Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn e Cu) foram observados em quantidades superiores aos encontrados em outras frutas originária da região amazônica, como araçá-boi e cupuaçu (ROGEZ *et al.*, 2004; RUFINO *et al.*, 2010). As análises nos estudos de compostos voláteis da polpa de *P. insignis* mostraram-se presença de alcoóis terpênicos, sendo o mais abundante o linalol (Quadro 1.1 (5)) (ALVES; JENNINGS, 1979; BOULANGER *et al.*, 1999; ROGEZ *et al.*, 2004; FRANCO; JANZANTTI, 2005). Nas cascas de *P. insignis* apresentaram alto teor de euxantona (Quadro 1.1 (6)) (1,3%), substância cristalina de cor amarela, com ponto de fusão de 240 °C e facilmente sublimável (ROBERTS, 1961).

Nos estudos fitoquímicos das frações lipídicas das sementes de *P. insignis* foram verificados a presença de ácidos graxos como palmítico (Quadro 1.1 (7)) (44,2%), palmitoléico (Quadro 1.1 (8)) (13,2%), esteárico (Quadro 1.1 (9)) (2,3%), oleico (Quadro 1.1 (10)) (37,8%) e linoleico (Quadro 1.1 (11)) (2,5%), além de 10% de tripalmitina (Quadro 1.1 (12)), indicando-o como uma boa alternativa para a indústria oleífera (BENTES *et al.*, 1986).

Na fração de baixa polaridade das sementes de *P. insignis* foram detectadas a presença de diterpenos de esqueletos caurano e lábdano, caura-16-eno (Quadro 1.1 (13)) e ácido E-labda-8(20),13-dieno-15,19-dióico (Quadro 1.1 (14)), respectivamente. Sendo que esses esqueletos diterpênicos são normalmente associados a atividades farmacológicas, uma vez que há relatos de atividade antibacteriana e anti-inflamatória para alguns diterpenos, como os encontrados em óleos fixos e resinas de espécies de copaíba (*Copaifera* sp.) e *Eperua* (LEANDRO *et al.*, 2012). Na fração de média polaridade, analisada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), foram detectadas presenças das xantonas: 1,3,5,6-

CAPÍTULO 1

tetraidroxi-2,2-(2-metilbuta-3-eno-2-il)-7-(3-metilbuta-2-enil)-xantena-9-ona (Quadro 1.1 (15)) (gama mangostina), em associação com 1-hidróxi-3,5,6-trimetoxi-xantena-9-ona (Quadro 1.1 (16)) e 1,3,6-triidróxi-7-metóxi-2,8-bis-(3-metilbuta-2-enil)-xantena-9-ona (Quadro 1.1 (17)) (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2012).

As substâncias voláteis presentes na *P. insignis* concentram-se basicamente na casca. Através da extração por fluido supercrítico da casca foram detectados os seguintes compostos: como os ácidos graxos: palmítico, oleico, linoleico, linolênico, esteárico, caprílico e mirístico; já os álcoois encontrados foram: linalol, 3,7-dimetil-octa-1-eno-3,7-diol e o terpineol; além do óxido de linalol; éter eugenol; os seguintes hidrocarbonetos: bisaboleno, 2-metilheptano e nonacosano, bem como, o citrato de trimetila (MONTEIRO *et al.*, 1997).

Na Tabela 1.2 mostra as propriedades farmacológicas dos principais compostos bioativos isolados a partir da *Platonia insignis*.

Tabela 1.2: Propriedades farmacológicas dos principais compostos bioativos de *Platonia insignis*.

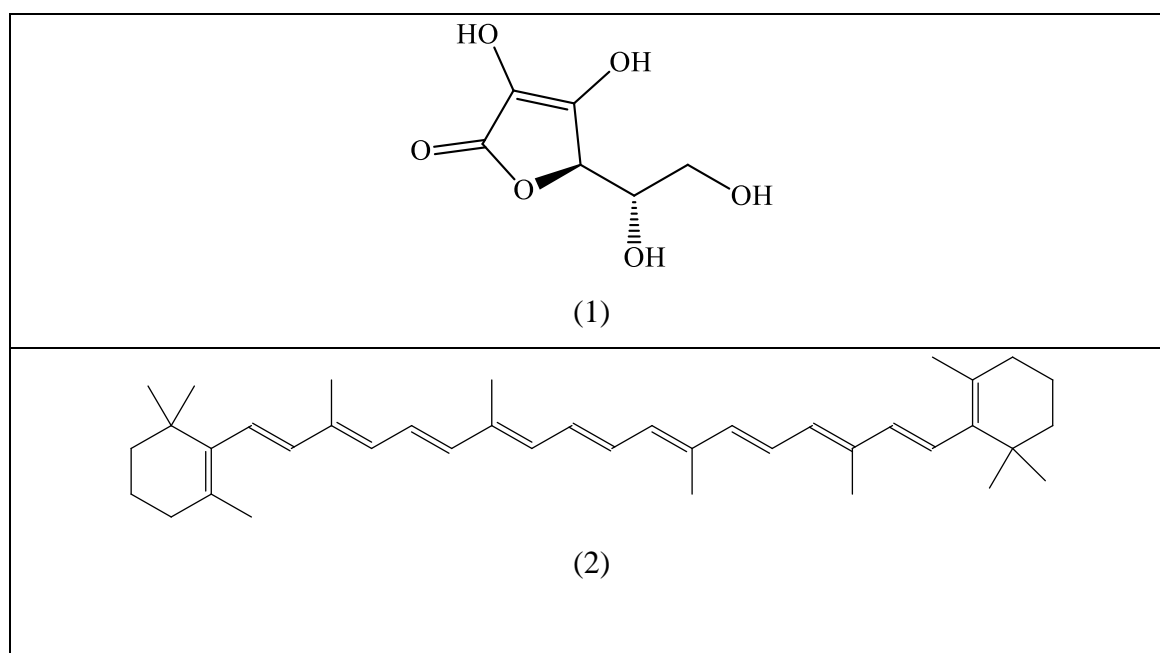
Compostos bioativos	Propriedades farmacológicas	Referências
Xantonas	Antitumoral	(ROBERTS, 1961)
	Antiinflamatória	(MAK <i>et al.</i> , 2000)
	Antitrombótico	(HA <i>et al.</i> , 2006)
	Antimicrobiana	
	Neurofarmacológicas	
Ácidos graxos	Acelera cicatrização	(CALDER, 2003)
		(CARDOSO <i>et al.</i> , 2004)
		(HATANAKA; CURI, 2007)
		(COSTA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2011a)
Acilfloroglucinol policíclico poliprenilado	Antimicrobiana	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1999)
	Leishimanicida	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2010)
	Antidepressiva	(CUESTA-RUBIO <i>et al.</i> , 2002)
	Antioxidante	(CIOCHINA; GROSSMA, 2006)
	Citotóxica	(CHEN <i>et al.</i> , 2010)
		(BAGGETT <i>et al.</i> , 2005)
Euxantona	Antiretroviral	(PICCINELLI <i>et al.</i> , 2005)
	Antiinflamatória	(WENG <i>et al.</i> , 2004)

	Antitumoral Efeito pró-oxidante ao DNA	(ZEISSER-LABOUEBE <i>et al.</i> , 2006) (HENRY <i>et al.</i> , 2009) (WU <i>et al.</i> , 2008)
Garcinielliptona FC	Antiinflamatória Vasodilatadora Promotor de neurite Ação antioxidante <i>in vitro</i> pelos métodos TBARS, sequestro de radicais hidroxilas (OH·) e óxido nítrico (NO·) Atividade citotóxica Leishmanicida	(HARBORNE <i>et al.</i> , 1999) (FANG <i>et al.</i> , 2006) (HA <i>et al.</i> , 2006) (NAIDU <i>et al.</i> , 2007) COSTA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2013a; COSTA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2011a.
TG1	Ação inibidora da acetilcolinesterase Cicatrizante	SANTOS, 2012; FEITOSA <i>et al.</i> , 2016. MENDES, 2013.

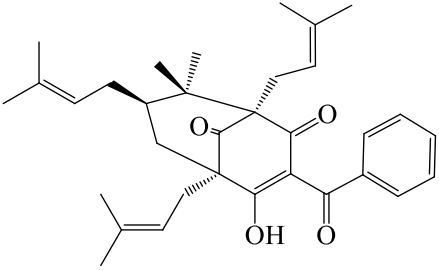
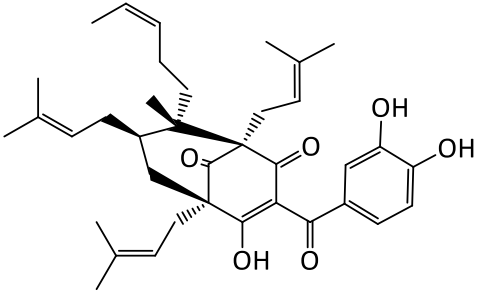
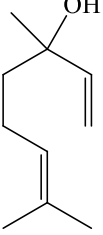
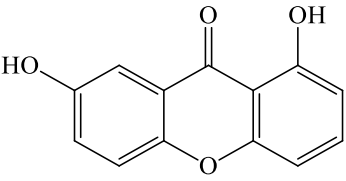
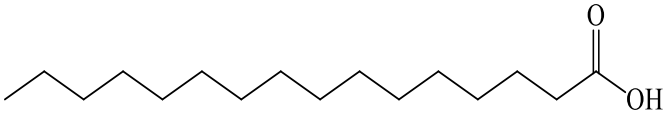
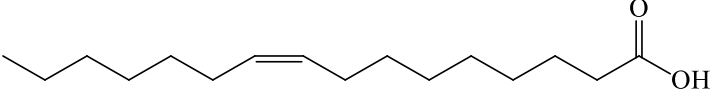
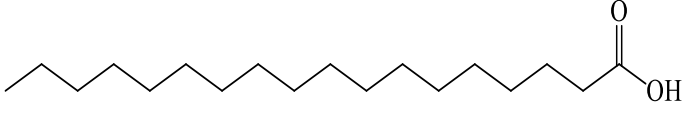
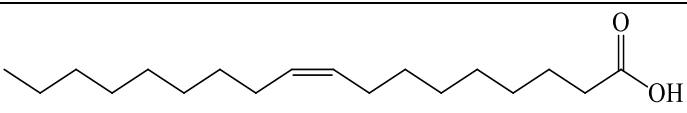
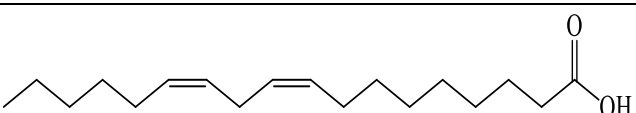
Fonte: Adaptada de SANTOS *et al.*, 2013.

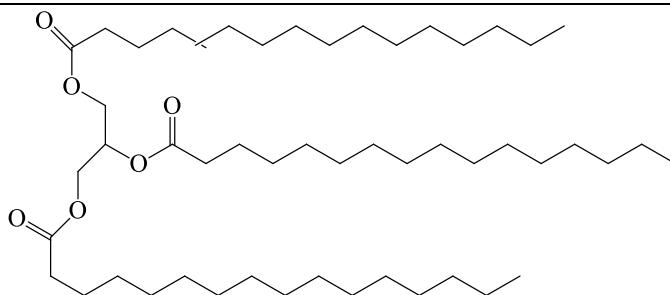
No Quadro 1.1 mostra as estruturas químicas de alguns dos constituintes presentes na *Platonia insignis* (bacurizeiro).

Quadro 1.1: Estruturas de compostos encontrados em *Platonia insignis*.

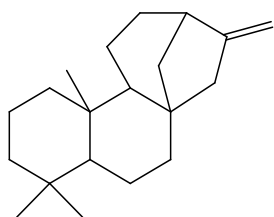


CAPÍTULO 1

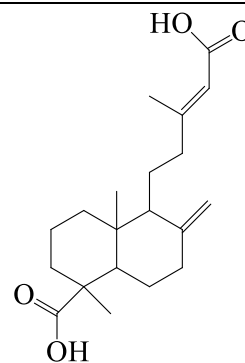
 <p>(3)</p>	 <p>(4)</p>
 <p>(5)</p>	 <p>(6)</p>
 <p>(7)</p>	
 <p>(8)</p>	
 <p>(9)</p>	
 <p>(10)</p>	
 <p>(11)</p>	



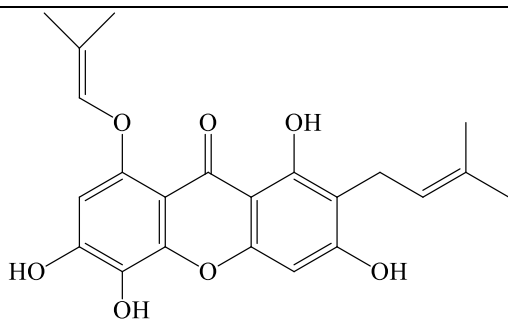
(12)



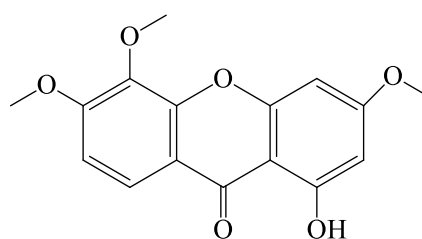
(13)



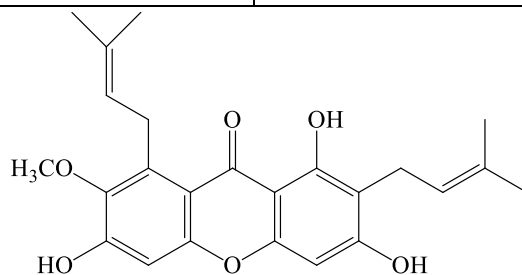
(14)



(15)



(16)

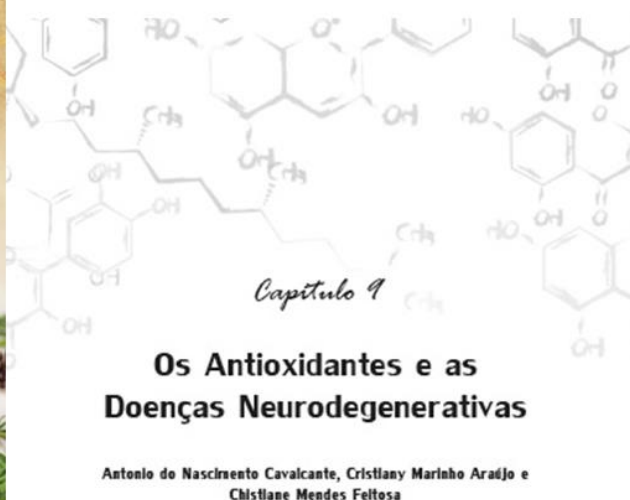
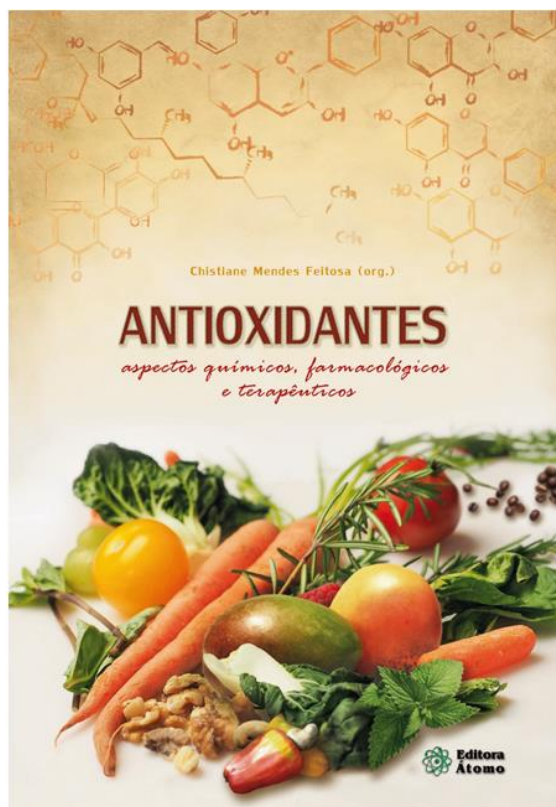


(17)

Fonte: Arquivo pessoal.

1.2 OS ANTIOXIDANTES E AS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

(Capítulo 9 do livro **ANTIOXIDANTES** aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos da editora Átomo)



1.2.1 Introdução

A oxidação pode ser definida como um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para a realização das atividades essenciais das células. Contudo, o metabolismo do oxigênio nas células vivas leva também à formação de radicais livres (MCCORD, 1994; ADEGOKE *et al.*, 1998). Agentes oxidantes são substâncias produzidas pelo metabolismo normal do corpo e, se não controlados, podem provocar danos extensivos. Uma ampla definição de antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES; STAHL, 1995).

O *stresse* oxidativo é definido como a situação na qual a formação de espécies reativas excede significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes

CAPÍTULO 1

danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a morte por apoptose ou necrose (HALLIWELL, 2001). Estudos apontam que o *stress* oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de muitas doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica). Considerando a importância dos agentes antioxidantes, bem como o *stress* oxidativo nas doenças neurodegenerativas, os próximos tópicos têm como propósito abordar os antioxidantes em diferentes modelos de doenças neurodegenerativas.

1.2.2 Radicais livres

As moléculas orgânicas e inorgânicas, assim como, os átomos que tem um ou mais elétrons desemparelhados que possuem existência independente podem ser classificados como radicais livres (RL) (HALLIWELL, 1994). A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997). Algumas espécies reativas estão mostradas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3: Principais tipos de espécies reativas.

Radical	Nome do radical
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
O_2^-	Radical superóxido
$\text{ROO}\cdot$	Radical peroxila
$\text{RO}\cdot$	Radical alcoxila
$\text{OH}\cdot$	Radical hidroxila
$\text{HOO}\cdot$	Radical hidroperoxila
$\text{NO}\cdot$	Óxido nítrico
ONOO^-	Peroxinitrito
$\text{Q}\cdot$	Radical semiquinona

Fonte: Arquivo pessoal.

Os RL podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU; ANDERSON, 1997). Entre as principais formas reativas de oxigênio o radical superóxido (O_2^-) apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o radical hidroxila

(OH \cdot) mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O peróxido de hidrogênio, H₂O₂, não é considerado um radical livre verdadeiro, porém, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

O desemparelhamento de elétrons faz dos RL moléculas altamente instáveis que se multiplicam em cascata, com meia-vida curtíssima, sendo quimicamente muito reativas e são interceptados de dois modos: pela ação dos agentes antioxidantes endógenos ou exógenos; ou pelo mecanismo de oxi-redução, quando dois radicais livres se ligam entre si (OLSZEWER, 2008). Esses RL cujo elétron encontra-se centrado nos átomos de oxigênio e nos átomos de nitrogênio são denominados, respectivamente, de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e espécies reativas de nitrogênio (ERN's).

No organismo, os radicais livres, encontram-se envolvidos com a produção de ATP, no processo de fagocitose, na regulação do crescimento celular, entre outros (ABRAHÃO *et al.*, 2010). Naturalmente a produção de RL ocorre como um processo fisiológico. Contudo, em determinadas condições, pode ocorrer um aumento na produção de ERO's, levando ao *stresse* oxidativo, durante o qual algumas destas espécies reativas, tais como o radical superóxido (O₂ \cdot^-), radical hidroxila (OH \cdot) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), podem produzir danos ao organismo como a lipoperoxidação de lipídios insaturados das membranas celulares (LEMOS, 2006).

Devido a alta reatividade e a elevada instabilidade dos RL, faz com que eles participam de reações com substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, proteínas, lipídeos, carboidratos, particularmente moléculas importantes nas membranas celulares e ácidos nucleicos (LEMOS, 2006).

Há diversos estudos indicando que os RL agem acelerando o processo degenerativo e a perda da estabilidade celular, provocando situações adversas ao organismo e seus tecidos, favorecendo dessa forma a perda da homeostasia do meio interno (OLSZEWER, 2008).

1.2.3 Os antioxidantes

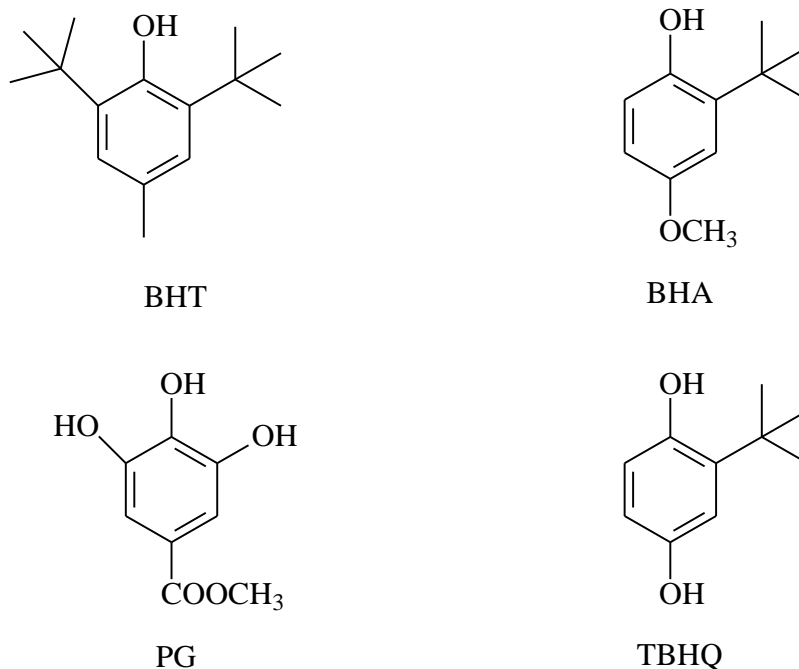
Antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparadas a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES; STAHL, 1995; BIANCHI; ANTUNES, 1999; CONI *et al.*, 2005). De outra maneira, os antioxidantes, são substâncias que retardam ou minimizam a formação de peróxidos, aldeídos, cetonas, dímeros e polímeros, durante o processo de oxidação. Estas substâncias atuam retardando a etapa inicial da autooxidação (fomação de radicais livres),

removendo-os do meio, e da propagação na fotoxidação que corresponde à formação de hidroperóxidos. Isso ocorre devido aos derivados fenólicos estabilizarem o radical livre por deslocalização de elétrons π (π) no anel aromático (efeito de ressonância), impedindo dessa forma a propagação de reações radicalares oxidativas no meio (LITWINIENKO *et al.*, 1999). Os antioxidantes, portanto, é um conjunto heterogêneo de substâncias formado por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres, formados nas reações metabólicas ou por fatores exógenos, ao organismo. A geração de RL, fisiológica ou não, é normalmente equilibrada pela ação dos antioxidantes endógenos e exógenos (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Antioxidantes endógenos são aqueles produzidos dentro do próprio organismo que se classificam em enzimáticos (superóxidos dismutases citoplasmática e mitocondrial, catalase, glutatiónaperoxidase, glutatiónaredutase) e não enzimáticos (glutationa, ácido lipóico, albumina, ubiquinona, metalotioneínas, transferrina, ceruloplasmina). Antioxidantes exógenos ou dietéticos são aqueles adquiridos por meio da ingestão alimentar (ácido ascórbico, tocoferol, carotenóides, compostos fenólicos e demais metabólitos secundários vegetais, zinco, cobre, selênio e magnésio) e juntos promovem reciclagem e reações de regeneração que otimizam a proteção contra os radicais livres (SHAHIDI; HO, 2007).

De modo geral, os antioxidantes podem ser classificados, como sintéticos e naturais. Estes são subdivididos em: primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Dentre os diversos antioxidantes sintéticos (Figura 1.4), os mais utilizados na indústria são os polifenóis como 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT), 3-*terc*-butil-4-metoxifenol (BHA), ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico-propil galato (PG) e *terc*-butilhidroquinona (TBHQ).

Figura 1.4: Antioxidantes sintéticos derivados de fenóis.

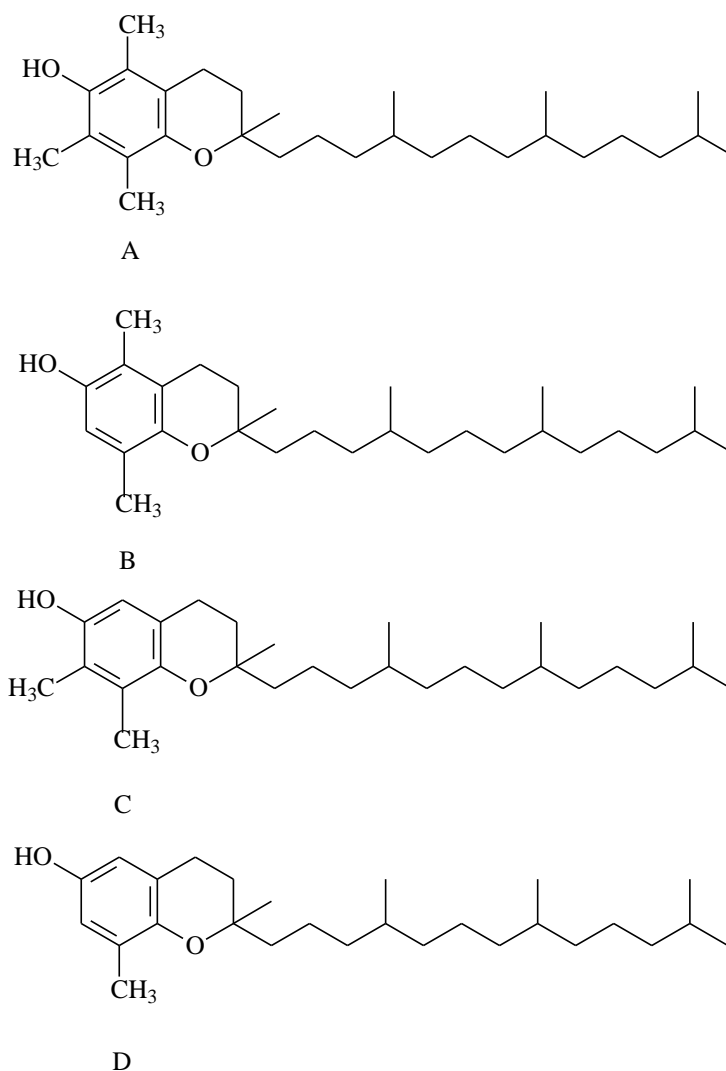
Fonte: Arquivo pessoal.

O efeito da substituição sobre a atividade do anel fenólico tem sido alvo de vários estudos. A eficiência de um fenol como inibidor de oxidação é notoriamente aumentada pela substituição de grupos alquílicos volumosos, usualmente *terc*-butil, na posição *orto*, e também pela substituição de um grupo alquílico (atualmente o metil), na posição *para* (RAMALHO; JORGE, 2006). Com isso, aumenta a facilidade de remoção do átomo de hidrogênio pela doação do seu elétron, ajudando a estabilizar o radical então formado, bloqueando as reações subsequentes. Esses grupos também reduzem a oxidação direta do fenol pelo oxigênio que pode diminuir a vida efetiva do inibidor.

Segundo Bors e colaboradores (2005), o BHT tem a melhor ação antioxidante em relação aos demais antioxidantes essa melhora se deve à presença de grupos ativadores no anel aromático, *orto* e *para* substituídos, contribuindo para uma melhor deslocalização de elétrons e consequente estabilização de radicais livres, formados nos processos oxidativos.

Dentre os principais antioxidantes fenólicos naturais, encontram-se os tocoferóis (Figura 1.5) e os flavonóides.

Figura 1.5: Antioxidantes naturais: A (α -tocoferol); B (β -tocoferol); C (γ -tocoferol) e D (δ -tocoferol).



Fonte: Arquivo pessoal.

1.2.4 Defesas proporcionadas pelos antioxidantes

A produção de forma contínua de radicais livres a partir de processos metabólicos, acarretou o desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante com vistas a limitar essa produção em níveis intracelulares e barrar a indução de danos (SIES; STAHL, 1995).

Com isso, os antioxidantes desempenham função em diversos níveis de proteção do organismo, como, um dos primeiros mecanismos de defesa em relação aos radicais livres é evitar a sua formação, especialmente, no processo de inibir reações em cadeia com o ferro e o cobre (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Ainda, segundo Bianchi e Antunes (1999) outra forma de proteção, diz respeito à intercepção de radicais livres que são gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, barrando seu ataque aos lipídeos, aminoácidos das proteínas, a ligação dupla dos ácidos graxos polinsaturados e as bases do DNA, impedindo a geração de lesões e perda da integridade celular.

Por fim, pode ocorrer também o processo de reparo causado pela ação de radicais livres. Esse fato relaciona-se com a remoção de danos na molécula de DNA e a reconstituição de membranas celulares danificadas. Essa proteção pode ocorrer até mesmo na própria adaptação do organismo como forma de resposta a geração de radicais livres durante o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Com a finalidade de manter a integridade celular contra possíveis ataques de RL, os organismos vivos desenvolveram sistemas de defesa denominados antioxidantes. Dentre os sistemas de defesas pode-se destacar:

1.2.4.1 Sistema enzimático

Estes tipos de sistema correspondem os antioxidantes preventivos que estão relacionados em um mecanismo de proteção contra a etapa de iniciação de reações dos radicais livres. São exemplos desses sistemas: superóxido desmutase, catalase, sedependente glutaciona peroxidase (GPX), fosfolípido hidroxiperoxidase glutaciona peroxidase (PHGPX) e se-independente glutaciona peroxidase (citosólica e microssomal glutaciona transferase) (PÔRTO, 2001).

O mecanismo de defesa primária contra superóxido é dado pela superóxido desmutase (SOD), onde ela eficientemente catalisa a conversão de dois radicais O_2^- em H_2O_2 e O_2 . Existem três diferentes formas de SOD: citosólica Cu/ZnSOD, mitocondrial MnSOD e outra de elevada massa molecular em fluidos extracelulares. O peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , formado por desmutação do radical O_2^- ou então gerado por atividade enzimática sendo antioxidado por uma cooperação de catalase e GPX. A catalase atua decompondo o H_2O_2 em H_2O e O_2 (PÔRTO, 2001).

1.2.4.2 Sistema não-enzimático

Estes sistemas estão envolvidos na proteção contra a etapa de propagação de reações oxidativas em cadeia. São constituintes desses sistemas: a substância lipofílica α -tocoferol, coenzima Q reduzida (ubiquinol), glutaciona hidrofílico, ascorbato e ácido úrico. O mecanismo

de proteção também pode ser dado através do sequestro de íons metálicos e proteínas transportadoras, tipo hemopexina e haptoglobulina (heme-livre e heme-proteínas) (PÔRTO, 2001).

A reação em cadeia envolvida na lipíde-peroxidação é bloqueada pelo α -tocoferol, o qual doa um átomo de hidrogênio para o radical peroxila, ROO \cdot para formar radical α -tocoferol, que é menos reativo e pode ser reduzido de volta para α -tocoferol por um grande número de compostos biológicos, incluindo ascorbato, GSH e ubiquinóis. Ascorbato também remove um grande número de radicais livres, reagindo não cataliticamente e diretamente com O $_2^-$, HO \cdot , ROO \cdot , e GSH reage com H $_2$ O $_2$, O $_2$ e OH \cdot e também contribui para metabolismo xenobiótico e preservação de ascorbato (PÔRTO, 2001).

1.2.5 Mecanismos de reparo

Neste mecanismo de defesa incluem sistema reparador de DNA e sistema reparador de proteínas lesadas. As enzimas envolvidas neste mecanismo de reparação de DNA são DNA-glicosilase, DNA AP endonuclease, DNA ligase. Estas enzimas agem por excisão ou por recombinação. Em adição, a ativação de polissintase (ADP-ribose) promove também reparação de DNA. Entretanto, seu excesso levará a um mecanismo de resposta, a morte celular, com extensa lesão ao DNA. Sistemas proteolíticos, que reconhecem proteínas danificadas, estão presentes tanto em citosol assim como em mitocôndria de células de mamíferos (PÔRTO, 2001).

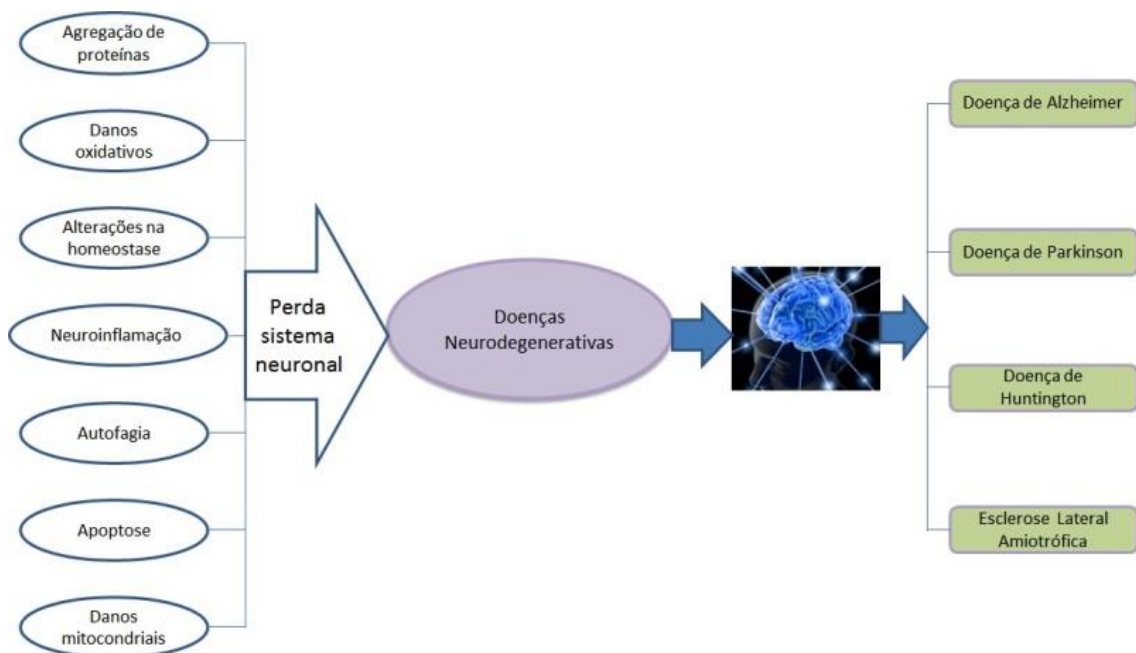
1.2.6 Doenças neurodegenerativas

As chamadas doenças neurodegenerativas (DN) englobam diferentes patologias onde se observa a perda de células do sistema nervoso e a formação de agregados proteicos, culminando em perda funcional (ataxia) ou em demência (BARNHAM *et al.*, 2004; UTTARA *et al.*, 2009). A doença de Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica são exemplos de DN. Essas patologias apresentam como principais características a perda gradual e irreversível da estrutura e/ou função dos neurônios em várias regiões cerebrais (FREITAS; OLIVEIRA, 2015). A incidência dessas doenças aumenta com o aumento da expectativa média de vida (GIORDANO *et al.*, 2014). A neurodegeneração é resultante de uma complexa rede de processos fisiopatológicos que atuam ao longo de um período de tempo extenso. Desta forma, as manifestações características das DN surgem décadas após o seu início, o que dificulta o seu diagnóstico no início e permite apenas uma intervenção terapêutica paliativa (DUPUIS, 2014).

Mecanismos bioquímicos e vias intracelulares responsáveis pela neurodegeneração do sistema neuronal têm sido, cada vez mais, áreas de grande interesse de vários grupos de pesquisas e embora as DN apresentem patologias específicas, todas apresentam mecanismos comuns como agregação de proteínas (JUCKER; WALKER, 2013), danos oxidativos, alterações na homeostase, neuroinflamação (HENEKA *et al.*, 2014), autofagia (NIXON, 2013), apoptose e danos mitocondriais (CHATURVEDI; FLINT BEAL, 2013) que podem contribuir para a perda no sistema neuronal (Figura 1.6).

Considerando estes mecanismos, diversos trabalhos na última década têm reforçado a hipótese sobre a necessidade do desenvolvimento de terapias neuroprotetoras que alvejam cada um desses mecanismos para evitar a necrose das células nos sistemas neuronais (NIEOULLON, 2011).

Figura 1.6: Mecanismos que levam a perda do sistema neuronal.



Fonte: Arquivo pessoal.

A região cerebral e os tipos de células neuronais afetadas desenvolvem um conjunto de características comportamentais e alterações cognitivas e/ou motoras específicas para cada doença como os neurônios corticais na doença de Alzheimer (MARTORANA *et al.*, 2013), a degeneração lombar fronto-temporal e os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo na doença de Parkinson (JIN *et al.*, 2014), a morte de células nos gânglios basais, tálamo e córtex cerebral e os neurônios motores superiores e inferiores na esclerose lateral amiotrófica (FOERSTER *et al.*, 2013). Assim, essas patologias, podem ser classificadas como perturbações de cognição e

memória ou movimento e ambas as características podem frequentemente coexistir em uma única doença neurodegenerativa.

1.2.7 Evidências do uso de antioxidantes em neurodegeneração

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas relacionando o efeito de antioxidantes em doenças neurodegenerativas. Alguns resultados de pesquisas com essa abordagem são apresentados a seguir.

Estudos realizados por Etminan e colaboradores (2005) sugeriram que a redução ao risco da doença de Parkinson pode ser feita pela ingestão de vitamina E, C e carotenoides. Weber e Ernst (2006) relataram que o efeito neuroprotetor dos antioxidantes é limitado no tratamento da doença de Parkinson e que mais pesquisas nessa área precisam ser realizadas.

Enquanto pesquisas realizadas por Crichton e colaboradores (2013) sugeriram que ensaios clínicos futuros são imprescindíveis para a elucidação dos efeitos de uma alta ingestão de antioxidantes na dieta tanto em relação ao funcionamento cognitivo quanto as doenças neurodegenerativas.

Para Huang e colaboradores (2013) os produtos naturais surgem como fontes de novas pistas para o tratamento da doença de Alzheimer. Sendo também os flavanóides sugeridos como possíveis inibidores da acetilcolinesterase e podem ser utilizados na terapêutica como promissores no tratamento de doenças neurodegenerativas (CORNELLI, 2010; HUANG *et al.*, 2013).

No entanto, há pesquisas que demonstram que não existe nenhuma relação no tratamento utilizando antioxidantes e a sua proteção contra a neurodegeneração. Como nas pesquisas realizadas por Crichton e colaboradores (2013) que sugeriram que não existe nenhuma correlação entre a ingestão de forma habitual de antioxidantes em dietas para que haja um melhor desempenho cognitivo ou possível risco de redução da demência. Recentemente ensaios clínicos utilizando uma fórmula nutricional contendo o α -tocoferol mostraram que não houve melhora significativa no processo de desempenho cognitivo (URIARTE-PUEYO; CALVO, 2011).

Estudos realizados por Frank e colaboradores (2012) tem revisto o efeito de tocotrienóis como fontes dietéticas utilizadas em neuroproteção, contudo, essas informações ainda são escassas. Essas pesquisas têm reportado que a vitamina E (*orto*-tocoferol) podem prevenir a doença de Alzheimer, porém, essas pesquisas ainda não conseguiram demonstrar de forma convincente sua eficácia de forma clínica.

Pesquisas realizadas por Dysken e colaboradores (2014) mostraram que a doença de Alzheimer pode ser tratada com α -tocoferol. De forma recente, pesquisas sugeriram que o γ -tocoferol pode ser benéfico no tratamento da doença de Alzheimer se comparado com o α -tocoferol. Estudos iniciais utilizando a vitamina E com a coenzima Q10 mostraram efeitos neuroprotetores em pacientes com doença de Parkinson, sendo ainda, necessários novos estudos (MORRIS *et al.*, 2015).

Estudos utilizando a vitamina E em animais e modelos *in vitro* forneceram evidências de efeitos neuroprotetores. A suplementação com vitamina E em patologias neurodegenerativas já é utilizada em práticas clínicas (BERMAN; BRODATY, 2004; MORRIS *et al.*, 2015). Contudo, ainda não existem respostas de forma convincente da prescrição do tocoferol para o tratamento de doenças neurodegenerativas (SINGH, 2015).

Casani e colaboradores (2013) demonstraram que a utilização de suplementação com antioxidantes usando o modelo *Drosophila* poderia prevenir o dano oxidativo da doença de Parkinson. Pesquisa *in vivo* e *in vitro* mostrou que antioxidantes podem prevenir danos neurais provocados por processos oxidativos na doença de Parkinson (CHANG *et al.*, 2005).

As pesquisas de Hagl e colaboradores (2015) reportaram que a utilização do farelo de arroz, que é rico em tocoferol e tocotrienóis, mostraram efeitos benéficos na função mitocondrial, sendo promissor na prevenção da doença de Alzheimer. Seus estudos ainda reportaram que pacientes com doença de Alzheimer mostraram que houve a diminuição de vitamina E, o que pode estar relacionado ao seu envolvimento com essa doença.

Avaliações clínicas mostraram que a suplementação de α -tocoferol diminui a γ -tocoferol reduzindo o risco da doença de Alzheimer em idade avançada (MANGIALASCHE *et al.*, 2010). Pesquisas utilizando modelo experimental da doença de Alzheimer mostraram que a suplementação com vitamina C pode oferecer efeitos neuroprotetores (MANGIALASCHE *et al.*, 2011; KOOK *et al.*, 2014). Outras pesquisas reportam que a combinação de vitamina C e E podem oferecer efeitos neuroprotetores quando foi utilizado ratos transgênicos com doença de Alzheimer (HARRISON *et al.*, 2009; KENNARD; HARRISON, 2014).

Alguns estudos também reportam que os flavanóides podem ser utilizados como agentes terapêuticos para a aprendizagem, memória, desempenho neurocognitivo e doença de Alzheimer (ZHANG *et al.*, 2002; VAUZOUR, 2014). Estudos recentes também têm demonstrado os efeitos benéficos dos flavonóides na doença de Alzheimer utilizando animais e modelos experimentais *in vitro* (JONES *et al.*, 2012; BAPTISTA *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2014; COX *et al.*, 2015).

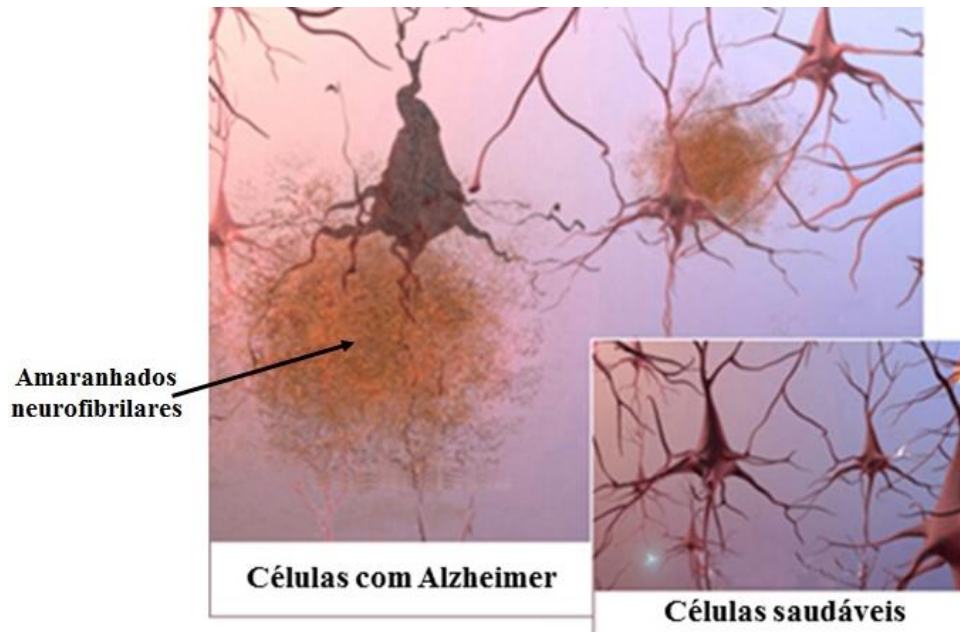
Outros estudos recentes ainda sugerem que a indução de flavonóides podem diminuir a atividade da acetilcolinesterase, utilizando um modelo experimental para a doença de Alzheimer (LI *et al.*, 2013; KIMURA *et al.*, 2013; XIAO *et al.*, 2013; MOGHBELINEJAD *et al.*, 2014). Pesquisas utilizando um modelo celular para doença de Alzheimer mostrou que flavonóide ofereceu proteção através da antioxidação, proteção mitocondrial e inativação do sinal da MAPK, porém, novos estudos precisam ser realizados (ZHANG *et al.*, 2014).

1.2.8 Doença de Alzheimer

A base histopatológica da doença de Alzheimer (DA) foi apresentada pela primeira vez em 1906, na Alemanha, em uma paciente de 51 anos, pelo professor e neuropatologista, Alóis Alzheimer. Ele observou que nas placas senis (agregados de proteína beta-amilóide), da paciente em estudo, havia um amaranhado neurofibrilares, hoje associados à mutação da proteína tau, no interior dos neurotúbulos. Estas duas evidências patológicas permitiram o professor caracterizar este quadro clínico como distinto de outras patologias do cérebro, vindo a dar o nome de Alzheimer, a doença por ele estudada pela primeira vez. Atualmente, se sabe, que as primeiras alterações microscópicas associadas a esta doença são os depósitos chamados amiloides ao lado de anormalidades denominadas, amaranhados neurofibrilares (Figura 1.7), os quais se desenvolvem dentro dos neurônios (MACHADO, 2006). Na Figura 1.7 observa-se a diferença de células saudáveis e células com a doença e com a presença de placas senis. Estas placas são a característica fundamental da DA, uma doença neurodegenerativa que compromete primeiramente a memória e, posteriormente, a capacidade de raciocínio e a comunicação. A DA é um tipo de demência que não está associada a nenhuma causa antecedente, como traumatismo cerebral, acidente vascular cerebral (RANG *et al.*, 2001).

Hoje em dia, Alzheimer, é a forma neurodegenerativa mais comum de demência e caracterizada fisicamente pela atrofia da massa encefálica, sobretudo, no hipocampo, além de apresentar características psico-sociais, como, dificuldades em memorizar situações cotidianas, lentidão de pensamentos, gradual perda das habilidades de raciocinar, dificuldades de linguagens e conseqüentemente exclusão social (MACHADO, 2006). Outros sinais da DA são, perda da memória de fatos recentes, dificuldade na execução das atividades domésticas e manuais, problemas em encontrar a palavra certa, desorientação, alteração da capacidade de apreciação e raciocínio, dificuldade em fazer contas, colocar as coisas nos lugares errados, alterações do comportamento e perda de iniciativa.

Figura 1.7: Diferença entre células normais e células com Alzheimer.

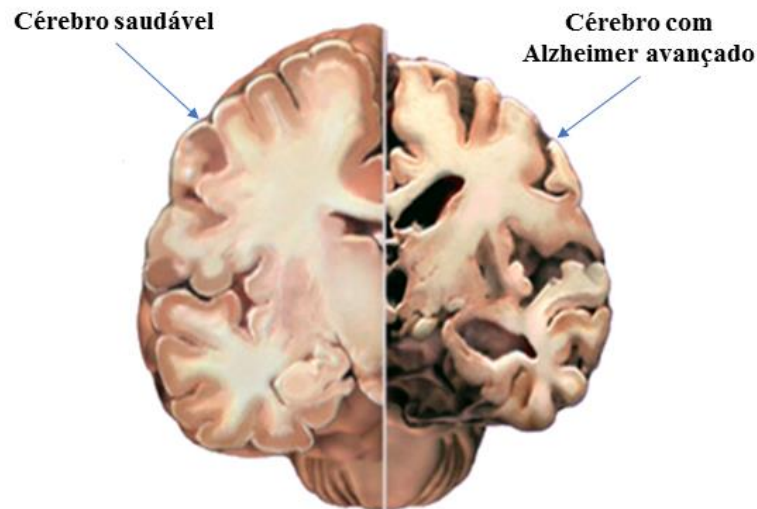


Fonte: Adaptada de FEITOSA, 2015.

De outra maneira, a doença de Alzheimer é uma forma de demência que é caracterizada por um declínio geral em todas as áreas da atividade mental, não sendo uma característica apenas da velhice nem sequer um destino inelutável. Os sintomas podem aparecer em qualquer idade, porém, é mais comum em idosos com mais de 65 anos (BIRD, 1998). No último século com o aumento considerado de idosos, também houve um aumento no número de doenças caracterizadas pela demência, preocupando cada vez mais os profissionais envolvidos na área da saúde, pois se vê a necessidade urgente do controle dos sintomas e otimização diagnóstica, na tentativa de garantir uma boa qualidade de vida a estes idosos.

Na Figura 1.8 observa-se duas imagens justapostas: da esquerda representa o cérebro de uma pessoa normal e da direita, o cérebro de um portador da DA em estágio avançado. É possível observar a perda de tecido cerebral nas regiões que controlam as principais funções cognitivas responsáveis pelos processos de memória. No cérebro com Alzheimer o córtex encolhe danificando as regiões envolvidas com os pensamentos, planos e lembranças. O encolhimento atinge o hipocampo uma região que exerce importante papel na memória como por exemplo na formação de novas lembranças.

Figura 1.8: Demonstração em corte de um cérebro saudável e com Alzheimer.



Fonte: Adaptado de FEITOSA, 2015.

1.3 ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (AChE)

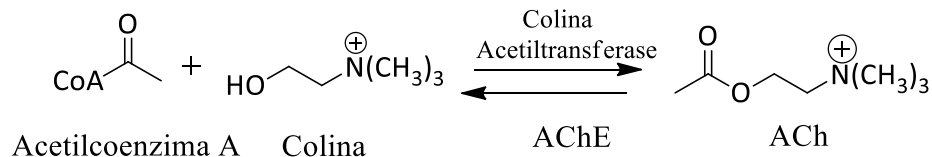
Acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses no sistema colinérgico. Nestas sinapses a acetilcolina age transmitindo a mensagem de um neurônio a outro. As sinapses colinérgicas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP), sendo importante para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas humanas (WESTFALL; WESTFALL, 2006).

A anatomia do sistema colinérgico corresponde a uma porção autônoma do SNP. O sistema colinérgico é caracterizado pela presença das sinapses que têm como neurotransmissor a ACh. As sinapses colinérgicas não são encontradas apenas nessa parcela do SN, mas também, no SNC, na parte somática do SNP e nas junções ganglionares do sistema adrenérgico (WESTFALL; WESTFALL, 2006).

Na fenda sináptica a AChE é a enzima responsável por degradar a acetilcolina, uma molécula simples, que possui um grupo éster e uma amina quaternária. Sendo que no neurônio pré-sináptico, a ACh é sintetizada a partir da colina e da acetilcoenzima A (Acetil-CoA), catalisada pela colina acetiltransferase. Após sua formação, ela é armazenada em vesículas, onde fica depositada até que haja um estímulo que resulte em sua liberação na fenda sináptica. A partir desse ponto, a ACh se liga ao receptor pós-sináptico propagando a informação. Após transmitir a mensagem, a molécula de ACh se desliga do receptor pós-sináptico e volta à fenda

sináptica original, onde ela sofre hidrólise catalisada pela AChE, dando origem a ácido acético e a colina (ARAÚJO *et al.*, 2016), como pode se observar na Figura 1.9.

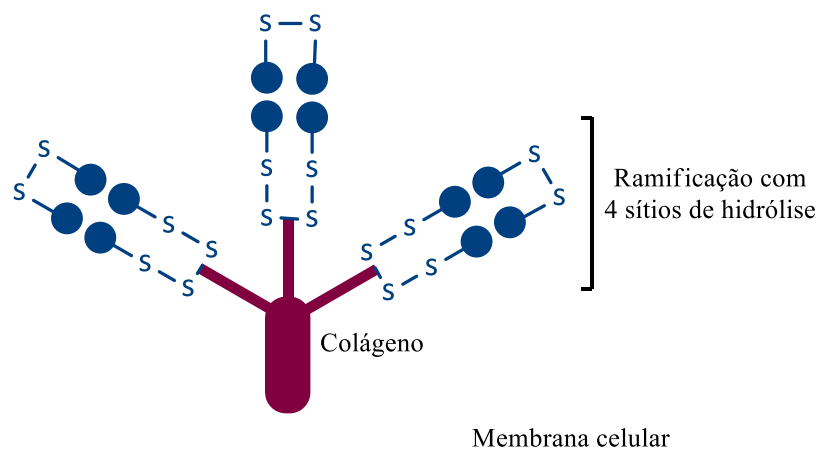
Figura 1.9: Síntese e hidrólise da acetilcolina.



Fonte: Adaptado de ARAÚJO *et al.*, 2016.

A AChE é uma enzima que apresenta três ramificações, ligadas por pontes dissulfeto (Figura 1.10), sendo ligada à membrana celular por colágeno. Cada ramificação é uma unidade enzimática composta por quatro subunidades proteicas, capazes de hidrolisar a acetilcolina. O que resulta em um total de 12 sítios ativos por cada unidade de enzima (PATRICK, 2009).

Figura 1.10: Desenho esquemático da acetilcolinesterase.



Fonte: Adaptado de ARAÚJO *et al.*, 2016.

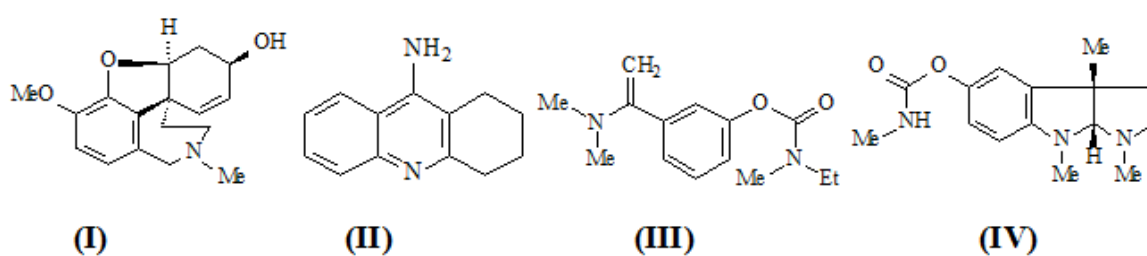
As subunidades catalíticas da AChE possuem aminoácidos que são fundamentais para sua atividade. Os resíduos dos aminoácidos, histidina e serina, são importantes para a hidrólise da ACh. Existem também dois pontos essenciais para a interação do neurotransmissor com a enzima. O primeiro é o sítio iônico, onde há uma interação entre a carga positiva do nitrogênio da ACh e a carga negativa produzida pelo resíduo de aspartato da AChE. O segundo é o sítio esteárico, onde o grupo éster da ACh faz ligação de hidrogênio com o resíduo de tirosina da AChE (BERGMANN *et al.*, 1950; WILSON; BERGMANN, 1950).

1.3.1 Inibidores da acetilcolinesterase

Acredita-se que a inibição da acetilcolinesterase (AChE) aumente a concentração de neurotransmissor acetilcolina nas sinapses, o que diminuiria ou retardaria a progressão dos sintomas da doença de Alzheimer. Alguns trabalhos apontam drogas provenientes de produtos naturais como possíveis inibidores da AChE, o que as tornaria eficazes no tratamento da DA.

Dentre essas drogas, é citada a galantamina (Figura 1.11 – I), um alcalóide isolado de plantas da família Amarilidaceae, que é um inibidor, já aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento da doença. É um inibidor da acetilcolinesterase de longa ação, seletivo, reversível e competitivo, o qual produz efeitos benéficos inclusive após o término do tratamento (LÓPEZ *et al.*, 2002). A galantamina é considerada a que apresenta ação mais efetiva e a que provoca menos efeitos colaterais. Devido a essas propriedades, a galantamina é considerada a droga mais efetiva no tratamento da DA, com poucas limitações (INGKANINAN, 2000). Contém ação moduladora sobre os receptores nicotínicos e baixa hepatotoxicidade. No entanto, sua associação com outras drogas requer cautela já que seu metabolismo usa o sistema do citocromo P450. Este medicamento só foi aprovado em 2001 para o tratamento da DA, mas foi usado ao longo dos anos para vários distúrbios neurológicos (ENGELHARDT *et al.*, 2005).

Figura 1.11: Inibidores comercializados da acetilcolinesterase: (I) galantamina, (II) tacrina, (III) rivastigmina e (IV) fisostigmina.



Fonte: Adaptado de FEITOSA *et al.*, 2015.

A tacrina (Cognex[®]) (Figura 1.11 – II) foi o primeiro medicamento aprovado para o tratamento da DA. É considerado um inibidor reversível não seletivo da acetilcolinesterase (AChE), que tem uma eficácia dependente da dose, meia-vida curta e alta incidência de efeitos adversos e hepatotoxicidade (ENGELHARDT *et al.*, 2005).

A rivastigmina (Exelon[®]) (Figura 1.11 – III) mostra boa atividade e tolerância em

pacientes com DA e não envolvem o sistema do citocromo P450 em seu metabolismo, reduzindo a possibilidade de ocorrência de interações medicamentosas, melhorando cognição e gerando efeitos neuroprotetores (SUGIMOTO *et al.*, 2002; ENGELHARDT *et al.*, 2005). Este fármaco provoca efeitos colaterais indesejáveis como náusea, vômito, diarreia, perda de apetite, tontura e tremor (FEITOSA, 2015).

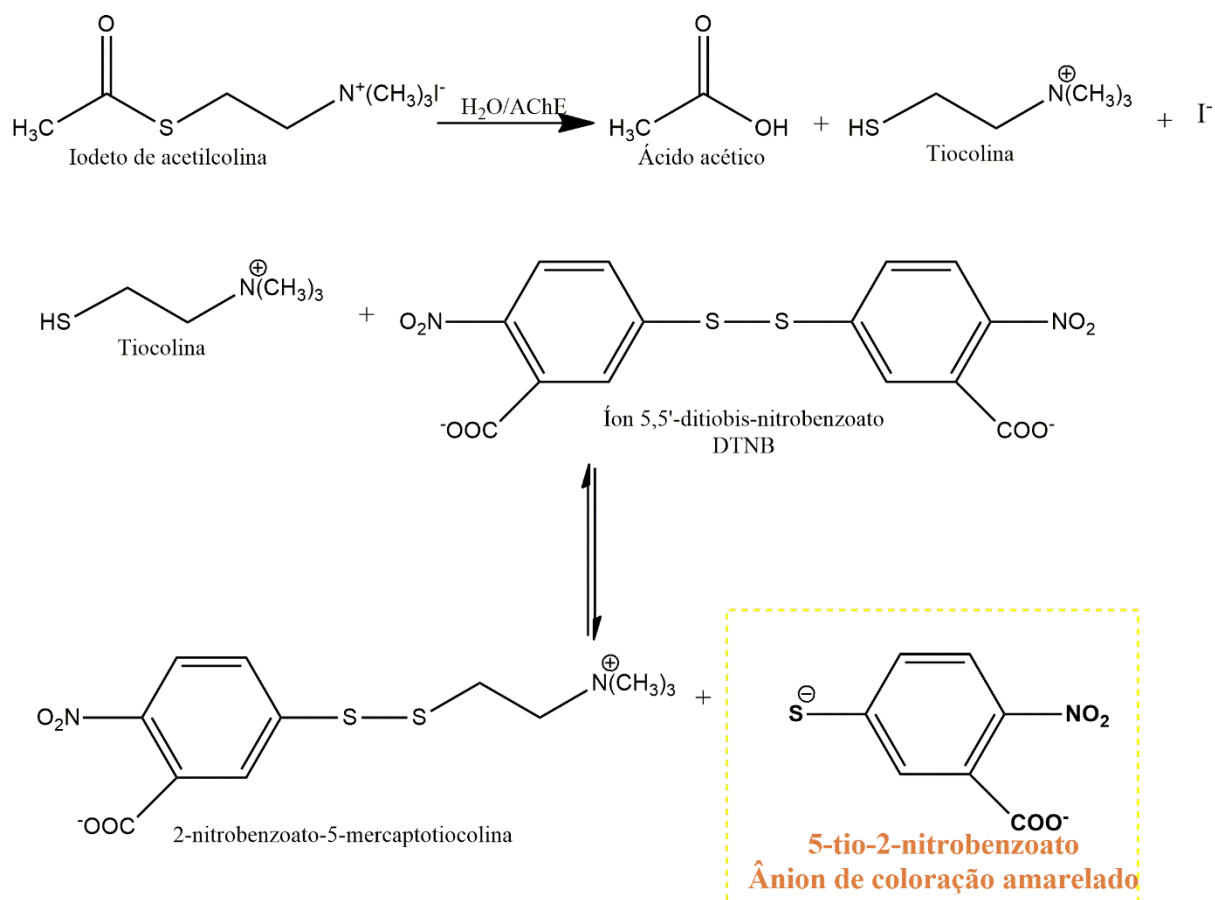
A fisostigmina (Synapton[®]) (Figura 1.11 – IV) apresenta eficácia apenas moderada, em seres humanos (INGKANINAN, 2000). Logo, é de grande importância a busca de novos inibidores, possivelmente presentes em produtos naturais que possam apresentar nenhum ou poucos efeitos colaterais e bom nível de eficácia no tratamento da DA.

1.3.2 Método de Ellman na determinação da atividade da AChE

Em 1961, Ellman e colaboradores propuseram o método colorimétrico mais empregado atualmente para a determinação da atividade da AChE. Este método foi desenvolvido pela combinação dos conhecimentos divulgados por Koelle (1951) e Ellman (1961), onde neste último é usado o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) [DTNB], chamado reagente de Ellman, na quantificação de compostos de enxofre em tecidos celulares (ELLMAN, 1961). O método de Ellman é baseado na taxa de hidrólise da acetiltiocolina (ACTI) pela AChE originando à tiocolina, que reage com o ânion carboxilato do DTNB, formando o 2-nitrobenzoato 5-mercaptotiocolina e um ânion de coloração amarela, o 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato, que é quantificado espectrofotometricamente.

A medida da atividade da AChE pode ser realizada segundo o método de Ellman (1961) modificado por Ingkaninan e colaboradores (2001) para cromatografia em camada delgada (CCD). O princípio desse método é a medida da razão de produção de tiocolina, quando o substrato iodeto de acetiltiocolina (ACTI) é hidrolisado pela AChE. A tiocolina ao reagir com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) produz o ânion de coloração amarelado, 5-tio-2-nitrobenzoato (Figura 1.12). A razão da produção da cor amarela é medida em espectrofotômetro (412 nm) ou é visualizada em cromatografia de camada delgada (CCD), através de manchas brancas em um campo amarelo. A doença de Alzheimer encontra-se relacionada com a diminuição do neurotransmissor acetilcolina.

Figura 1.12: Formação do ânion amarelo do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a tiocolina e o íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato.

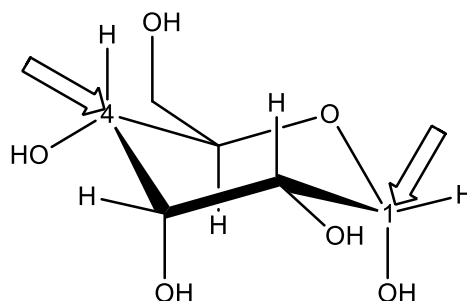


Fonte: Adaptado de FEITOSA *et al.*, 2015.

1.4 CICLODEXTRINAS (CD'S)

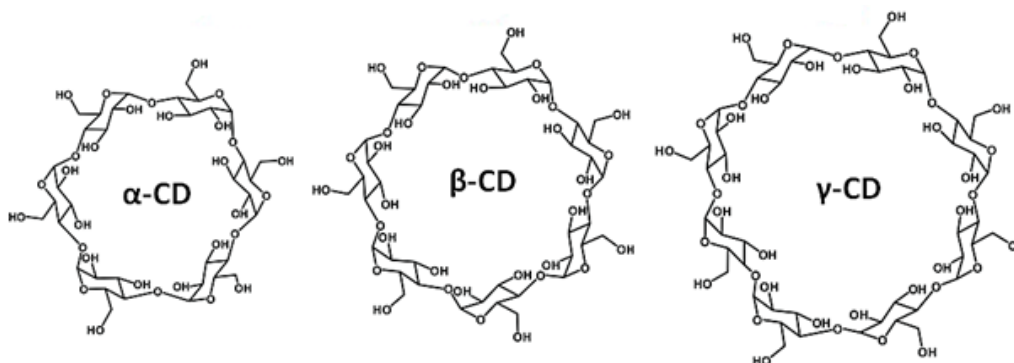
As ciclodextrinas (CD's) são oligossacarídeos cíclicos de origem natural, também conhecidas como cicloamilose ou cicloglucanos, formados por um número variável de unidades de D-(+)-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas α (1,4) (Figura 1.13), obtidas por ação da enzima ciclodextrina- α -glicosiltransferase (CGTase), sobre o amido pelo microorganismo *Bacillus macerans* (SZEJTLI, 1994). As ciclodextrinas naturais mais comuns apresentam seis, sete ou oito unidades de D-(+)-glicopirranose unidas por ligações α (1,4) denominadas α (alfa), β (beta) e γ (gama)-ciclodextrinas, respectivamente, formando os macrociclos demonstrados na Figura 1.14.

Figura 1.13: Molécula da α -D-glucopiranosose na conformação cadeira com as posições dos carbonos 1 e 4 indicadas pelas setas.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 1.14: Estruturas das ciclodextrinas naturais: α -CD; β -CD e γ -CD.



Fonte: NASCIMENTO, 2013.

Estas moléculas são conhecidas desde finais do século XIX, tendo sido isoladas pela primeira vez por Villiers em 1891 como produtos da degradação do amido por *Bacillus macerans*, cultivados em meio rico em amilose. Contudo, no início do século XX, foi Frank Schardinger que realizou o preparo, o isolamento, a caracterização e a determinação das estruturas dessas substâncias como sendo mistura de oligossacarídeos cíclicos, contendo um mínimo de 6 e um máximo de 12 unidades de D-(+)-glicopiranosose (em conformação de cadeira) unidas por ligação α -(1,4). As ciclodextrinas também são conhecidas na literatura por dextrinas de Schardinger (DUCHÉNE *et al.*, 1999), além de outras denominações. Após três décadas sem avanços significativos, Freudenberg e colaboradores descreveram as CD's como compostos macrocíclicos constituídos de unidades glicopiranosídeos conectadas através de ligação glicosídica α -(1,4) (WENZ, 1994).

Em meados do século XX, French e Freudenberg ampliaram o conhecimento sobre as CD's no que se refere a sua produção enzimática, fracionamento e a caracterização de suas

propriedades (WENZ, 1994). Paralelamente Cramer, Saenger e outros pesquisadores enfatizaram os estudos dessas substâncias na formação de complexos de inclusão entre as CD's e moléculas hóspedes (WENZ, 1994).

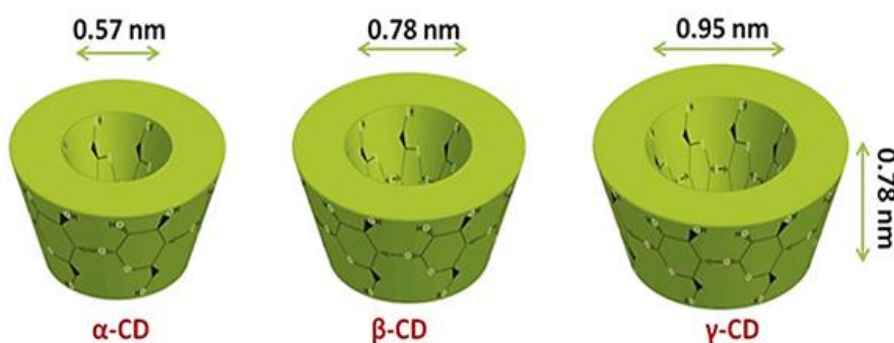
Por volta de 1975 as ciclodextrinas naturais já tinham sido caracterizadas estrutural e quimicamente e adicionalmente muitos complexos tinham sido estudados. Nesse sentido, devido à capacidade de complexação, ao baixo custo e as inúmeras vantagens que as CD's apresentam houve um grande avanço no desenvolvimento de novas tecnologias para sua produção e aplicação.

1.4.1 Estrutura e propriedades físico-químicas das ciclodextrinas

As ciclodextrinas são moléculas cristalinas, homogêneas, não higroscópicas que apresentam estrutura tronco-cônica (Figura 1.15). Elas se caracterizam por possuírem cavidade de natureza apolar, devido à formação de um anel de grupos C-H (C3), de um anel composto por átomos de oxigênio glicosídicos e, também, de um outro anel de grupos C-H do carbono C5, que contrasta com o exterior hidrofílico.

As unidades glicopiranosídicas apresentam a conformação C1, estando os grupos hidroxilas (OH) secundários ligados aos átomos de carbono C2 e C3 localizados ao redor da abertura maior da cavidade enquanto que os grupos OH primários, mais reativos, ligados aos átomos de carbono C6, ao redor da abertura menor e opostos aos grupos hidroxilas secundários. A cavidade é delimitada pelos átomos de hidrogênio e pelas ligações de oxigênio glicosídicas. Os pares de elétrons não-ligantes do oxigênio estão direcionados para o interior da cavidade, produzindo alta densidade eletrônica resultando num ambiente com característica de base de Lewis (SZEJTLI, 1998).

Figura 1.15: Estruturas tronco-cônicas das ciclodextrinas naturais.



Os grupos hidroxilas posicionados externamente conferem características hidrofílicas às CD's tornando-as mais solúveis em água e insolúveis na maioria dos solventes orgânicos. O interior da cavidade é constituído por dois anéis de grupos C-H e por um anel de átomos de oxigênio glicosídicos conferindo ao seu interior características hidrofóbicas, onde as moléculas hóspedes ou parte delas são encapsuladas, conferindo propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade, moléculas hidrofóbicas (BRITTO *et al.*, 2004; BREWSTER; LOFTSSON, 2007; CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009)

Os membros mais comuns da família das ciclodextrinas são os de seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopirranose. Por razões estereoquímicas, membros com menor número de unidades não se formam e ciclodextrinas com mais de oito unidades de D-(+)-glicopirranose não parecem apresentar grande interesse, apesar de existirem estudos sobre as propriedades físico-químicas e a capacidade em formar complexos de inclusão da δ -ciclodextrina, o homólogo com nove unidades de D-(+)-glicopirranose (SZEJTLI, 1994; MIYAZAWA *et al.*, 1995).

A cavidade das ciclodextrinas pode acomodar moléculas, ou parte de moléculas, no seu interior, sem que haja o estabelecimento de ligações covalentes entre as duas entidades. A este fenômeno denomina-se complexação e pode ocorrer quer em solução, quer no estado sólido (SALTÃO; VEIGA, 2001). Cada CD tem a sua própria capacidade de formar complexos de inclusão com substâncias específicas, uma habilidade que depende de um bom ajuste da molécula hóspede na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina (UEKAMA *et al.*, 1998). A solubilidade das ciclodextrinas, em água, apresenta uma tendência irregular, crescente na ordem: β -CD, α -CD e γ -CD, sendo a β -CD uma ordem de grandeza menos solúvel que as demais (EGÍDIO, 2005). Algumas propriedades físico-químicas das ciclodextrinas encontram-se enumeradas na Tabela 1.4.

Tabela 1.4: Propriedades físico-química das ciclodextrinas naturais.

	α -CD	β -CD	γ -CD	δ -CD
Nº unidades glicose	6	7	8	9
Massa molecular (g/mol)	972	1135	1297	1459
Sol. aquosa (g/100 mL a 25 °C)^a	14,5	1,85	23,2	8,19
Diâmetro da cavidade (Å)^a	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3	10,3-11,2
Altura (Å)	6,7	7,0	7,0	7,0
Volume da cavidade (Å³)	174	262	427	-

CAPÍTULO 1

Forma dos cristais	lâminas hexagonais	paralelogramas monoclínicos	prismas quadráticos	-
PKa	12,332	12,202	12,081	-
Ponto de fusão (°C)	275	280	275	-
Tensão superficial (nM/m)^a	73	73	73	72
Vel. hidrólise ácida (h⁻¹)^a	0,11	0,13	0,23	0,63

Fonte: Adaptado de SZEJTLI, 1994; ^a MIYAZAWA *et al.*, 1995.

O tamanho da cavidade aumenta com o aumento do número das unidades de D-(+)-glicopiranosose, no entanto, a altura permanece constante em 6,7-7,0 Å. Apesar desta aparente tendência no aumento do tamanho na série de α -CD, β -CD e γ -CD, a solubilidade não segue esta ordem. A β -CD é consideravelmente a que tem menor solubilidade aquosa (Tabela 1.4). Essa baixa solubilidade pode ser causada pela formação de ligações de hidrogênio entre os grupos OH secundários ligados aos átomos de carbono C2 e C3 levando a rigidez da estrutura. Na molécula de α -CD uma unidade de D-(+)-glicopiranosose está numa posição distorcida, portanto somente 4 das 6 possíveis ligações de hidrogênio são estabelecidas. Por outro lado, as unidades de D-(+)-glicopiranosose na molécula de γ -CD não são coplanares, com a estrutura de sua molécula sendo mais flexível e por consequência é mais solúvel (WENZ, 1994).

O tamanho da cavidade constitui o fator determinante através dos quais as CD's são usadas para complexar outras moléculas. Se a molécula hóspede tiver dimensões maiores que as da cavidade da CD, ela não consegue entrar completamente na cavidade e, por outro lado, se tiver tamanho muito pequeno, ela acaba por passar pela cavidade sem ser complexada. O hóspede e o hospedeiro podem se associar sem quaisquer interações específicas, sendo o processo determinado pela forma, isto é, pela estrutura e pelo tamanho da molécula a ser inserida. A molécula de α -CD apresenta menor cavidade sendo por consequência incapaz de acomodar moléculas grandes, ao contrário do que ocorre com a β -CD e γ -CD. A β -CD possui cavidade com tamanho adequado para conter uma ou duas moléculas de um grande número de substâncias com atividades farmacológicas (MACEDO, 2010). Razão pela qual ela é uma das mais utilizadas no processo de encapsulamento de fármacos.

As vantagens de utilização das CD's para entrega de fármacos são: aumenta a biodisponibilidade; aumenta a solubilidade; aumenta a estabilidade através da encapsulação; aumenta a eficácia e índice terapêutico; reduz a toxicidade; diminui os efeitos colaterais adversos e melhora os efeitos farmacocinéticos (UEKAMA *et al.*, 1998).

Diversos fatores determinam o tipo e a natureza da CD necessária para um tratamento terapêutico específico, ou seja, para cada fármaco é possível utilizar uma CD mais adequada. As variáveis que auxiliam nessa escolha são: natureza química do fármaco; tamanho da cavidade; solubilidade; facilidade de preparação; possibilidade de co-encapsulação e eficiência de encapsulação (MACEDO, 2010).

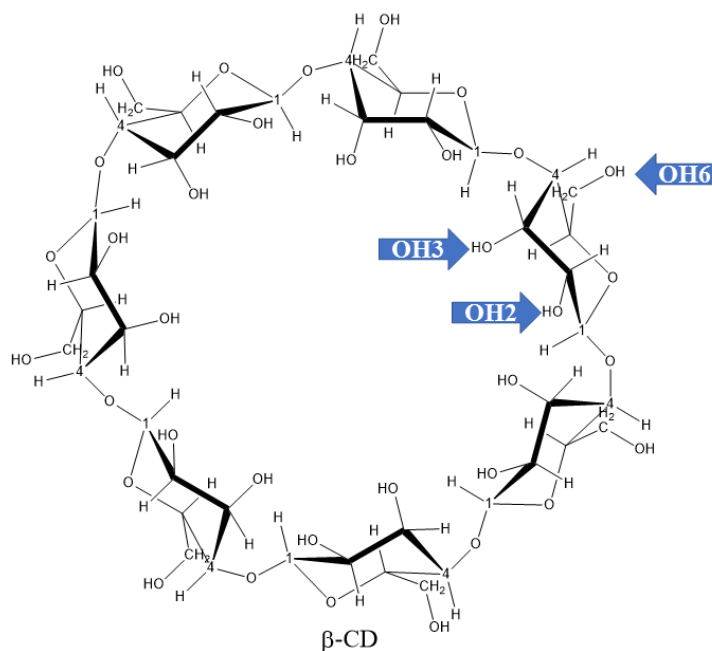
1.4.2 Derivados das ciclodextrinas

As CD's naturais apresentam algumas limitações quer devido à sua baixa solubilidade aquosa e em solventes orgânicos, quer à toxicidade que apresentam quando utilizadas em preparações parenterais. As características de inclusão das CD's naturais podem ser modificadas pela introdução de substituintes nos grupos hidroxilas disponíveis. As alterações na estrutura das CD's, em geral, são realizadas pela substituição dos grupos hidroxilas primários (OH6) e/ou nos grupos hidroxilas secundários (OH2 e OH3) (Figura 1.16) por diversos grupos funcionais, sendo classificadas em derivados hidrofílicos (grupos metil e hidroxipropil), hidrofóbicos (grupos acetil e etil), anfífilas (estruturas de micelas) e derivados iônicos (sulfobutilo-éter) (UEKAMA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2006).

A dimetil- β -ciclodextrina normalmente apresenta melhores características de inclusão, especialmente no que diz respeito à dimensão da cavidade apolar, do que a β -ciclodextrina. O uso de derivados lipofílicos (etilados ou acetilados) permite que moléculas hidrofílicas possam ser incluídas na cavidade das ciclodextrinas a partir de solventes menos polares do que o interior da cavidade (UEKAMA; OTAGIRI, 1987). Se atendermos à ciclodextrina natural mais usada (β -CD) o elevado número de grupos hidroxila que possui (sete primários e quatorze secundários) são potenciais pontos de reação, que permitem produzir modificações estruturais funcionalizando o anel macrocíclico. Surge, assim, grande variedade de estruturas adaptadas ao desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos (DUCHÊNE; WOUESSIDJEWÉ, 1996; HIRAYAMA; UEKAMA, 1999).

Com o intuito do aprimoramento das propriedades físico-químicas e capacidade de inclusão das ciclodextrinas naturais como novos veículos de fármacos, recentemente, vários tipos de derivados semi-sintéticos de ciclodextrinas foram elaborados, utilizando como ponto de partida as CD's naturais, com elevada capacidade de reconhecimento molecular e solubilidade aquosa, como a hidroxipropil-CD (HP-CD), a sulfo-butil-éter-CD (SB-CD) e a metil-CD randomizada (RMCD), ampliando suas possibilidades de utilização (UEKAMA *et al.*, 1998; CUNHA-FILHO; SÁ BARRETO, 2007).

Figura 1.16: Sítios de modificação mais frequentes na β -CD.



Fonte: Arquivo pessoal.

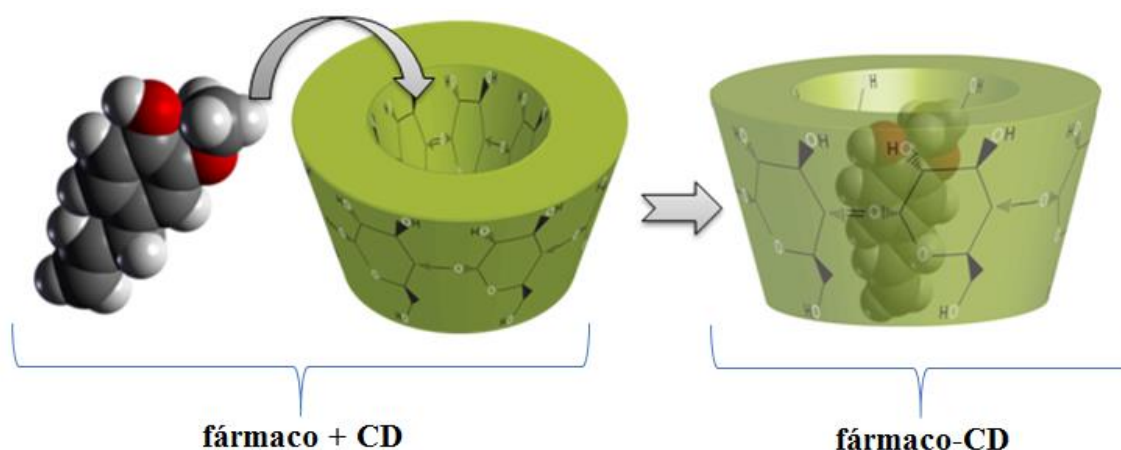
Entre as CD's, a β -CD é amplamente a mais utilizada devido ao tamanho adequado de sua cavidade para a maior gama de medicamentos, com pesos moleculares entre 200 e 800 g mol⁻¹ e, também, devido à sua pronta disponibilidade e preço razoável. Todavia a baixa solubilidade aquosa e nefrotoxicidade limitam a utilização da β -CD especialmente por via parentérica, sendo restrita a concentrações bastante baixas (CHALLA *et al.*, 2005; CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

1.5 COMPLEXO DE INCLUSÃO (CI)

Os complexos de inclusão são compostos moleculares com a estrutura característica de um aduto, em que uma substância (hospedeira) permite a inserção de uma outra substância (hóspede) em sua cavidade (SALTÃO; VEIGA, 2001). As CD's apresentam-se como potenciais candidatas à formação de complexos de inclusão (Figura 1.17), uma vez que as mesmas possuem uma cavidade para o efetivo processo. Como característica principal, os complexos moleculares possuem um caráter dinâmico na sua formação. Todavia, há fatores que condicionam a formação de CI. O fator mais importante para a formação do CI é a compatibilidade geométrica, isto é, o requisito mínimo necessário para que se forme o complexo é a compatibilidade de tamanhos e a geometria entre a cavidade da CD e da molécula

hóspede. Esta compatibilidade de tamanhos pode não corresponder à totalidade da molécula a ser incluída. Existem casos em que apenas uma parte da estrutura do hóspede fica incluído na cavidade. A polaridade desse fragmento é um fator determinante da formação do complexo de inclusão. Temos, ainda, de considerar o caráter hidrofóbico da molécula hóspede (UEKAMA; OTAGIRI, 1987).

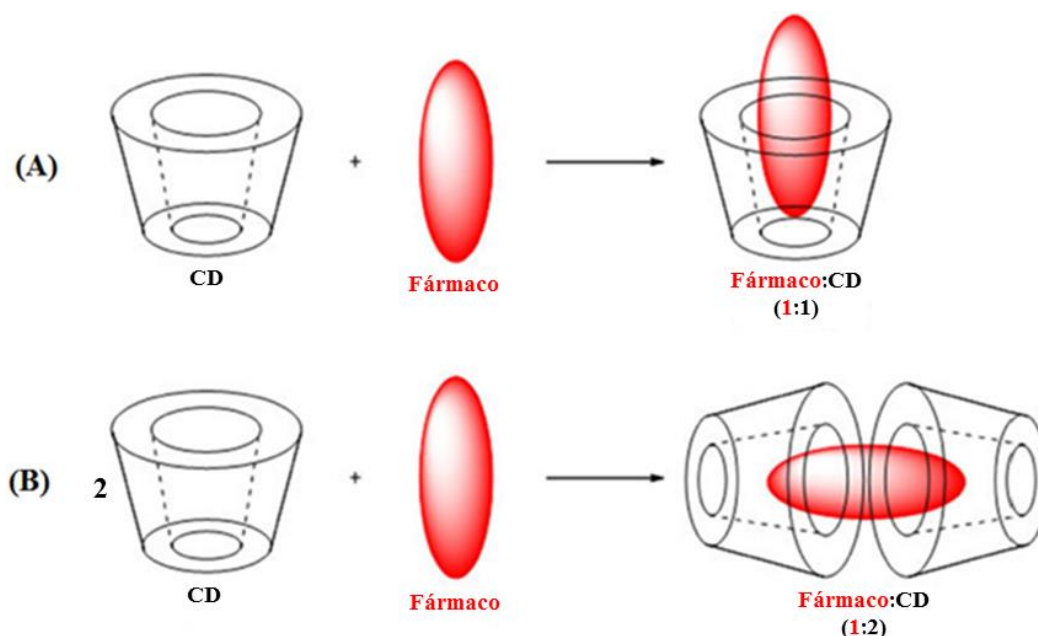
Figura 1.17: Possível formação de complexo de inclusão entre um fármaco com CD.



As forças envolvidas no processo de formação dos complexos são, ainda, objeto de discussão na comunidade científica. Sabe-se que não se trata apenas de interação apolar clássica. Estão envolvidas forças de Van de Walls, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e alguns autores apontam, também, a liberação de energia devido à substituição de moléculas de água por outras menos polares e devido a alterações conformacionais, que contribuem para a formação e estabilização do complexo (ANGUIANO-IGEA, 1992).

Interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, transferências de cargas e efeitos estéreos também contribuem para formação e estabilização dos complexos de inclusão. De uma forma generalizada, nenhuma interação fraca individualmente é capaz de levar à interação específica de duas moléculas e tal fato somente pode ocorrer através da cooperação de diversas interações fracas simultâneas. Desta forma, as moléculas interagem umas com as outras à medida que são influenciadas por forças decorrentes das características próprias de cada substância. Ocorre então, um fenômeno complexo de interação molecular, uma vez que cada interação corresponde a um conjunto de forças distintas (VENTURINI *et al.*, 2008). Na Figura 1.18 mostra a formação de complexos fármaco-ciclodextrina com estequiometria 1:1 e 1:2.

Figura 1.18: Formação de complexos CD-fármaco com estequiometria 1:1 (A) e 2:1 (B).



Fonte: Adaptado de NASCIMENTO, 2013.

As propriedades físico-químicas dos fármacos e das CD's na forma livre são diferentes daquelas apresentadas quando estão complexados; a molécula hóspede (fármaco) experimenta mudanças nas propriedades físico-químicas quando é incorporada à cavidade da CD, por isso é importante a caracterização do produto obtido a fim de confirmar a formação do CI e determinar suas propriedades (SINGH *et al.*, 2010). Com base nisso, qualquer metodologia que tenha sensibilidade suficiente para medir estas diferenças pode ser utilizada para caracterizar estes complexos sob diferentes pontos de vista, permitindo direcionar os fenômenos de inclusão de acordo com as necessidades. Os CI's formados entre moléculas hóspedes e ciclodextrinas podem ser caracterizados tanto no estado sólido, quanto em solução, a partir de técnicas que se complementam para elucidar as propriedades do novo composto (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; SINGH *et al.*, 2010).

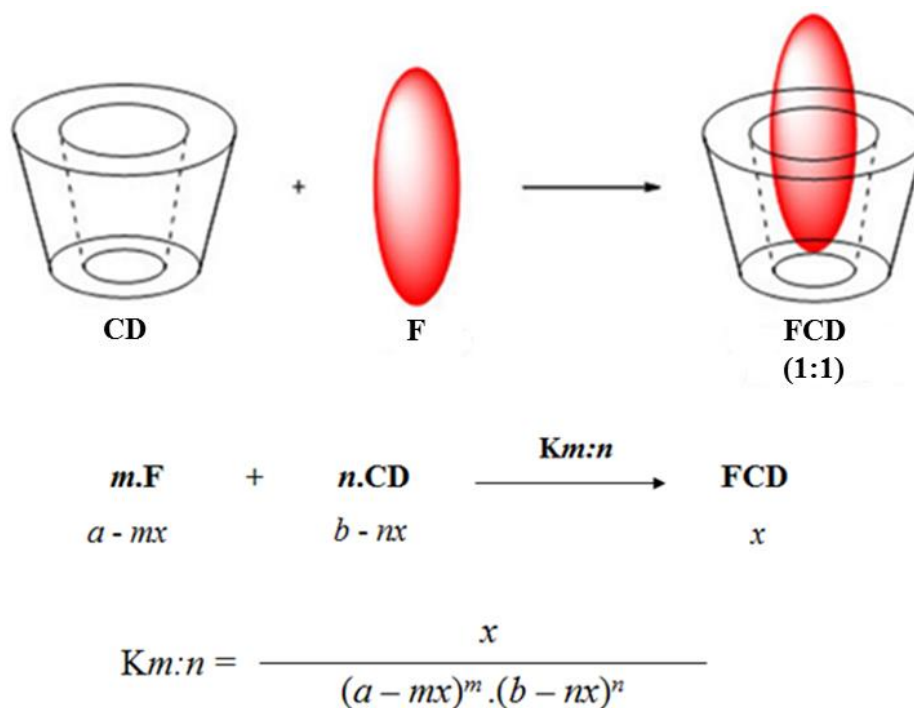
No estado sólido, o CI pode ser caracterizado a partir de análise térmica; microscopia eletrônica de varredura; difração de raios X; teste de dissolução e espectroscopia no infravermelho. Porém, no estado líquido, técnicas eletroquímicas; diagrama de solubilidade de fases; métodos espectroscópicos; ressonância magnética nuclear (RMN) e microcalorimetria são mais utilizadas (MEIRELLES, 2012).

A associação do fármaco à ciclodextrina (Figura 1.19) é governada por uma constante de estabilidade aparente ($K_{m:n}$) em que F , CD e FCD representam, respectivamente, a molécula hóspede, a ciclodextrina e o complexo de inclusão; x é a concentração molar do

CAPÍTULO 1

complexo e a e b são as concentrações iniciais da molécula hóspede e da ciclodextrina, respectivamente; m representa a quantidade de molécula hóspede e n representa quantidade de ciclodextrina.

Figura 1.19: Esquema da formação de um complexo de inclusão fármaco:ciclodextrina com uma estequeometria de 1:1 e equação geral do equilíbrio descrito.



Fonte: Adaptado de SALTÃO; VEIGA, 2001.

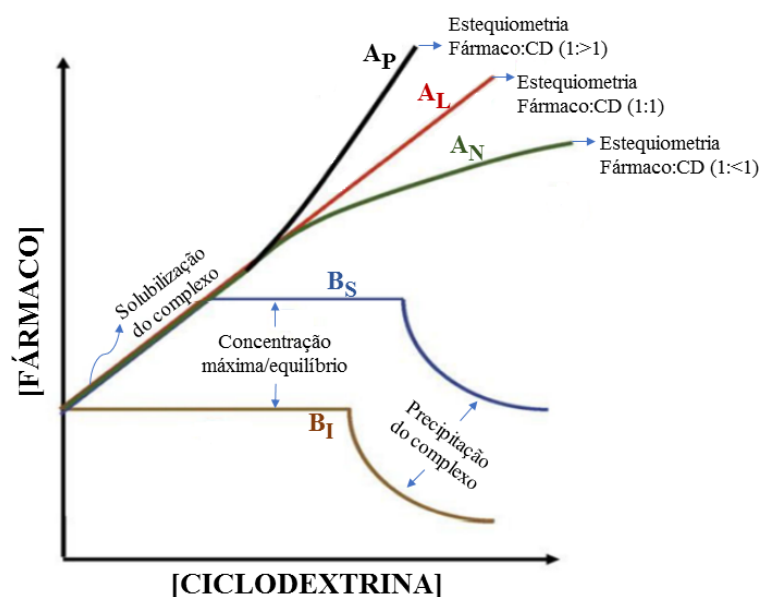
A constante de estabilidade aparente assim definida funciona como um índice de alteração das propriedades físico-químicas de um composto após a inclusão. O método mais usado para a detecção da formação de complexos em solução é o método da solubilidade de fases descrito por Higuchi e Connors (1965).

1.6 DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE FASES

O diagrama de solubilidade de fases é uma técnica clássica para verificação da formação do complexo de inclusão, a partir da constante de estabilidade aparente e de sua estequiometria. Esta técnica foi desenvolvida e interpretada por Higuchi e Connors (1965), sendo uma abordagem bastante utilizada, pois permite avaliar os diferentes comportamentos dos fármacos adicionados em excesso a volumes fixos de soluções aquosa de ciclodextrinas em concentrações

crecentes, permitindo obter a constante de estabilidade aparente (K) e a estequiometria de formação do complexo, a partir da solubilidade intrínseca do substrato (S_0), e a inclinação da reta resultante do diagrama de solubilidade; podendo ser classificados em dois tipos: A e B como pode ser observado na Figura 1.20 (LYRA *et al.*, 2010; MEIRELLES, 2012).

Figura 1.20: Tipos de diagramas de solubilidade de fases obtidos a partir da complexação de fármacos com ciclodextrinas.



Fonte: Adaptado de MEIRELLES, 2012.

No sistema A, ocorre um aumento gradual da solubilidade do fármaco em função da concentração de ciclodextrina, com subtipos A_L , A_P e A_N , de acordo com o perfil de inclinação da reta. Complexo de tipo A_L apresenta estequiometria 1:1 e tem solubilidade do fármaco aumentada em função do aumento da concentração de CD, ao passo que, complexos dos tipos A_P e A_N possuem estequiometria maior e menor que 1, respectivamente, em relação a CD, haja visto que as suas retas sofrem desvios, caracterizando a maior ou menor solubilidade do complexo em relação ao fármaco livre (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; LYRA *et al.*, 2010).

Por outro lado, o sistema B representa complexo cuja solubilidade aquosa é limitada, subdividindo-se em dois tipos B_S e B_I . O complexo tipo B_S apresenta um incremento inicial de solubilidade, seguido por um equilíbrio e, ao atingir o limite de solubilidade, precipita-se. O outro complexo, B_I , não possui solubilidade diferente do fármaco livre, mantendo o equilíbrio até que inicie a precipitação do complexo formado (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; LYRA *et al.*, 2010).

1.7 TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO

São utilizados diversos métodos na obtenção dos complexos de inclusão com CD's, pois cada substância a ser complexada na cavidade da ciclodextrina tem suas características próprias, as quais devem ser observadas para determinar a melhor metodologia. A preparação de complexo de inclusão é bastante simples. O procedimento mais comumente utilizado é agitar ou misturar a CD numa solução aquosa (fria ou quente; neutra, alcalina ou ácida) contendo a molécula a ser inserida (SZEJTLI, 1998).

São diversos os métodos de preparação dos complexos de inclusão, dentre eles as técnicas de mistura física; evaporação; co-precipitação; precipitação por neutralização; malaxagem; atomização; co-evaporação do solvente; liofilização; irradiação de microondas; e anti-solvente supercrítico (MEIRELLES, 2012).

De acordo com Uekama e colaboradores (1998) os métodos mais utilizados para obtenção de CI com ciclodextrinas são:

- 1) Co-precipitação – neste método adiciona uma solução do convidado (fármaco) a uma solução aquosa de CD. Caso seja preciso utilizar um solvente diferente da água para solubilizar a molécula convidada, deve-se escolher um solvente que seja solúvel na água. A mistura é então agitada até atingir o equilíbrio e o complexo sólido é obtido por evaporação a vácuo ou por liofilização.
- 2) Suspensão – neste método o convidado sólido é adicionado a uma solução aquosa de CD formando uma suspensão, a qual é agitada vigorosamente e filtrada. O complexo solubilizado na solução obtida (filtrado) é coletado também por evaporação a vácuo ou por liofilização.
- 3) Empastagem (*Kneading*) – assim como na suspensão, nesta técnica o convidado sólido adicionado a uma mistura de solução aquosa de CD. Entretanto, é utilizada somente 0,5 parte de água por parte de CD. O complexo sólido pode ser removido sob vácuo ou por aquecimento.
- 4) Moagem conjunta ou malaxagem (*Grinding*) – nesse método misturam-se a CD e a molécula convidada no estado sólido, as quais são trituradas vigorosamente por um determinado tempo na presença de uma pequena quantidade de água até que a mistura se torne pó.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 414-420, 2010.

CAPÍTULO 1

ADEGOKE, G. O.; KUMAR, M. N.; GOPALAKRISHNA, A. G.; VARDARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 283-298, 1998.

AGUIAR, L. P.; FIGUEIREDO, R. W.; ALVES, R. E.; MAIA, G. A.; SOUZA, V. A. B. D. Caracterização física e físico-química de frutos de diferentes genótipos de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, 2008.

ALVES, S. M.; JENNINGS, W. G. Volatiles composition of certain Amazonian fruits. **Food Chemistry**, v. 4, p. 149-159, 1979.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.

ANGUIANO-IGEA, S. **Incorporacion de principios activos liquidos a dispersiones solidas y complejos de inclusion con ciclodextrinas. Estudio y caracterizacion con el clofibrato. Compostela** [Tesis doctoral. Departamento de Farmacologia, Farmacia y Tecnologia Farmaceutica, Universidad de Santiago de Compostela]. 226 p. 1992.

ARAÚJO, E. C. et al. Use of medicinal plants by patients with cancer of public hospitals in João Pessoa (PB). **Revista Espaço para a Saúde**, v. 8, n. 2, p. 44-52, 2007.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES A. A. Acetilcolinesterase – AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.

BAGGETT, S.; PROTIVA, P.; MAZZOLA, E. P.; YANG, H.; RESSLER, E. T.; BASILE, M. J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive Benzophenones from *Garcinia xanthochymus* Fruits. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 354-360, 2005.

CAPÍTULO 1

BAPTISTA F. I.; HENRIQUES, A. G.; SILVA, A. M.; WILTFANG, J.; CRUZ E SILVA, O. A. Flavonoids as therapeutic compounds targeting key proteins involved in Alzheimer's disease. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 83-92, 2014.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews**, v. 3, n. 3, p. 205-214, 2004.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil Minas Gerais: Viçosa**, 309 p. 2002.

BENTES, M. H. S.; SERRUYA, H.; ROCHA FILHO, G. N.; GODOY, R. L. O.; SILVA CABRAL, J. A.; SOARES MAIA, J. G. Estudo químico das sementes de bacuri. **Acta Amazonica**, v. 16, p. 363-368, 1986.

BERGMANN, F.; WILSON, I. B.; NACHMANSOHN, D. Acetylcholinesterase IX. Structural features determining the inhibition by amino acids and related compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 186, p. 693, 1950.

BERMAN, K.; BRODATY, H. Tocopherol [vitamin E] in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. **CNS Drugs**, v. 18, n. 12, p. 807-825, 2004.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BILANDA, D. C.; DIMO, T.; DZEUFLET DJOMENI, P. D.; BELLA, N. M. T.; ABOUBAKAR, O. B. F.; NGUELEFACK, T. B.; TAN, P. V.; KAMTCHOUING, P. Antihypertensive and antioxidant effects of *Allanblackia floribunda* Oliv. (Clusiaceae) aqueous. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 634-640, 2010.

BIRD, T. D. **Doença de Alzheimer e outras demências primárias**. In: HARRISON, Tinsley R. *Medicina Interna Volume II*. Rio de Janeiro: Mc Graw, 1998.

BORS, W. *et al.* Plasm levels of lipophilic antioxidant vitamins in acute ischemic stroke patients: correlation to inflammation markers and neurological deficits. **Nutrition**, v. 21, n. 10, p. 987-993, 2005.

BOUDJELAL, A.; HENCHIRI, C.; SARI, M.; SARRI, D.; HENDEL, N.; BENKHALED, A.; RUBERTO, G. Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): Na ethnopharmacology survey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 395-402, 2013.

BOULANGER, R.; CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. Free and bound components of Amazonian fruits.1: Bacuri. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 303-311, 1999.

BRAGA, R. **Plantas medicinais do Nordeste, especialmente do Ceará**: Mossoró: ESAM, 1976.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.

BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO JR, C. S.; SANTOS, H. F. D. Structural analysis of cyclodextrins: a comparative study of classical and quantum mechanical methods. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 882-888, 2004.

CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36. n. 4, p. 433-446, 2003.

CARDOSO, C. R. B.; SOUZA, M. A.; FERRO, E. A. V.; FAVORETO, J. R.; PENA, J. D. O. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound repair and regeneration**, v. 12, n. 2, p. 235-243, 2004.

CASANI, S.; GÓMEZ-PASTOR, R.; MATELLANA, E.; PARICIO, N. Antioxidant compound supplementation prevents oxidative damage in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 61, p. 151-160, 2013.

CAPÍTULO 1

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 4. ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, p. 48-50, 1988

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 6, n. 2, p. E329-E357, 2005.

CHANG, C. Y.; CHEN, J. Y.; KE, D.; HU, M. L. Plasma levels of lipophilic antioxidant vitamins in acute ischemic stroke patients: correlation to inflammation markers and neurological deficits. **Nutrition**, v. 21, n. 10, p. 987-993, 2005.

CHATURVEDI, R. K.; FLINT BEAL, M. Mitochondrial Diseases of the Brain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, n. 1, p. 1-29, 2013.

CHEN, X. Q.; LI, Y.; CHENG, X.; WANG, K.; HE, J.; PAN, Z. H.; LI, M. M.; PENG, L. Y.; XU, G.; ZHAO, Q. S. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols and chromone O-glucosides from *Hypericum henryi* subsp. *Uraloides*. **Chemistry and biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 196-204, 2010.

CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F. Pós-colheita de frutos e hortaliças: Glossário. **Lavras, UFLA**, 256 p, 2005.

CHOI, S. M.; KIM, B. C.; CHO, Y. H.; CHOI, K. H.; CHANG, J.; PARK, M. S. *et al.* Effects of Flavonoid Compounds on β -amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons. **Chonnam Medical Journal**, v. 50, n. 2, p. 45-51, 2014.

CIOCHINA, R.; GROSSMAN, R. B. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 3963-86, 2006.

CONI, E.; PODESTÀ, E.; CATONE, T. Oxidizability of different vegetables oils evaluated by thermogravimetric analysis. **Thermochimica Acta**, v. 418, n. 1-2, p. 11-15, 2005.

CORNELLI, U. Treatment of Alzheimer's disease with a cholinesterase inhibitor combined with antioxidants. **Neurodegenerative Diseases**, v. 7, n. 1-3, p. 193-202, 2010.

CAPÍTULO 1

CORP, N.; PENDRY, B. The role of Western herbal medicine in the treatment of gout. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, p. 157-170, 2013.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; FILHO, B. A. B.; FEITOSA, C. M.; CITO, A. M. G. L.; FREITAS, R. M, *et al.* Evaluation of in vitro antioxidant effects of garcinielliptona fc (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 2, p. 293-299, 2011a.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; SOUSA, T. O.; SILVA, R. A. C.; LIMA, S. G.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; CAVALCANTE, A. A. C.; FREITAS, R. M.; MOURA SPEROTTO, A. R. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. seed. **Basic Clinical Pharmacology e Toxicology**, v. 112, n. 1, p. 34-41, 2012.

COSTA JUNIOR, J. S.; ALMEIDA, A. A. C.; FERRAZ, A. B. F.; ROSSATTO, R. R.; SILVA, T. G.; SILVA, P. B. N.; MILITÃO, G. C. G.; CITO, A. M. G. L.; SANTANA, L. C. L. R.; CARVALHO, F. A. A.; FREITAS, R. M. Citotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 4 - 5, p. 470-474, 2013a.

COX, C. J.; CHOUDHRY, F.; PEACEY, E.; PERKINTON, M. S.; RICHARDSON, J. C.; HOWLETT, D. R. *et al.* Dietary [-]-epicatechin as a potent inhibitor of $\beta\gamma$ -secretase amyloid precursor protein processing. **Neurobiology of Aging**, v. 36, n. 1, p. 178-187, 2015.

CRICHTON, G. E.; BRYAN, J.; MURPHY, K. J. Dietary antioxidants, cognitive function and dementia-a systematic review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 3, p. 279-292, 2013.

CUESTA-RUBIO. O.; FRONTANA-URIBE. B. A.; RAMIREZ-APAN, T.; CARDENAS, J. Polyisoprenylated benzophenones in cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, v. 57, p. 372-378, 2002.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

DUCHÊNE, D, WOUESSIDJEW, D., PONCHEL, G. Cyclodextrins and carrier systems. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 62, p. 263-268, 1999.

DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEW, D. Amphiphilic cyclodextrins and targeting of drugs. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CYCLODEXTRINS, 8., Budapest, **Proceedings. Netherlands: Kluwer Academic Publishers**, p. 423-430, 1996.

DUPUIS, L. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases. **Biochimie**, v. 100, p. 177-183, 2014.

DYSKEN, M. W. *et al.* Vitamin E and memantine in Alzheimer's disease: clinical trial methods and baseline data. **Alzheimers Dement**, v. 10, n. 1, p. 36-44, 2014.

EGÍDIO, F. C. **Estudo sobre a solvatação de ciclodextrinas por RMN através da relaxação das moléculas de água.** Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 94 p. 2005.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, D.K., ANDRES, VJr, FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.; VALE, F. A. C. Treatment of Alzheimer's Disease: recommendations and suggestions of the Scientific department of cognitive neurology and aging of the Brazilian academy of neurology. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 1104-1112, 2005.

ETMINAN, M.; GILL, S. S.; SAMII, A. Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 4, n. 6, p. 362-365, 2005.

FANG, L. H.; UM, Y. M.; LIN, L. L.; XIAO, P. G.; DU, G. H. Vasorelaxant effect of euanthone in the rat thoracic aorta. **Vascular pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 96-101, 2006.

FEITOSA, C. M. **Plantas medicinais e a doença de Alzheimer**. Editora Átomo &Alinea, 2015.

FEITOSA, C. M.; CAVALCANTE, A. N.; CHAVES, S. K. M.; ARAÚJO, L. S. Medicinal plants of Brazil and Alzheimer's disease: Evolution in traditional use and pre-clinical studies. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 58, p. 01-13, 2016.

FERREIRA, M. S. G. **Manejo da espécie *Platonia insignis* Mart – Bacurizeiro, em florestas secundárias da Amazônia Oriental: proposta para uma produção sustentável**. Tese de Doutorado, Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília, Brasília, DF. Brasília, 246 p. 2008.

FOERSTER, B. R.; WELSH, R. C.; FELDMAN, E. L. 25 years of neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 9, p. 513-524, 2013.

FONTENELE, M. A.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; ALVES, R. E.; SOUSA, P. H. M. D.; SOUZA, V. A. B. D. Conservação pós-colheita de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) sob refrigeração e embalado em PVC. **Revista Ceres, Viçosa**, v. 57, p. 292-296, 2010.

FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N.S. Aroma of minor tropical fruits. **Flavour and fragrance journal**, v. 20, p. 358-371, 2005.

FRANK, J.; CHIN, X. W.; SCHRADER, C.; ECKERT, G. P.; RIMBACH, G. Do tocotrienols have potential as neuroprotective dietary factors? **Ageing Research Reviews**, 2012, v. 11, n. 1, p. 163-180, 2012.

FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, G. L. S. Determinação de parâmetro do estresse oxidativo *in vitro* em modelos de doenças neurodegenerativas. In: **Plantas medicinais e a doença de Alzheimer**. Editora Átomo, Campinas, SP, 2015.

CAPÍTULO 1

GIORDANO, S.; DARLEY-USMAR, V. ZHANG, J. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. **Redox Biology**, v. 2, p. 82-90, 2014.

GUSTAFSON, K. R.; BLUNT, J. W.; MUNRO, M. H. G.; FULLER, R. W.; MCKEE, T. C.; CARDELLINA II, J. H.; MCMAHON, J. B.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. Theguttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia*, and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, n. 46, p. 10093-10102, 1992.

HA, W. Y.; WU, P. K.; KOK, T. W.; LEUNG, K. W.; MAK, N. K.; YUE, P. Y. K.; NGAI, S. M.; TSAI, S. N.; WONG, R. N. S. Involvement of protein kinase C and E2F-5 in euxanthone-induced neurite differentiation of neuroblastoma. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 1393-1401, 2006.

HAGL, S.; GREWAL, R.; CIOBANU, I.; HELAL, A.; KHAYYAL, M. T.; MULLER, W. E. *et al.* Rice bran extract compensates mitochondrial dysfunction in a cellular model of early Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 43, n. 3, p. 927-938, 2015.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. 2. ed. London: Taylor & Francis, p. 893, 1999.

HARRISON F. E.; HOSSEINI, A. H.; MCDONALD, M. P.; MAY, J. M. Vitamin C reduces spatial learning deficits in middle-aged and very old APP/PSEN1 transgenic and wild-type mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 4, p. 443-450, 2009.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.

HELFAND, W. H.; COWEN, D. L. **Pharmacy-an illustrated history**. New York: Harry N. Abrams, 1990.

HENEKA, M. T.; KUMMER, M. P.; LATZ, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 463-477, 2014.

HENRY, G. E.; CAMPBELL, M. S.; ZELINSKY, A. A.; LIU, Y.; BOWEN-FORBES, C. S.; LI L.; NAIR, M. G.; ROWLEY, D. C.; SEERAM, N. P. Bioactive acylphloroglucinols from *Hypericum densiflorum*. **Phytotherapy research: PTR**, v. 23, n. 12, p. 1759-1762, 2009.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. **Advanced Analytical Chemistry Instrumental**, v. 4, n. 2, p. 207-212, 1965.

HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 126-141, 1999.

HUANG, L.; SU, T.; LI, X. Natural products as sources of new lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 15, p. 1864-1878, 2013.

INGKANINAN, K., "Novel procedures for lead finding in plant extracts". PhD thesis, Leiden, 2000.

INGKANINAN, K.; BES, C. M.; VAN DER HEIJDEN, R.; HOFTE, A. J. P.; KARABATAK, B.; IRTH, H.; RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; VERPOOTTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**. v. 915, p. 217-223, 2001.

JIN, H.; KANTHASAMY, A.; GHOSH, A.; ANANTHARAM, V.; KALYANARAMAN, B.; KANTHASAMY, A. G. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: Preclinical and clinical outcomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 8, p. 1282-1294, 2014.

JONES Q. R.; WARFORD, J.; RUPASINGHE, H. P.; ROBERTSON, G. S. Target-based selection of flavonoids for neurodegenerative disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 11, p. 602-610, 2012.

JUCKER, M.; WALKER, L. C. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 501, n. 7465, p. 45-51, 2013.

KENNARD J. A.; HARRISON, F. E. Intravenous ascorbate improves spatial memory in middle-aged APP/PSEN1 and wild type mice. **Behavioural Brain Research**, v. 264, p. 34-42, 2014.

KIMURA, J.; NEMOTO, K.; YOKOSUKA, A.; MIMAKI, Y.; DEGAWA, M.; OHIZUMI, Y. 6-demethoxynobiletin, a nobiletin-analog citrus flavonoid, enhances extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in PC12D cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 10, p. 1646-1649, 2013.

KOOK, S. Y.; LEE, K. M.; KIM, Y.; CHA, M. Y.; KANG, S.; BAIK, S. H. *et al.* High-dose of vitamin C supplementation reduces amyloid plaque burden and ameliorates pathological changes in the brain of 5XFAD mice. **Cell Death Disease**, v. 5, p. 1-9, 2014.

LEANDRO, L. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. O gênero *Eperua Aublet*: uma revisão. **Scientia Amazonia**, v. 1, p. 14-22, 2012.

LEMOS, A. H. **Controle e Prevenção de Doenças pela Medicina Natural e Ortomolecular**. São Paulo: EditoraAtheneu, 2006.

LI, R. S.; WANG, X. B.; HU, X. J.; KONG, L. Y. Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potential multifunctionalacetylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **Bioorg ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 9, p. 2636-2641, 2013.

LITWINIENKO, G.; KASPRZSYCKA-GUTTMAN, T.; JAMANEK, D. DSC study of antioxidant properties of dihydroxyphenols, **Thermochimica Acta**, v. 331, n. 1, p. 79-96, 1999.

LOPES, C.R. *et al.* **Folhas de chá**. Viçosa: UFV, 2005.

LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts, **Life Sciences**, v. 71, p. 2521-2529, 2002.

LUSTOSA, A. K. M. F. **Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Piauí. 125 p. 2012.

LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES SOBRINHO, J. L.; ROLIM NETO, P. J. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 117, 2010.

MACEDO, L, F, O. **Preparação e Caracterização de complexo de inclusão entre trimetoprim e 2-Hidroxiopropil-Gama-Ciclodextrina.** Dissertação - Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. 81 p. 2010.

MACHADO, J. C. B. Doença de Alzheimer. In: FREITAS, Elizabete V. [et al]. **Tratado de Geriatria e Gerontologia.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAK, N. K.; LI, W. K.; ZHANG, M.; WONG, R. N. S.; TAI, L. S.; YUNG, K. K. L.; LEUNG, H.W. Effects of euxanthone on neuronal differentiation. **Life Sciences**, v. 66, p. 347-354, 2000.

MANGIALASCHE, F.; KIVIPELTO, M.; MECOCCHI, P.; RIZZUTO, D.; PALMER, K.; WINBLAD, B. *et al.* High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 4, p. 1029-1037, 2010.

MARTORANA, A.; DI LORENZO, F.; ESPOSITO, Z.; LO GIUDICE, T.; BERNARDI, G.; CALTAGIRONE, C.; KOCH, G. Dopamine D2-agonist Rotigotine effects on cortical

excitability and central cholinergic transmission in Alzheimer's disease patients. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 108-113, 2013.

MCCORD, J. M. Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition. **Food Technology**, v. 48, n. 3, p. 106-110, 1994.

MEIRELLES, L. M. A. **Incremento de solubilidade do fármaco rifampicina por complexo de inclusão e dispersão sólida**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, 80 p. 2012.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. **Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos**. Bol. SBCTA. Campinas: 2002.

MENDES, C. S. M. **Delineamento de um fitomedicamento a partir de 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol isolado de *Platonia insignis* Mart: avaliação da atividade cicatrizante**. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí. Teresina. 80 p. 2013.

MIYAZAWA, I.; UEDA, H.; NAGASE, H.; ENDO, T.; KOBAYASHI, S.; NAGAI, T. Physicochemical properties and inclusion complex formation of δ -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 153-162, 1995.

MOGHBELINEJAD, S.; NASSIRI-ASL, M.; FARIVAR, T. N.; ABBASI, E.; SHEIKHI, M.; TAGHILOO, M. *et al.* Rutin activates the MAPK pathway and BDNF gene expression on beta-amyloid induced neurotoxicity in rats. **Toxicology Letters**, v. 224, n. 1, p. 108-113, 2014.

MONACHE, F. D.; MONACHE, G. D.; MOURA PINHEIRO, R.; RADICS, L. Nemorosonol, a derivative of tricyclo-[4.3.1.03,7]-Decane-7- hydroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2305-2308, 1988.

MONTEIRO, A. R.; MEIRELES, M. A.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J. Extraction of the soluble material from the shells of the bacuri fruit (*Platonia insignis* Mart) with pressurized CO₂ and other solventes. **The journal of supercritical fluids**, v. 11, p. 91-102, 1997.

CAPÍTULO 1

MORAES, M. E. A.; SANTANA, G. S. M. Aroeira-do-sertão: um candidato promissor para o tratamento de úlceras gástricas. **Funcap**, v. 3, p. 5-6, 2001.

MORRIS, M. C.; SCHNEIDER, J. A.; LI, H.; TANGNEY, C. C.; NAG, S.; BENNETT, D. A *et al.* Brain tocopherols related to Alzheimer's disease neuropathology in humans. **Alzheimer's Dementia**, v. 11, n. 1, p. 32-39, 2015.

MOURA, M. C. C.; HOMMA, A. K. O.; MENEZES, A. J. E. A. *et al.* Bacuri: Agrobiodiversidade. São Luís: Interamerican Institute for Cooperation on Agriculture, p. 210, 2007.

MOURÃO, K. S. M.; BELTRATI, C. M. Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). I. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento. **Acta Amazônica**, v. 25, n. 1/2, p. 11-32, 1995.

MULHOLLAND, D. A.; MWANGI, E. M.; DLOVA, N. C.; PLANT, N.; CROUCH, N. R.; COOMBES, P. H. Non-toxic melanin production inhibitors from *Garcinia livingstonei* (Clusiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 570-575, 2013.

NAIDU, M.; KUAN, C. Y. K.; LO, W. L.; RAZA, M.; TOLKOVSKY, A.; MAK, N. K.; WONG, R. N. S.; KEYNES, R. Analysis of the action of euxanthone, a plant-derived compound that stimulates neurite outgrowth. **Neuroscience**, v. 148, n. 4, p. 915-924, 2007.

NASCIMENTO, J. N. **Complexo de inclusão do extrato hexânico de *Platonia insignis* Mart e β -ciclodextrina: caracterização e avaliação das atividades gastroprotetora e antioxidante *in vitro***. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 137 p. 2013.

NIEOULLON, A. Neurodegenerative diseases and neuroprotection: current views and prospects. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 9, n. 4, p. 173-183, 2011.

NIXON, R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. **Nature Medicine**, v. 19, n. 8, p. 983-997, 2013.

CAPÍTULO 1

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 549-554, 2006.

OLIVEIRA, C. M. A.; PORTO, A. L. M.; BITTRICH, V.; MARSAIOLI, A. J. Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1073-1079, 1999.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v. 6, p. 70-83, 2009.

OLSZEWER, E. **Clínica Ortomolecular**. 2ª ed. São Paulo: Rocca, 2008.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**, 4ª ed., Oxford University Press, cap. 22, 2009.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PEREIRA, I. O.; MARQUES, M. J.; PAVAN, A. L. R.; CODONHO, B. S.; BARBIÉRIC. L.; BEIJO, L. A.; DORIGUETTO, A. C.; D'MARTIN, E. C.; SANTOS, M. H. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. **fruits. Phytomedicine**, v. 17, p. 339-345, 2010.

PICCINELLI, A. L.; CAMPONE, L.; DAL PIAZ, F.; CUESTA-RUBIO, O.; RASTRELLI, L. Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1688-1698, 2009.

PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; CHICA, M. B.; MAHMOOD, N.; PAGANO, B.; PAVONE, M.; BARONE, V.; RASTRELLI, L. Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**, v. 61, p. 8206-8211, 2005.

CAPÍTULO 1

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

PÔRTO, W. G. Radicais Livres e Neurodegeneração. Entendimento Fisiológico: Base para Nova Terapia? **Revista Neurociências**, v. 9, n. 2, p. 70-76, 2001.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidante utilizando em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 4, n. 29, p. 755-760, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4ª edição: Editora Guanabara Koogan S. A, 2001.

ROBERTS, J. C. Naturally Occurring Xanthones. **Chemical Reviews**, v. 61, p. 591-605, 1961.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonianfruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 380-384, 2004.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2001.

SANTOS, P. R. P. **Estudos farmacológicos e ensaios pré-clínicos com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) derivado de *Platonia insignis* Mart.** Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 95 p. 2012.

SANTOS, P. R. P.; CARVALHO, R. B. F.; COSTA JÚNIOR, J. S.; FREITAS, R. M.; FEITOSA, C. M. Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 2, p. 161-168, 2013.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M.O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2003.

CAPÍTULO 1

SHAHIDI, F.; HO, C. **Antioxidant Measurement and Applications: An Overview**. Editora: American Chemical Society, 2007.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, S.; DONATO, H. Frutas do Brasil. São Paulo, **Imprensa de Arte e Projetos e Edições Artísticas**, p. 50, 1993.

SILVA, V. K. L.; FIGUEIREDO, R. W.; BRITO, E. S.; MAIA, G. A. SOUSA, P. H.; FIGUEIREDO, E. A. T. Estabilidade da polpa do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) congelada por 12 meses. **Ciênc. agrotec.**, v. 34, n. 5, p. 1293-1300, 2010.

SINGH, S. A. Antioxidants as a preventive therapeutic option for age related neurodegenerative diseases. **Therapeutic Targets for Neurological Diseases**, v. 2, p. 1-11, 2015.

SINGH, R.; BHARTI, N.; MADAN, J.; HIREMATH, S. N. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes – A Review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 171-183, 2010.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, p. 135-142, 2006.

SUGIMOTO, H.; OGURA, H.; ARAI, Y.; LIMURA, Y.; YAMANISHI, Y. Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 89, n. 1, p. 7-20, 2002.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins. In: FRÖMMING, K., SZEJTLI, J., eds. **Cyclodextrins in Pharmacy**. London: Kluwer Academic Publishers, v. 5, p. 1-18, 1994.

SZEJTLI, J. Introduction and General overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, p. 1743-1753, 1998.

CAPÍTULO 1

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Minerva Coimbra, 2006.

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, p. 2045-2076, 1998.

UEKAMA, K.; OTAGIRI, M. Cyclodextrins in drug carrier systems. **CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, New York, v. 3, p. 1-40, 1987.

URIARTE-PUEYO, I.; CALVO, M. I. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 34, p. 5289-5302, 2011.

UTTARA, B.; SINGH, A.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

VAUZOUR, D. Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 6, p. 1042-1056, 2014.

VILLACHICA H.; CARVALHO J. E. U.; MÜLLER C. H.; DIAZ S. C.; ALMANZA M. **Frutales y hortalizas promossoras de la Amazônia**. Lima, Tratado de Cooperación Amazônica. Secretaria Pró-Tempore. p. 152-156, 1996.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WEBER C. A.; ERNST, M. E. Antioxidants, supplements, and Parkinson's disease. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 40, n. 5, p. 935-938, 2006.

CAPÍTULO 1

WENG, J. R.; TSAO, L. T.; WANG, J. P.; W, R. R.; LIN, C. N. Antiinflammatory phloroglucinols and terpenoids from *Garcinia subelliptica*. **Journal of natural products**, v. 67, n. 11, p. 1796-1799, 2004.

WENZ, G. Cyclodextrins as building-blocks for supramolecular structures and functional units. **Chemie International Edition in English**, v. 33, p. 803, 1994.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. Im: Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 10a. Ed., Brunton, L. L., Lazo, J. S., Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap. 6.

WILSON, I. B.; BERGMANN, F. Acetylcholinesterase VIII. Dissociation constants of the active groups. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 186, p. 683, 1950.

WU, C. C.; LU, Y. H.; WEI, B. L.; YANG, S. C.; WON, S. J.; LIN, C. N. Phloroglucinols with prooxidant activity from *Garcinia subelliptica*. **Journal of natural products**, v. 71, n. 2, p. 246-250, 2008.

XIAO, Z.; HUANG, C.; WU, J.; SUN, L.; HAO, W.; LEUNG, L. K. *et al.* The neuroprotective effects of ipriflavone against H₂O₂ and amyloid beta induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 721, p. 286-293, 2013.

YU, T. W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.

ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R.; DELIE, F. Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer. **International journal of pharmaceutics**, v. 326, n. 1-2, p. 174-181, 2006.

ZHANG, S. M.; HERNÁN, M. A.; CHEN, H.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W. C.; ASCHERIO, A. Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk. **Neurology**, v. 59, p. 1161-1169, 2002.

CAPÍTULO 1

ZHANG, X. D.; LIU, X. Q.; KIM, Y. H.; WHANG, W. K. Chemical constituents and their acetyl cholinesterase inhibitory and antioxidant activities from leaves of *Acanthopanax henryi*: potential complementary source against Alzheimer's disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n. 5, p. 606-616, 2014.

CAPÍTULO 2

(Artigo publicado na REVISTA Journal of Molecular Structure)

Journal of Molecular Structure 1177 (2019) 286–301



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/molstruc>



Elaboration and characterization of the inclusion complex between β -cyclodextrin and the anticholinesterase 2-oleyl-1,3-dipalmitoyl-glycerol extracted from the seeds of *Platonia insignis* MART



Antonio do Nascimento Cavalcante ^{a, b, *}, Chistiane Mendes Feitosa ^b,
Felipe Pereira da Silva Santos ^b, Ana Paula Rodrigues de Sousa ^b,
Ronaldo dos Santos Sousa Júnior ^b, Alexandre Araújo de Souza ^b, Bernardo Ferreira Pinto ^b,
Cristiany Marinho Araújo ^c, Khaled Rashed ^d

^a Institute of Education, Science and Technology of Maranhão, Campus Presidente Dutra, 65760-000, Presidente Dutra, MA, Brazil

^b Department of Chemistry, Federal University of Piauí, 64049-550, Teresina, PI, Brazil

^c Institute of Education, Science and Technology of Piauí, Teresina Campus South Zone, 64018-000, Teresina, PI, Brazil

^d National Research Centre, Pharmacognosy Department, 33 El-Bohouth st.-Dokki, P.O.12622, Giza, Egypt

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE
INCLUSÃO ENTRE β -CICLODEXTRINA E O
ANTICOLINESTERÁSICO 2-OLEIL-1,3-DIPALMITOIL-GLICEROL
EXTRAÍDO DAS SEMENTES DE *Platonia insignis* MART.**

Antonio do Nascimento Cavalcante, Felipe Pereira da Silva Santos, Ana Paula Rodrigues de Sousa,
Ronaldo dos Santos Sousa Júnior, Alexandre Araújo de Souza, Bernardo Ferreira Pinto, Cristiany
Marinho Araújo, Khaled Rashed e Chistiane Mendes Feitosa

ABSTRACT

Platonia insignis is a plant of the family Clusiaceae, commonly known as bacurizeiro. The grease extracted from its seeds presents a chemical composition with high content of fatty acids; being widely used in folk medicine for the treatment of several diseases such as skin problems, cicatrizing and anti-inflammatory activity, also possessing antioxidant activity, thus presenting a possible protective action against the development of neurodegenerative processes such as Alzheimer's disease (AD), which is a neurodegenerative disorder, which initially affects memory capacity and reasoning. AD is associated with deficits of brain neurotransmitters such as acetylcholine, neurodrenaline and serotonin. The treatment of AD is symptomatic and consists in the reestablishment of cholinergic function. In this restorative process, elevation of acetylcholine neurotransmitter levels may be useful to improve one of the signs of disease, which is learning disability. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE), a key enzyme in the degradation of acetylcholine, is believed to increase the concentration of acetylcholine at the synapses, thus serving as a strategy for the treatment of this disease. The substance, 2-oleyl-1,3-dipalmitoyl-glycerol (ODG), was isolated from the hexanic extract of *P. insignis* Mart seeds, whose in vitro tests showed significant inhibition of the enzyme acetylcholinesterase. However, ODG has low solubility in water, in order to increase its solubility the inclusion complex between ODG and β -cyclodextrin (β -CD). The purpose of this study was to prepare, characterize and evaluate the solubility and dissolution rate of the inclusion complex of ODG with β -CD. The inclusion complex was obtained by solubilization followed by lyophilization and characterized by infrared spectroscopy (IR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and hydrogen nuclear magnetic resonance ($^1\text{H NMR}$), in addition, the phase solubility isotherm and dissolution tests. The physical mixing between the components was prepared for comparison

with the inclusion complex. The results of IR, DSC, TG, SEM, XRD and ^1H NMR suggested the formation of the inclusion complex between ODG and β -CD. According to ^1H NMR data it was possible to predict that ODG was encapsulated by the wider side of the β -CD cavity. The phase solubility isotherm made it possible to determine the apparent stability constant ($K = 339.38 \text{ L mol}^{-1}$), the inclusion efficiency ($\text{EI} = 57.82\%$) and molar stoichiometry (1:1) between ODG and β -CD. The dissolution rate and solubility of the inclusion complex were significantly improved as compared to the pure drug. Therefore, the use of ODG- β -CD can effectively improve the solubility and dissolution rate of free ODG, being a promising approach to promote its clinical application.

Keywords: Acetylcholinesterase. Bacurizeiro. Solubility. Inhibition. Internal cavity.

2.1 INTRODUÇÃO

O bacurizeiro é uma espécie vegetal que pertence à família Clusiaceae, subfamília Clusioideae, gênero *Platonia* e espécie *Platonia insignis* Mart. (BRAGA, 1976). A família Clusiaceae é composta ao menos por 1000 espécies e 47 gêneros distribuídos em regiões de clima tropical e subtropical da Terra. A termologia *Platonia* é um atributo a Platão, filósofo grego, e *insignis*, significa notável, insigne, importante, grande, ou seja, aquilo que chama bastante atenção, em referência a estrutura física e à utilidade da planta, bem como, ao tamanho, sabor e aroma do fruto (BARROSO *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2007).

P. insignis é oriunda da região amazônica do Brasil e Guiana, sendo também encontrada na Colômbia e no Paraguai, sempre ocorrendo em áreas abertas de vegetação rasteira, clareiras e, principalmente, em vegetação secundária, sendo raramente encontrada em floresta primária densa (CAVALCANTE, 1988; MOURÃO; BELTRATI, 1995; CHITARRA; CHITARRA, 2005; FONTENELE *et al.*, 2005;). O bacuri, fruto obtido a partir da *P. insignis* é grande, arredondado, com casca grossa possuindo coloração amarelada e dentro dela contém a polpa, de coloração esbranquiçada, viscosa apresentando odores e sabores bastante agradáveis (FONTENELE *et al.*, 2005).

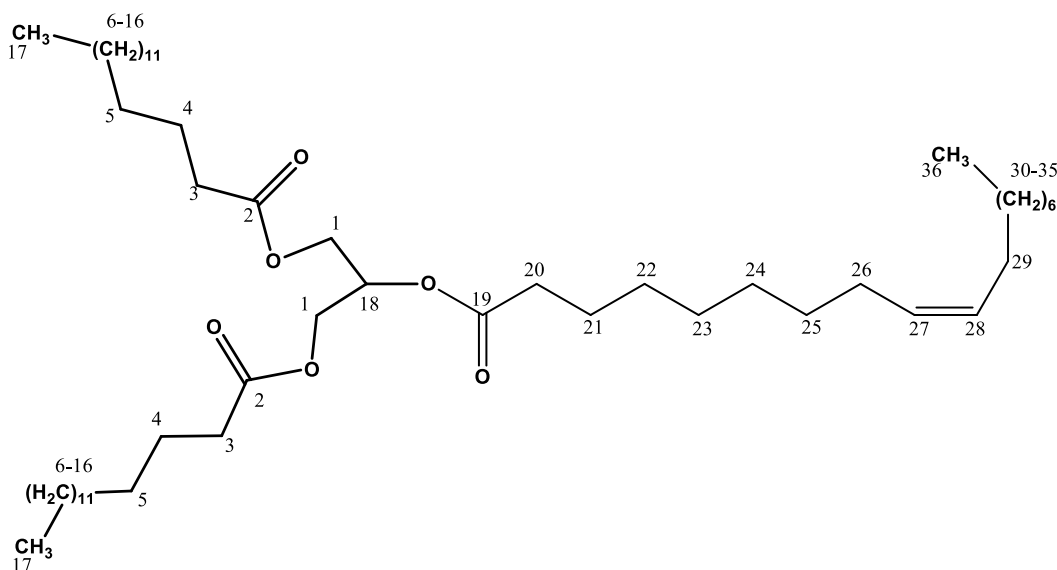
Espécies pertencentes à família Clusiaceae são importantes plantas medicinais bastante utilizadas na medicina popular brasileira, principalmente para o tratamento de eczemas, herpes, doenças gastrointestinais, dermatite, esquistossomose, leishmaniose e malária. Estudos envolvendo as propriedades biológico-farmacológicas dessa família podem ser observados na literatura sendo que a maior parte desses estudos se concentram, sobretudo, nos extratos

vegetais de suas sementes. Os extratos têm demonstrado atividade farmacológica importante como: anti-inflamatória, antimalárico, anti-hipertensivas, antidiabéticas, imunomoduladora-respiratórias, antiviral, antitumoral, antidepressivos, antialérgicos, efeitos antimutagênico e antioxidante (BILANDA *et al.*, 2010; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013a).

A “banha de bacuri”, extraída das sementes, comumente é usada na medicina popular como cicatrizante de queimaduras e no tratamento de doenças dermatológicas (AGRA *et al.*, 2007). Em ensaios *in vivo* a banha demonstrou um grande potencial para acelerar a cicatrização de feridas de pele em ratos (SANTOS *et al.*, 2013; FEITOSA *et al.*, 2016). Propriedade antioxidante *in vitro* do bacuri vem sendo comumente reportada, através do sequestro de radicais livres. Apresentando, assim, uma possível ação protetora contra o desenvolvimento de processos degenerativos associados com vários tipos de doenças (RUFINO *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2011; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013a), como a doença de Alzheimer (DA), que é uma patologia neurodegenerativas, que atinge inicialmente a memória e a capacidade de raciocínio.

DA está associada a déficits de neurotransmissores cerebrais, como acetilcolina, neurodrenalina e a serotonina. O seu tratamento é sintomático e consiste na restauração da função colinérgica. Nesse processo de restauração, a elevação nos níveis do neurotransmissor acetilcolina poderia ser útil para melhorar um dos sinais da doença, a deficiência de aprendizagem (PERRY, 1986). Acredita-se que a inibição da enzima, acetilcolinesterase (AChE), enzima chave na degradação da acetilcolina, aumente a concentração de acetilcolina nas sinapses servindo como uma estratégia para o tratamento de várias doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. Os inibidores sintetizados desta enzima, geralmente, têm efeitos prejudiciais: a tacrina (Cognex[®]) é hepatotóxica; a rivastigmina (Exelon[®]) apresenta efeitos colaterais indesejáveis, como náusea, vômito, diarreia, perda de apetite, tontura e tremor, e a fisostigmina (Synapton[®]) é moderadamente eficaz em seres humanos (FEITOSA *et al.*, 2015a).

Neste contexto, torna-se crescente a busca de novos inibidores da AChE presentes em produtos naturais, como os extraídos de *P. insignis*, que apresentem menos efeitos colaterais que os inibidores sintéticos e que possam ser utilizados futuramente como fitoterápicos. Um desses inibidores naturais é o composto semissólido, 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG), Figura 2.1, extraído das sementes da *P. insignis* é solúvel em solventes apolares e praticamente insolúvel em água. Não havendo, portanto, relatos na literatura sobre as suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, justificando assim, a necessidade da realização desse estudo.

Figura 2.1: Estrutura da substância 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG).

Fonte: Arquivo pessoal.

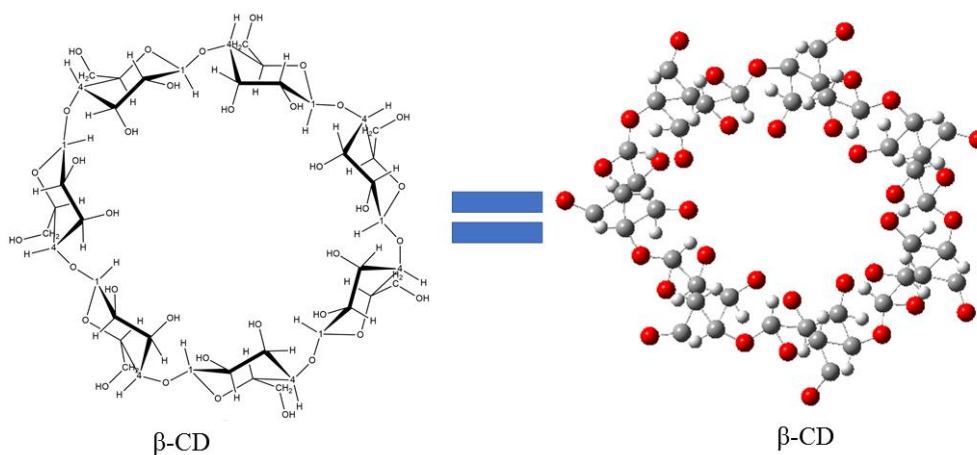
Fármacos pouco solúveis em água, geralmente manifestam comportamento *in vivo* inferior aqueles de maior solubilidade, como baixa biodisponibilidade, maior influência do estado alimentar, maior variabilidade interpaciente e liberação incompleta das formas farmacêuticas (SPRICIGO *et al.*, 2007). Dessa forma, fármacos pouco solúveis em água, como a substância ODG, apresentam, em geral, problemas de biodisponibilidade, sendo a dissolução o fator limitante para a absorção dos mesmos dentro do organismo (AMIDON, 1995). Dentre as técnicas empregadas para aumentar a dissolução e, conseqüentemente, a biodisponibilidade destaca-se o emprego da complexação de fármacos com ciclodextrinas – CD's (LIU, 2000; DAVIS; BREWSTER, 2004). Segundo Aguiar e colaboradores (2014) a baixa solubilidade de fármacos em água e outras propriedades indesejáveis podem ser melhoradas através da formação do complexo de inclusão com β -ciclodextrina (β -CD).

As CD's são oligossacarídeos cíclicos resultantes da hidrólise enzimática do amido por alguns microorganismos (LOFTSSON; MASSON, 2001). As três ciclodextrinas naturais são chamadas de alfa (α -CD), beta (β -CD) e gama (γ -CD), constituídas, respectivamente, por seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas α -1,4 (FRACETO *et al.*, 2007), como pode-se observar na estrutura da β -CD representada na Figura 2.2.

As CD's apresentam conformação espacial com tronco de forma cônico, apresentando grupos hidroxilas (OH) primários e secundários voltados para a face externa, conferindo um caráter hidrofílico para a superfície exterior, enquanto que a cavidade interna da molécula é ligeiramente hidrofóbica, ou seja, as CD's possuem a parte externa hidrofílica e uma cavidade

interna um pouco hidrofóbica (AGUIAR *et al.*, 2014), esta cavidade permite às CD's encapsularem moléculas que apresentem dimensões e geometria compatíveis, alterando as propriedades físico-químicas dessas moléculas, como, solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade (MATIOLI, 2000). Dentre as CD's naturais a β -CD é a mais utilizada, pois sua cavidade pode hospedar moléculas de massa molecular entre 100 e 400 g mol⁻¹, faixa de massa molecular da maioria das moléculas de interesse (REINECCIUS *et al.*, 2005; VEIGA *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011). Além disso, o preço razoável da β -CD também propicia seu frequente uso (WANG *et al.*, 2011) assim como tendo maior disponibilidade comercial (SPRICIGO *et al.*, 2008).

Figura 2.2: Representação esquemática da β -CD.



Fonte: Arquivo pessoal.

As CD's naturais são relativamente solúveis em água e possuem a capacidade de formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares, incrementando de forma bastante significativa sua solubilidade em meio aquoso (VEIGA *et al.*, 2006). Os oligossacarídeos cíclicos são carreadores de fármacos, levando as moléculas em solução e mantendo-as dissolvidas (GRILLO *et al.*, 2008). De acordo com Spricigo e colaboradores (2007) a formação de complexo de inclusão entre fármacos e CD's estão entre as técnicas mais vantajosas e eficientes quando se busca melhorias nas propriedades de dissolução e biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água. Como é o caso, em estudo, da substância ODG.

Apesar do grande número de trabalhos na literatura desenvolvidos na linha de pesquisas de compostos de inclusão com CD's, não existem nenhum estudo envolvendo o encapsulamento de compostos extraídos das sementes de *P. insignis* com β -CD. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar o complexo de inclusão entre a

substância anticolinesterásica 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol e beta-ciclodextrina, utilizando para caracterização físico-química, métodos espectrofotométricos, análises térmicas, difratometria, microscopia eletrônica de varredura, testes de dissolução ou liberação *in vitro* e estudos do perfil de solubilidade a fim de comparar os efeitos da complexação nas propriedades físico-químicas do composto na ausência e na presença da β -CD.

Além disso, este trabalho de caracterização do complexo, torna-se importante para estudos futuros *in vitro* e *in vivo*, possibilitando gerar um potencial alternativa para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer.

2.2 PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1 Extração da banha das sementes da espécie *Platonia insignis*

Foram coletadas na cidade de Água Branca – PI (BRA) cerca de 1,0 kg de frutos da espécie *Platonia insignis*. As sementes foram então separadas dos frutos e após secagem, a 50 °C numa estufa, foram trituradas e extraída com hexano em sistema Soxhlet (Figura 2.3). Uma amostra representativa da espécie foi identificada com a numeração 27.164 e depositada no Herbário Graziela Barroso localizado no Núcleo de Referência em Ciências Ambientais do Trópico Ecotonal do Nordeste (TROPEN) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Figura 2.3: Extração das sementes com hexano em sistema Soxhlet.



Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.2 Preparação da coluna filtrante

O extrato concentrado das sementes de *P. insignis* (62,6283 g), previamente extraído em sistema Soxhlet, foi feita a farofa (mistura) com sílica gel e homogeneizada com auxílio de um cadinho e pistilo. Posteriormente a farofa foi colocada sobre a sílica gel com hexano dentro do funil de decantação. Neste processo da coluna filtrante (Figura 2.4) foram usados os eluentes puros: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, respectivamente. Usando 300 mL de cada um desses solventes, em duplicata, com o objetivo de separar as frações. Foram então obtidas duas frações de cada eluente com as seguintes massas: fração hexânica (HX1 = 7,0245 g e HX2 = 13,8984 g); fração diclorometânica (DM1 = 10,5576 g e DM2 = 2,1586 g); fração clorofórmica (CF1 = 6,6998 g e CF2 = 1,2770 g); fração acetato de etila (AC1 = 0,2866 g e AC2 = 7,1859 g) e fração metanólica (ME1 = 0,0191 g e ME2 = 5,2711 g). Foram feitas a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) das frações obtidas usando como eluente diclorometano:acetato de etila (9:1), para observar o melhor perfil cromatográfico. Foi usado como revelador sulfato cérico $Ce(SO_4)_2$ e posteriormente as placas foram aquecidas a 50 °C.

Figura 2.4: Coluna filtrante do extrato hexânico em funil de decantação.



Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.3 Isolamento do composto 2-oleil-1,3-dimalpitoil-glicerol (ODG)

Cromatografia é uma técnica utilizada para analisar, identificar ou separar os componentes de uma mistura. Esta técnica foi introduzida pelo pesquisador russo Michael Tswett em 1906, quando separou a substância clorofila a partir de uma mistura de pigmentos de plantas, através de uma coluna cheia de carbonato de cálcio em pó, fazendo a lavagem com éter de petróleo. Conforme a amostra descia pela coluna, apareciam bandas separadas e cores distintas (SILVA, 2009).

Os principais métodos cromatográficos são: cromatografia em papel (CP), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, em inglês: High Performance Liquid Chromatography HPLC) que é um método de separação de compostos químicos em solução. A seleção do método a ser empregado depende do material a ser utilizado (PEREZ *et. al.*, 2002).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica simples e de execução relativamente rápida. Na química orgânica, a CCD é utilizada, principalmente, como uma ferramenta eficaz de análise qualitativa para avaliação da pureza de uma amostra simples, avaliação do número de componentes de uma mistura, determinação da identidade de uma amostra por comparação com um padrão, identificação de uma ou mais substâncias presentes em uma mistura por comparação com padrões, monitoramento do progresso de uma reação química, entre outras (SILVA, 2009).

A cromatografia líquida é comumente utilizada na purificação de compostos e/ou classes de compostos. Envolve uma série de processos de separação que acontecem pela passagem de uma mistura líquida contendo analitos, através de duas fases, uma estacionária (fixa) e outra móvel, essa separação ocorre devido à interação de diferentes forças intermoleculares e quanto ao grau de solubilidade do analito (GUIDOLIN *et al.*, 2011). A cromatografia em coluna (CC) está baseada no meio físico em que a fase móvel e a estacionária entram em contato. Nesse caso, a fase estacionária é mantida dentro de um tubo estreito e a fase móvel é forçada a passar sob pressão (SKOOG, 2002). A coluna pode ser um tubo simples, aberto em ambas às extremidades, ou semelhante a uma bureta, com uma torneira na parte inferior. O procedimento consiste em colocar a substância a ser separada ou analisada na parte superior da coluna e o eluente é vertido em seguida, em quantidade suficiente para promover a separação.

O movimento da fase móvel resulta numa migração diferencial dos componentes da amostra. O mecanismo envolvido nesta migração diferencial vai depender do tipo da fase móvel

CAPÍTULO 2

e da fase estacionária utilizada. Pela escolha apropriada da fase fixa e da fase móvel, além de outras variáveis, pode-se fazer com que os componentes da mistura sejam arrastados ordenadamente. Aqueles que interagem pouco com a fase fixa são arrastados facilmente e aqueles com maior interação ficam mais retidos (SILVA, 2009).

A quarta fração da coluna filtrante (fração diclorometânico: DM2) pesando 2,1586 g mostrou-se bem separada e promissora para se realizar a próxima coluna cromatográfica. Colocou-se um pouco de sílica gel no frasco que continha a fração 4, chamada DM2, após a retirada de toda a massa, transferiu-se para um cadinho de porcelana para poder macerar com a sílica gel até obtenção de uma “farofa” com aspecto uniforme. Após o processo de homogeneização misturou-se sílica gel com hexano e transferiu-se para uma coluna de fracionamento com torneira de tal modo que a sílica gel ficasse com 4 a 5 dedos da torneira de coleta das frações (Figura 2.5). Após essa etapa despejou-se a farofa previamente homogeneizada dentro da coluna sobre a fase de sílica gel, posteriormente, colocou-se outra camada de sílica gel com a finalidade de evitar que a coluna “furasse” ao adicionar os eluentes.

Figura 2.5: Cromatografia em coluna na obtenção do composto ODG.



Fonte: Arquivo pessoal.

Após a preparação desse sistema foram realizadas cromatografias em coluna com sílica gel usando os eluentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, respectivamente, puros e em mistura binária, aumentando a polaridade em 10%, com o objetivo de separar o composto

químico. A primeira coluna cromatográfica realizada com o extrato inicial (2,1586 g) deu-se a denominação de coluna FT-A, a qual deu origem 69 frações de 10 mL das quais avaliou-se o grau de pureza em cromatografia de camada delgada (CCD). Das 69 frações obtidas, foram reunidas das frações 15 a 24 com massa igual a 1,5330 g. Posteriormente efetuou-se uma recromatografia em coluna dessa reunião, denominada de coluna FT-B. Da recromatografia da coluna FT-B originou-se 45 frações. Dessas frações obtidas foram reunidas por similaridades em CCD as frações 12 à 16; 17 à 20; 21 à 27; 28 à 31 e 32 à 35.

O composto foi obtido da reunião das frações 21 à 27 com massa pesando 268,3 mg o qual foi chamado de FT-B₍₂₁₋₂₇₎. O grau de pureza foi realizado em cromatografia em camada delgada (CCD) revelando-se com revelador de sulfato cérico, Ce(SO₄)₂, com aquecimento da placa. Posteriormente o composto foi analisado por técnicas espectroscópicas a fim de elucidar sua estrutura.

2.2.4 Elucidação estrutural da substância isolada FT-B₍₂₁₋₂₇₎

A fim de elucidar a estrutura do composto obtido das reuniões dos frascos 21-27 a amostra foi submetida as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H), Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³C) uni e bidimensional e Espectroscopia Infravermelho (IV).

2.2.4.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

O composto isolado, FT-B₍₂₁₋₂₇₎, foi analisado por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³C) para a devida elucidação estrutural. As espectroscopias de RMN foram realizadas com clorofórmio deuterado (CDCl₃). O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno. Os espectros foram obtidos usando um espectrômetro Bruker Avance III – modelo 300, operando a 300 MHz, 298 K em um campo de 9,4 Tesla, equipamento pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (UFC). Para realização das análises foram pesados 10 mg da amostra e posteriormente foram dissolvidos 700 µL do solvente CDCl₃.

2.2.4.2 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos entre os comprimentos de onda 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} usando um aparelho Perkin Elmer® precisely, modelo Spectrum-100 FT-IR Spectrometer. As amostras foram preparadas pela técnica de pastilhas de KBr. O procedimento consistiu na mistura de 1 mg da substância com 100 mg de KBr onde a mistura sólida foi pulverizada e comprimida numa prensa hidráulica Specac de 15 toneladas durante 60 segundos sob pressão de 7 toneladas.

2.2.5 Testes de inibição *in vitro* da acetilcolinesterase da substância isolada FT-B₍₂₁₋₂₇₎

Utilizou-se o método de Ellman (1961) modificado por Rhee (2001) para determinar a atividade da acetilcolinesterase (AChE) da substância isolada obtida a partir da fração diclometânica do extrato hexânico das sementes de *P. insignis*. A utilização da AChE destaca-se como um dos bioensaios mais rápidos e sensíveis para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica. Este pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa.

2.2.5.1 Ensaio *in vitro* qualitativo de inibição da acetilcolinesterase

O ensaio foi realizado em cromatoplaça de gel de sílica. Inicialmente pesou-se 1 mg da amostra FT-B₍₂₁₋₂₇₎ e dissolveu-se em 1 mL de clorofórmio, obtendo-se dessa forma uma solução de concentração $1,0\text{ mg mL}^{-1}$. Posteriormente, fez-se quatro diluições a partir da concentração 1 mg mL^{-1} até obtenção das seguintes concentrações: $0,5\text{ mg mL}^{-1}$; $0,25\text{ mg mL}^{-1}$; $0,125\text{ mg mL}^{-1}$ e $0,0625\text{ mg mL}^{-1}$.

Aplicou-se na placa de cromatografia de camada delgada (CCD) as amostras nas 5 concentrações ($1,0$; $0,50$; $0,25$; $0,125$ e $0,0625\text{ mg mL}^{-1}$) e cafeína, um alcalóide obtido da espécie *Paulinia cupana* (guaraná), que geralmente é utilizada como padrão positivo. Utilizou-se como eluente: clorofórmio-metanol (9:1). Após o processo de eluição e secagem da placa, a mesma então foi borrifada com uma solução formada pela mistura de 10 mL de tampão pH 8 de Tris-hidroxi-metilamina-metano e HCl (Tris-HCl); 2,9 mg de iodeto de acetilcolina – ATCI e 4 mg de ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) – DTNB. Após a secagem da placa por 5 minutos, a mesma foi novamente borrifada com a AChE (*Electrophorus electricus* tipo VI (Sigma®)) na concentração de 5 U mL^{-1} .

2.2.5.2 Ensaio *in vitro* quantitativo de inibição da acetilcolinesterase

O efeito inibitório do composto FT-B₍₂₁₋₂₇₎ sobre a atividade da AChE *in vitro* foi avaliado conforme teste descrito por Ellman e colaboradores (1961) e adaptada para espectrômetro com a análise da reação em um comprimento de onda de 412 nm. Foi utilizado um espectrofotômetro Biosistem SP220, para a atividade de inibição quantitativa.

Nos ensaios em espectrofotômetro cinco diferentes concentrações da amostra (1,0; 0,50; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg mL⁻¹) foram preparadas em triplicata. Inicialmente 100 µL da amostra nas concentrações de 1,0 – 0,0625 mg mL⁻¹ em solução tampão 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 e 10% de clorofórmio foram misturados com 100 µL da AChE 0,22 U mL⁻¹ (22 unidades da enzima diluída em 100 mL de uma solução tampão 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 com 0,1% albumina sérica bovina (BSA)) e 200 µL de tampão 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8, 0,1% BSA.

A mistura foi então incubada por 5 min a 30 °C e posteriormente foram adicionados 500 µL de uma solução de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) – DTNB (na concentração de 3 mmol L⁻¹ em tampão Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,1 mol L⁻¹, MgCl₂ 0,02 mol L⁻¹). Em seguida transferiu-se o conteúdo da mistura reacional para uma cubeta de vidro e acrescentou-se 100 µL de solução de iodeto de acetilcolina (ATCI) na concentração de 4 mmol L⁻¹ em tampão Tris-HCl. Depois desse processo colocou-se no espectrofotômetro modelo AJX-3000PC spectrophotometer onde a reação foi monitorada por 5 min no comprimento de onda (λ) de 412 nm no qual anotaram-se as absorvâncias inicial e após 5 minutos da reação.

Um branco também foi preparado por substituição da AChE onde 100 µL de tampão 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8 foram misturados com 300 µL de tampão 50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl pH 8 e 0,1% BSA. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O medicamento rivastigmina (Exelon®) foi usado como padrão positivo na concentração de 1,0 mg mL⁻¹. Os valores da concentração inibitória média (CI₅₀) foram obtidos utilizando o software GraphPad Prism 6.01. A atividade anticolinesterásica em percentual (%I) foi calculada pela seguinte Equação 2.1 (ELMMAN *et al.*, 1961; KIENDREBEOGO *et al.*, 2011).

$$(\%)I = \left(1 - \frac{\Delta\text{Abs da amostra}}{\Delta\text{Abs do branco}}\right) \times 100 \quad \text{Equação 2.1}$$

Onde: $\Delta\text{Abs da amostra}$ – variação da absorvância da amostra no intervalo de 0 a 5 minutos; $\Delta\text{Abs do branco}$ – variação da absorvância do branco no intervalo de 0 a 5 minutos e (%I) – porcentagem de inibição.

2.2.6 Elaboração da mistura física e do complexo de inclusão com β -ciclodextrina (β -CD)

Após a elucidação estrutural do composto FT-B₍₂₁₋₂₇₎, chamado de 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG), foi feito o encapsulamento dessa substância com o excipiente β -CD por dois métodos: mistura física e complexo de inclusão por liofilização.

2.2.6.1 Preparação da mistura física (ODG/ β -CD)

Este método baseia-se na simples mistura dos componentes sem adição de água de acordo com Zhou e colaboradores (2013) com modificações. No sistema, a massa de cada componente, ODG e β -CD, numa proporção molar de 1:1, foram misturados suavemente em gral de porcelana, com auxílio de pistilo, até completa homogeneização. O material resultante desse processo foi acondicionado em frasco de vidro e armazenado em dessecador.

2.2.6.2 Preparação do complexo de inclusão (ODG- β -CD)

O método de formação do complexo de inclusão (ODG- β -CD) entre as substâncias, 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG) e β -ciclodextrina (β -CD), foi preparado por solubilização de acordo com o método descrito por Coelho (2001) com modificações, seguida por liofilização.

O complexo de inclusão (ODG- β -CD) foi preparado pesando-se 30 mg de ODG e solubilizou-se em 20 mL de etanol P. A. a solução foi mantida a 40 °C sob agitação constante por 2 h. Em seguida pesou-se 81,9 mg de β -CD que foi solubilizada em 250 mL de uma mistura de etanol e água numa proporção de 1:4. Posteriormente misturou-se as duas soluções onde o sistema foi mantido sob agitação magnética com aquecimento de 70 °C por 2 h. Em seguida o sistema foi levado ao rota-evaporador para eliminação do etanol. Depois a solução resultante foi resfriada a -45 °C e subsequentemente foi liofilizada por 48 horas no liofilizador modelo MODULYOD Freeze Dryer da Thermo ELECTRON CORPORATION no Laboratório de Produtos Naturais (LPN) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). O sólido resultante foi mantido em dessecador num frasco hermeticamente fechado.

2.2.7 Caracterização e análise físico-química da mistura física e do complexo de inclusão

A substância na sua forma livre e após a incorporação na β -CD foi analisada por ressonância magnética nuclear (RMN); infravermelho (IV); termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC); difração de raios X (DRX); microscopia eletrônica de varredura (MEV); estudo de dissolução e perfil de isoterma de solubilidade de fases.

2.2.7.1 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN ^1H da β -CD e do complexo de inclusão (ODG- β -CD) foram obtidos usando um espectrofotômetro Varian INOVA – modelo 400, operando a 400 MHz e 298 K em um campo de 9,4 Tesla, equipamento pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – LAUREMN da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Nessa técnica 10 mg de cada amostra foram solubilizadas em 700 μL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6).

2.2.7.2 Espectroscopia no infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos entre os comprimentos de onda 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} usando um aparelho Perkin Elmer[®] precisely, modelo Spectrum-100 FT-IR Spectrometer. As amostras foram preparadas pela técnica de pastilhas de KBr. O procedimento consistiu na mistura de 1 mg das amostras ODG; β -CD; mistura física (ODG/ β -CD) e complexo de inclusão (ODG- β -CD) com 100 mg de KBr onde cada mistura sólida foi pulverizada e comprimida numa prensa hidráulica Specac de 15 toneladas durante 30 segundos sob pressão de 7 toneladas. Os espectros foram obtidos a partir de 32 varreduras e uma resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de IV foram suavizados e a linha de base foi corrigida automaticamente utilizando o software do espectrofotômetro.

2.2.7.3 Análises termogravimétrica (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas termoanalíticas de TG e DSC para ODG; β -CD; mistura física (ODG/ β -CD) e complexo de inclusão (ODG- β -CD) foram produzidas usando um equipamento Shimadzu[®], modelo TGA-51 no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). As amostras pesando 10,0 mg para as duas técnicas foram colocadas em painéis herméticos de alumínio, com os experimentos sendo realizados

CAPÍTULO 2

sob um fluxo de gás inerte de nitrogênio (100 mL min^{-1}), a uma taxa de aquecimento de $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e em uma faixa de temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a $600 \text{ }^\circ\text{C}$ para ambas as técnicas de TG/DSC. Os dados foram obtidos e processados usando instrumento SDT Q600 V20.9 Build 20 modelo DSC-TGA.

2.2.7.4 Análises de difração de raios X (DRX)

Os difratogramas para as amostras ODG; β -CD; mistura física (ODG/ β -CD) e complexo de inclusão (ODG- β -CD) foram obtidos com difratômetro Shimadzu® (X-Ray Diffractometer, LabX XRD-6000) equipado com ânodo de cobre, usando uma voltagem de 40 kV e uma corrente de 30 mA no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). As amostras foram analisadas com geometria de *bagg* 2θ numa varredura de $5\text{-}75^\circ$ a uma velocidade de passo de 2° min^{-1} . As amostras (15 mg) foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material em pó sem solvente.

2.2.7.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As estruturas morfológicas das amostras sólidas ODG; β -CD; mistura física (ODG/ β -CD) e do complexo de inclusão (ODG- β -CD) foram investigadas e fotografadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) com fonte de elétrons por emissão de campo, marca FEI, modelo Quanta, FEG 250, com tensão de aceleração de 1 a 30 kV, equipado com EDS de SDD (Silicon drift detectors), marca Ametek, modelo HX-1001 (detector Apollo X-SDD) no Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada (LMMA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). As amostras foram fixadas em fita dupla face de carbono e recobertas com Au (ouro) na metalizadora, marca Quorum, modelo Q150R, durante 30 s, a uma corrente de íon de 20 mA, por plasma gerado em atmosfera de argônio. A ampliação selecionada foi suficiente para apreciar detalhadamente a morfologia geral das amostras em estudo.

2.2.7.6 Ensaio de dissolução

Os perfis de dissolução do fármaco puro e de seus sistemas binários, mistura física e complexo de inclusão, foram determinados a partir de método descrito na Farmacopéia Brasileira V ed. As amostras ODG; mistura física (ODG/ β -CD) e complexo de inclusão (ODG- β -CD) contendo aproximadamente 1,0 mg foram encapsuladas dentro de uma cápsula de

gelatina dura. O teste de dissolução foi realizado em triplicata, usando 900 mL de solução aquosa de HCl, pH 1,3 e temperatura de 37 °C, a fim de permitir que a realização do ensaio ocorresse em condições análogas às verificadas no trato gastrointestinal (condições *Sink*) usando equipamento dissolutor (Nova Ética – Modelo 299) com pá rotativa a 50 rpm. Foram coletadas alíquotas de 5 mL em intervalos de tempo pré-determinados (5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos) e, imediatamente, filtradas em papel filtro JP 40 de 25 µm. Após filtração, as concentrações das amostras, em triplicata, foram determinadas por espectrofotometria UV-vis modelo AJX-3000PC Espectrofotômetro no comprimento de onda de 225 nm.

2.2.7.7 Estudos da isoterma de solubilidade de fases

Os estudos de solubilidade de fases, conforme descrito por Higuchi e Connors (1965), com algumas modificações, foram feitos em triplicata, agitando-se 10 mL de soluções aquosas da β-ciclodextrina em concentrações crescentes (0,00; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,10 mmol L⁻¹), adicionando-se a essas soluções uma massa fixa de ODG (em excesso de duas vezes em relação a quantidade de matéria de β-CD na solução mais concentrada). As soluções foram submetidas à agitação numa mesa agitadora analógica (marca LUCADEMA) a 170 rpm com temperatura de 25 °C, por 72 horas, até atingir o equilíbrio. Posteriormente o sistema foi centrifugado por 15 min a 200 rpm. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas e filtradas em papel filtro de 25 µm. As concentrações de ODG foram determinadas por espectroscopia usando Espectrofotômetro UV-vis modelo AJX-3000PC no comprimento de onda de 225 nm. Verificou-se que a β-CD não possuía absorvância significativa na região do ultravioleta, não interferindo na leitura espectrofotométrica do ODG.

Foi utilizada para análise quantitativa de ODG a curva de calibração determinada espectroscopicamente ($\text{Absorbância} = 1,013 \times [\text{ODG}] + 0,1747$). Os valores das absorvâncias foram convertidos em concentração de ODG, utilizando-se a constante de absorvância molar obtida pela curva de calibração.

A partir dos dados, obtiveram-se isotermas de solubilidade ($[\text{ODG}] \times [\beta\text{-CD}]$) e determinou-se a constante de estabilidade aparente (K) do complexo utilizando a Equação 2.2 (LYRA *et al.*, 2010).

$$K = \frac{\text{inclinação}}{S_0 \times (1 - \text{inclinação})} \quad \text{Equação 2.2}$$

onde S_0 é a concentração saturada aquosa do ODG na ausência de β-CD.

CAPÍTULO 2

A eficiência de inclusão (EI) do complexo foi determinada a partir da Equação 2.3 (HIGUCHI; CONNORS, 1965):

$$EI = \frac{\text{inclinação}}{(1 - \text{inclinação})} \quad \text{Equação 2.3}$$

2.2.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram tratados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os valores da concentração inibitória média (CI₅₀) e os seus intervalos de confiança de 95%, foram obtidos por regressão não linear utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6.01 (San Diego, CA).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Obtenção do composto FT-B₍₂₁₋₂₇₎

Foi realizado uma CC da fração diclorometânico do extrato hexânico das sementes da *Platonia insignis* para separação de seus constituintes como mostra a Figura 2.6.

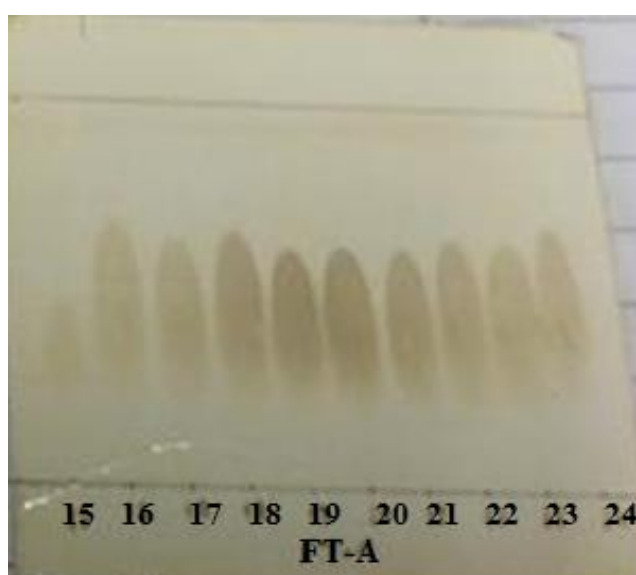
Figura 2.6: Cromatografia em coluna da fração diclorometânico na obtenção do composto FT-B₍₂₁₋₂₇₎.



Fonte: Arquivo pessoal

A primeira coluna cromatográfica realizada com o extrato inicial (2,1586 g) deu-se a denominação de coluna FT-A, a qual deu origem 69 frações, das quais avaliou-se o grau de pureza em cromatografia de camada delgada (CCD). Das 69 frações obtidas fez-se a CCD usando como eluente a mistura binária hexano-clorofórmio (2:8). Dessas frações foram reunidas por similaridade do fator de retenção (R_f) da 15 à 24 (Figura 2.7) com massa 1,5330 g. Posteriormente efetuou-se uma recromatografia em coluna dessa reunião, denominada de coluna FT-B.

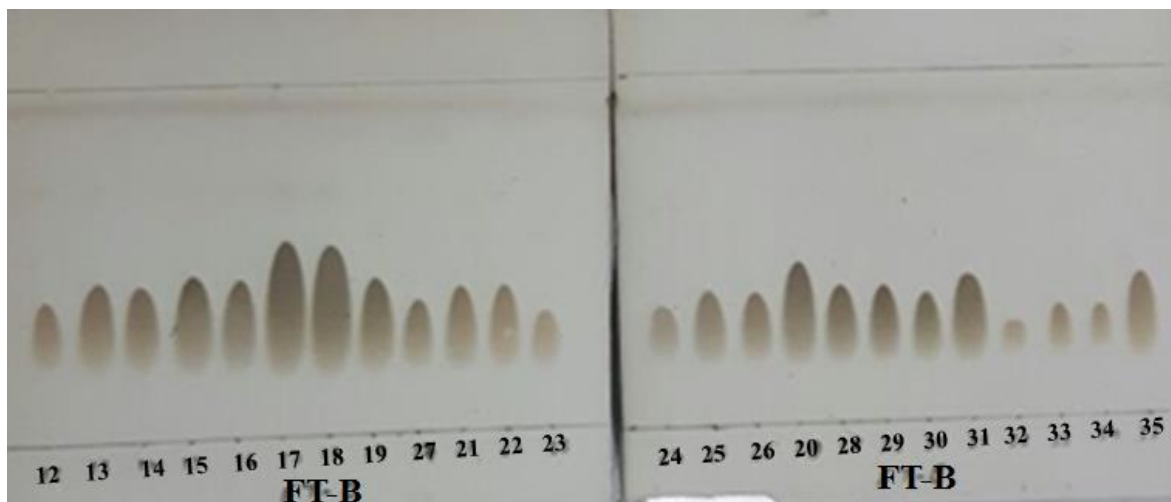
Figura 2.7: Cromatografia em coluna delgada das frações 15 à 24 da coluna FT-A.



Fonte: Arquivo pessoal.

Da recromatografia em CC da coluna FT-B originou-se 45 frações das quais foram reunidas por similaridades após terem sido feitas a CCD (Figura 2.8) as frações 12 à 16; 17 à 20; 21 à 27; 28 à 31 e 32 à 35 usando como eluente uma mistura binária hexano-clorofórmio (1:9). O composto obtido da reunião das frações 21 à 27 com massa pesando 268,3 mg foi chamado de FT-B₍₂₁₋₂₇₎.

Figura 2.8: Cromatografia em coluna delgada das frações 12 à 35 da coluna FT-B.



Fonte: Arquivo pessoal.

Após a reunião das frações 12 à 16; 17 à 20; 21 à 27; 28 à 31 e 32 à 35 usando como eluente uma mistura binária hexano-clorofórmio (1:9) fez-se CCD como é mostrado na Figura 2.9. Dessa forma a reunião das frações 21 à 27 da coluna FT-B foi selecionada para seguir com os testes farmacológicos.

Figura 2.9: Cromatografia em camada delgada da reunião das frações da coluna FT-B.



Fonte: Arquivo pessoal.

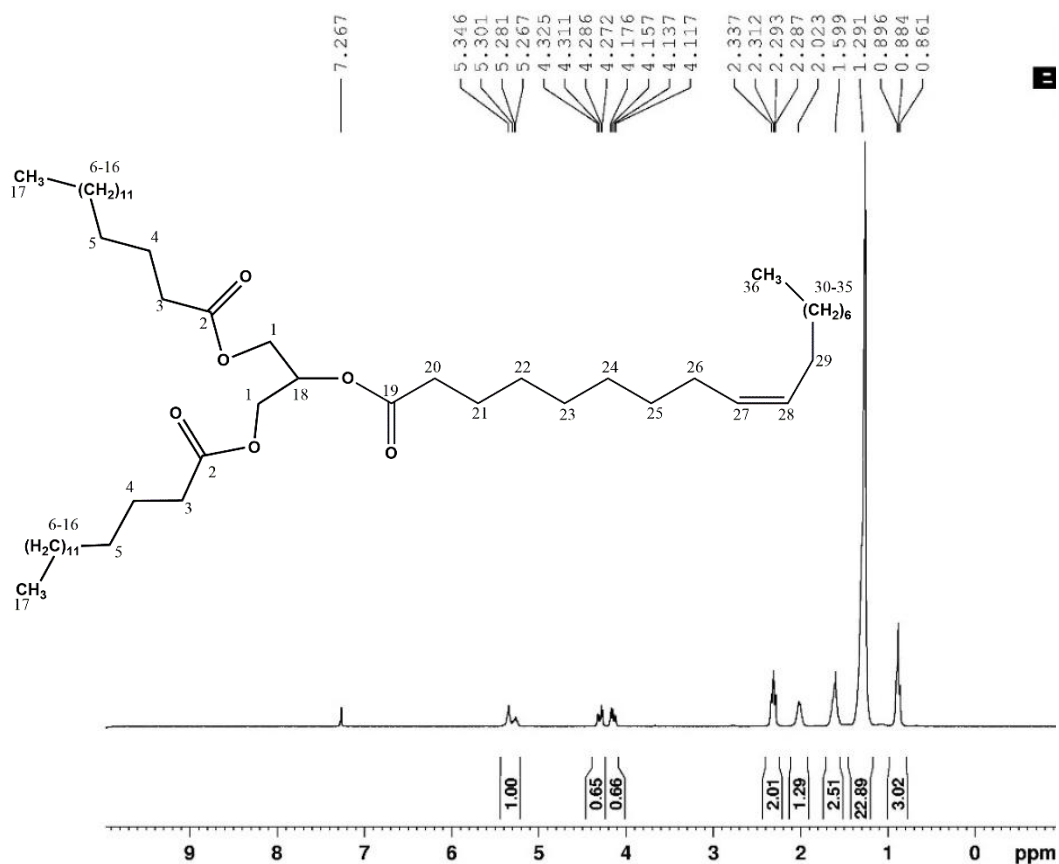
2.3.2 Elucidação estrutural da substância isolada FT-B₍₂₁₋₂₇₎

A ressonância magnética nuclear (RMN) e demais métodos espectroscópicos modernos como infravermelho, espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-vis) e espectroscopia de massas (EM) constituem atualmente os principais recursos para identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas (LOPES; FASCIO, 2004).

O composto isolado, FT-B₍₂₁₋₂₇₎, foi analisado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ¹³C) para a devida elucidação estrutural. A Figura 2.10 mostra o espectro de RMN ¹H onde observa-se os seguintes picos de absorção: o tripleto (t) em 0,88 ppm o qual pode ser atribuído aos hidrogênios dos grupos metílicos terminais [**H**₃C–] com área de integração (3,02) correspondendo a 9 átomos de hidrogênios; o simpleto (s) largo em 1,29 ppm que pode ser atribuído aos hidrogênios metilênicos [– (**CH**₂)_n –] com área de integração (22,89) correspondendo um total de 68 hidrogênios; o multipletto (m) em 1,59 ppm o qual pode ser atribuído aos hidrogênios metilênicos β-carbonílicos [– ^β**CH**₂ – ^α**CH**₂ – CO –] com área de integração (2,51) correspondendo um total de 6 hidrogênios; o multipletto (m) em 2,02 ppm atribuído aos hidrogênios metilênicos alílicos também denominados hidrogênios alílicos α-olefínicos [– ^α**CH**₂ – CH=CH – ^α**CH**₂ –] com área de integração (1,29) totalizando um total de 4 hidrogênios; o tripleto (t) em 2,29 ppm atribuído aos hidrogênios α-carbonílicos [– ^β**CH**₂ – ^α**CH**₂ – CO –] com área de integração (2,01) correspondendo um total de 6 hidrogênios; o duplo-dupletto (dd) entre 4,15 e 4,28 ppm atribuídos aos hidrogênios oximetilênicos [– **CH**₂O – CO –] com área de integração (1,31) correspondendo 4 hidrogênios; o multipletto em aproximadamente 5,30 ppm atribuídos ao hidrogênio oximetínico [– **CHO** – CO –] e aos hidrogênios olefínicos [–**HC=CH**–] com área de integração (1,00) totalizando três hidrogênios. Neste espectro observa-se também a ausência de picos de absorção entre 2,5 e 3,0 ppm, ou seja, ausência de sinais correspondentes a hidrogênios bisalílicos [– CH=CH – **CH**₂ – CH=CH –] indicando a ausência de ligação dupla alternada na cadeia lateral.

De acordo com as áreas de integração do espectro de RMN ¹H da substância FT-B₍₂₁₋₂₇₎ observou-se que existem 100 (cem) átomos de hidrogênios.

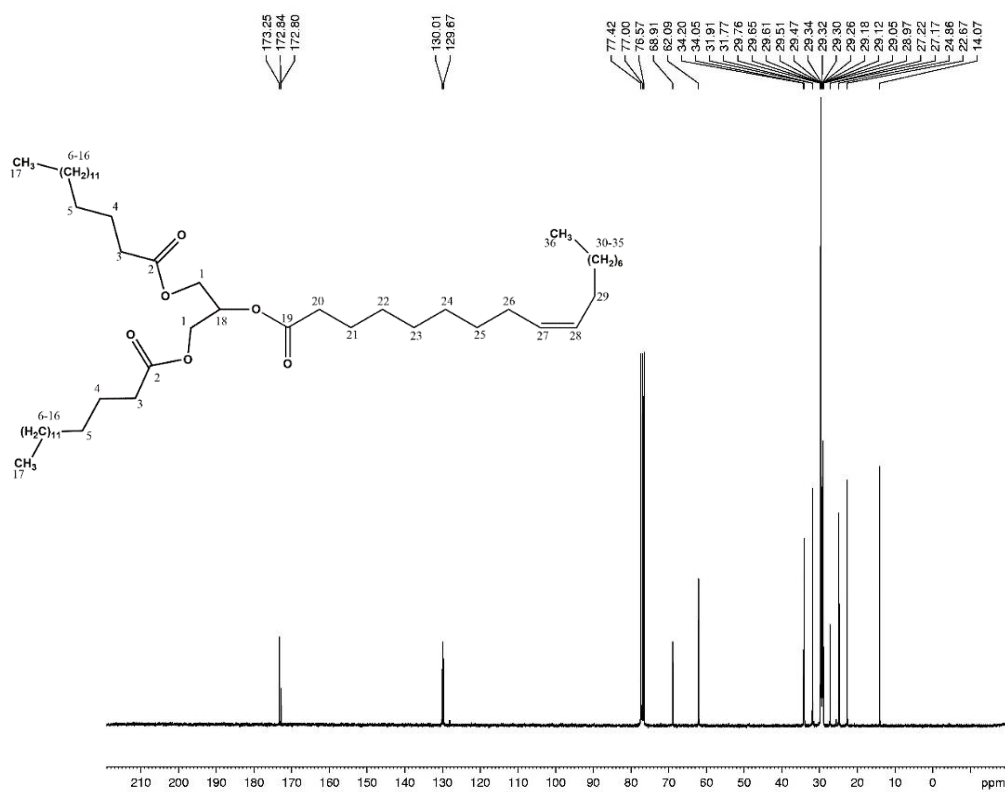
Figura 2.10: Espectro de RMN ^1H da substância FT-B₍₂₁₋₂₇₎ em solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3).



Fonte: Arquivo pessoal.

As Figuras 2.11 e 2.12 mostram, respectivamente, os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) e DEPT 135, sendo que no espectro de carbono (Figura 2.11) mostra os picos de absorção de todos os carbonos da substância, assim como do solvente usado para solubilizar a amostra, enquanto, que o DEPT 135 (Figura 2.12) mostra dois tipos de sinais: picos positivos (linhas para cima) indicam carbonos metílicos (CH_3) e carbonos metínicos (CH), enquanto que, picos negativos (linhas para baixo) indicam carbonos metilênicos (CH_2). Sinais de carbonos não hidrogenados são ausentes neste tipo de espectro (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2007).

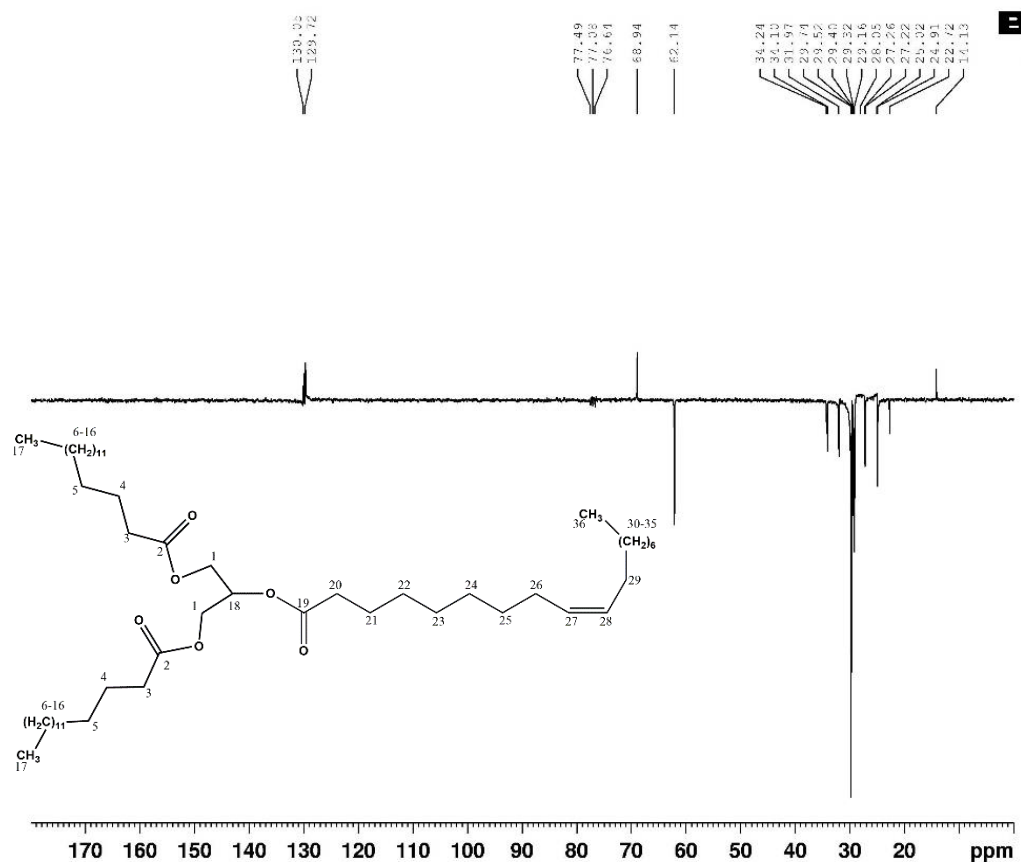
Figura 2.11: Espectro de RMN ^{13}C da substância FT-B₍₂₁₋₂₇₎ em solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3).



Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 2.11, observa-se a presença de 29 picos correspondentes aos carbonos da substância FT-B₍₂₁₋₂₇₎ e um pico do solvente, clorofórmio deuterado, bem forte em aproximadamente 77 ppm. O pico em 14,1 ppm é correspondente aos 3 (três) carbonos dos grupos metílicos ($-\text{CH}_3$) terminais. Os picos que aparecem entre 22,6 e 34,2 ppm correspondem aos carbonos metilênicos [$-(\text{CH}_2)_n-$] alifáticos, confirmados no DEPT 135 (Figura 2.12), onde todos os sinais são negativos. O pico que aparece em 62,1 ppm de sinal negativo (Figura 2.12) corresponde aos dois carbonos oximetilênicos ($-\text{CH}_2\text{O}-$). O sinal em 68,9 ppm cujo pico é positivo no DEPT 135 corresponde ao carbono oximetínico ($-\text{CHO}-$). Na região de carbono com hibridação sp^2 , aparecem dois sinais positivos como é mostrado da Figura 2.12, um em 129,7 ppm e outro em 130,0 ppm, estes picos foram atribuídos aos dois carbonos olefínicos ($-\text{HC}=\text{CH}-$). Os três sinais que aparecem na Figura 2.11 entre 172,8 e 173,2 ppm foram atribuídos aos carbonos dos grupos carbonilas ($-\text{CO}-$) estes sinais estão ausentes no espectro DEPT 135 como pode ser observado na Figura 2.12 uma vez que este tipo de espectro não mostram sinais de carbono não hidrogenado.

Figura 2.12: DEPT 135 da substância FT-B₍₂₁₋₂₇₎ em solvente clorofórmio deuterado (CDCl₃).



Fonte: Arquivo pessoal.

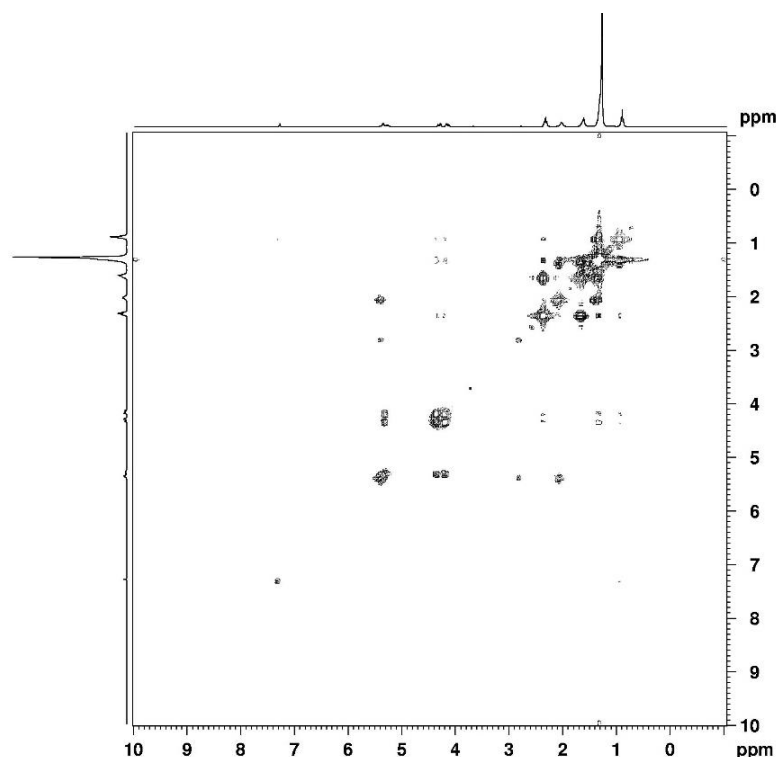
O espectro bidimensional COSY (**CO**rrelation **S**pectroscop**Y**) também chamado ¹H–¹H COSY para indicar claramente que os núcleos de hidrogênios estão sendo correlacionados. Considera-se na interpretação dos espectros ¹H–¹H COSY que os picos fora da diagonal, chamados picos cruzados, têm origem na interação entre todos os hidrogênios que têm acoplamento *J* – *J* significativo. Em outras palavras, os picos cruzados relacionam hidrogênios acoplados (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2007).

Na Figura 2.13 mostra o espectro bidimensional COSY da substância FT-B₍₂₁₋₂₇₎ nele observa-se que os hidrogênios dos grupos metílicos terminais [**H**₃C–] em 0,88 ppm está se correlacionando com os hidrogênios dos grupos metilênicos [– (**CH**₂)*n* –] em 1,29 ppm. Pode-se observar também a correlação entre os hidrogênios dos grupos metilênicos com: os hidrogênios metilênicos β-carbônicos [– ^β**CH**₂–^α**CH**₂– CO –] em 1,59 ppm, os hidrogênios metilênicos alílicos α-olefínicos (–^α**CH**₂–CH=CH–^α**CH**₂–) em 2,09 ppm e também com os hidrogênios α-carbônicos [–^β**CH**₂–^α**CH**₂–CO–] em 2,29 ppm. No espectro COSY, pode-se

CAPÍTULO 2

observar, dentre outras, as correlações dos hidrogênios oximetilênicos ($-\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-$) em 4,15 e 4,28 ppm com os hidrogênios α -carbonílicos [$-\beta\text{CH}_2-\alpha\text{CH}_2-\text{CO}-$] em 2,29 ppm e com o hidrogênio oximetínico ($-\text{CHO}-\text{CO}-$) em 5,30 ppm. Pode-se observar também a correlação entre os hidrogênios olefínicos ($-\text{HC}=\text{CH}-$) em 4,34 ppm com os hidrogênios metilênicos alílicos α -olefínicos ($-\alpha\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\alpha\text{CH}_2-$) em 2,09 ppm.

Figura 2.13: Espectro $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY da substância FT-B₍₂₁₋₂₇₎ em solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3).



Fonte: Arquivo pessoal.

A chamada radiação infravermelha (IV) corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. A parte de maior utilidade para os químicos orgânicos está situada entre 4.000 e 400 cm^{-1} . A espectroscopia na região do IV é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas (LOPES; FASCIO, 2004).

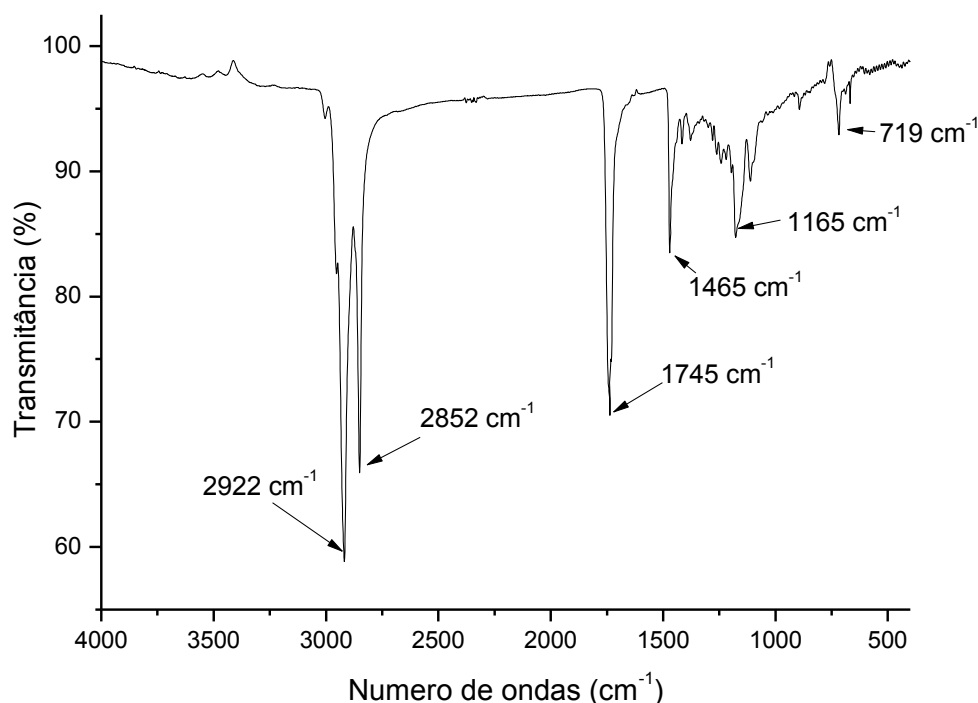
Dentre os métodos de análise para elucidação estrutural de uma molécula, a espectroscopia no IV ocupa uma posição de destaque, pois é a partir do espectro de IV que se obtêm informações de quais grupos funcionais estão presentes em uma molécula, ou seja, a técnica espectroscópica de infravermelho é utilizada para verificar as bandas de absorções

características dos grupos funcionais presentes numa dada molécula.

Na Figura 2.14 mostra o espectro de IV da substância isolada, FT-B₍₂₁₋₂₇₎. No espectro mostra as bandas fortes de absorção em 2922 cm⁻¹ e 2852 cm⁻¹ resultantes, respectivamente, do estiramento axial assimétrico e simétrico da ligação C—H dos grupos metilênicos [–(CH₂)n–] e metílicos [H₃C–] da cadeia carbônica do triacilglicerol. A absorção intensa em 1745 cm⁻¹ deve-se a deformação axial do grupo carbonila (C=O) característico da molécula de triacilglicerol. A banda de absorção verificada em 1465 cm⁻¹ pode ser atribuído à deformação no plano do grupo metilênicos [–(CH₂)n–]. A absorção larga que aparece em 1165 cm⁻¹ pode ser atribuída a deformação axial da ligação C—O—C. A absorção verificada em 719 cm⁻¹ pode ser atribuída às deformações fora do plano das ligações C—H dos grupos metilênicos [–(CH₂)n–] (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2007).

De acordo com o que foi exposto pode-se inferir que a substância FT-B₍₂₁₋₂₇₎ é um triacilglicerol de nome 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG) cuja estrutura pode ser observada na Figura 2.1 (p. 101).

Figura 2.14: Espectro de IV da substância FT-B₍₂₁₋₂₇₎ em pastilha de KBr.



Fonte: Arquivo pessoal.

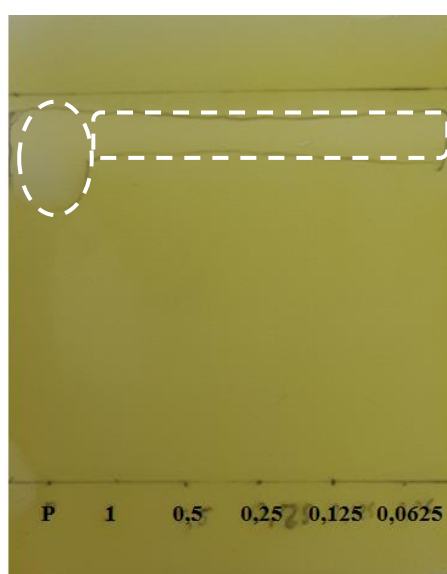
2.3.3 Determinação *in vitro* da atividade anticolinesterásica da substância ODG

O uso de inibidores da acetilcolinesterase é amplamente aceito como a farmacoterapia de primeira linha para o alívio sintomático da doença de Alzheimer (DA), por promover uma elevação nas taxas de acetilcolina nas sinapses cerebrais, melhorando os deficits cognitivos e de memória dos doentes (GIACOBINI, 2003).

Dentre os bioensaios, rápidos e sensíveis, a utilização da acetilcolinesterase é uma alternativa viável para a detecção e seleção de amostras com ação anticolinesterase (TREVISAN; MACÊDO, 2002). Nesse sentido o método adaptado de Ellman (1961) modificado por Rhee (2001) foi utilizado para determinar a atividade da AChE. Este método qualitativo é bastante útil para realização de triagem em diversas amostras ao mesmo tempo, possuindo vantagem na rapidez dos resultados, além das informações como a localização desta atividade em extratos e frações (REIST *et al.*, 2008; SEIDL, 2010).

A substância isolada ODG apresentou inibição qualitativa que foi confirmada através da mudança de coloração da placa de CCD de amarela com manchas brancas após cinco minutos da pulverização com a enzima. O aparecimento de manchas brancas na placa amarela (ELLMAN *et al.*, 1961) podem ser vistas na Figura 2.15 em destaque para tais manchas esbranquiçadas o que pode ser indicativo da inibição da acetilcolinesterase. Neste ensaio utilizou-se a cafeína como padrão positivo.

Figura 2.15: Resultado positivo de inibição qualitativa da AChE para o composto ODG.



Fonte: Arquivo pessoal.

Legenda: P – controle positivo, cafeína; 0,0625 – 1 mg mL⁻¹ foram as concentrações testadas em mg mL⁻¹.

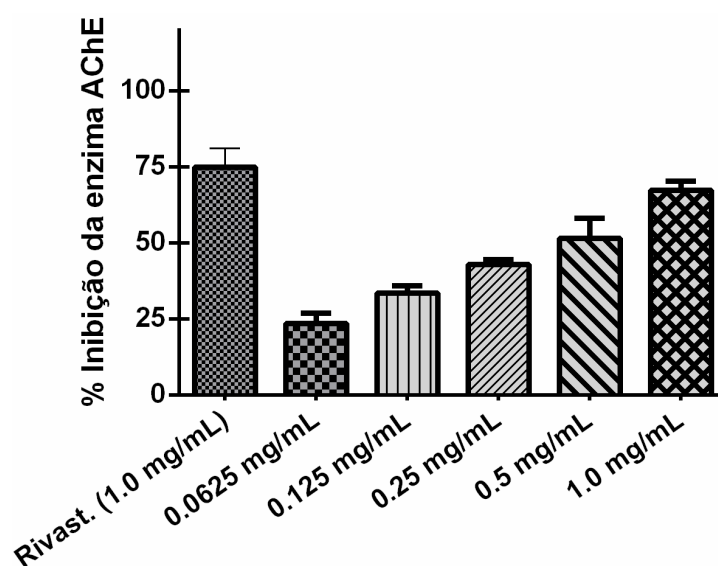
Como pode ser observado na Figura 2.15, o resultado foi positivo nas 05 concentrações, apresentando intensidade de descoloração próximo ao do padrão cafeína (1 mg mL^{-1}). A cafeína, obtida da espécie *Paulinia cupana*, foi utilizada como padrão de referência por ser um ótimo inibidor da AChE (FEITOSA *et al.*, 2016). Quando se obtém cromatoplaça amarela com halos brancos tem-se resultado positivo para inibição da AChE, sendo necessário o prosseguimento com o teste quantitativo de inibição com a finalidade de quantificar a inibição da AChE em cada concentração.

Em estudo anterior Costa Júnior (2011a) isolou do extrato hexânico das sementes de *P. insignis* o composto 1,3-diestearoil-2-oleil-glicerol (TG1), este composto posteriormente foi analisado por Santos (2012), utilizando metodologia de Ellman (1961), e mostrou significativa atividade inibitória da acetilcolinesterase *in vitro* com inibição de 95,5% na maior concentração testada. Esses resultados demonstraram que as frações obtidas da “banha” do bacuri são promissoras na investigação da atividade anticolinesterásica.

Em 1961, Ellman e colaboradores propuseram o método colorimétrico mais empregado atualmente para a determinação da atividade da AChE. Este método foi desenvolvido pela combinação dos conhecimentos divulgados por Koelle (1951) e Ellman (1961), onde neste último é usado o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) – DTNB, chamado reagente de Ellman, na quantificação de compostos de enxofre em tecidos celulares (ELLMAN, 1959). Este método é baseado na taxa de hidrólise da acetiltiocolina (ACTI) pela AChE originando à tiocolina, que reage com o ânion carboxilato do DTNB, formando o 2-nitrobenzoato 5-mercaptopiocolina e um ânion de coloração amarela, o 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato, que é quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 412 nm.

Foi detectada inibição quantitativa de ($67,34\% \pm 3,01$; $51,45\% \pm 6,59$; $42,95\% \pm 1,55$; $33,56\% \pm 2,42$ e $23,49\% \pm 3,49$) na atividade da AChE *in vitro*, nas concentrações do composto ODG 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg mL^{-1} , respectivamente, (Figura 2.16). Em todas as concentrações os testes foram feitos em triplicada. Como podemos observar na Figura 2.16 a atividade inibitória deu-se de forma concentração dependente, com mais de 67% de inibição na maior concentração testada ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) valor bem considerado quando comparado com o valor da inibição do controle positivo, rivastigmina, $74,99\% \pm 6,01$ na mesma concentração.

Figura 2.16: Porcentagem de inibição da AChE nas 5 concentrações testadas da substância ODG e da rivastigmina na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.



Fonte: Arquivo pessoal.

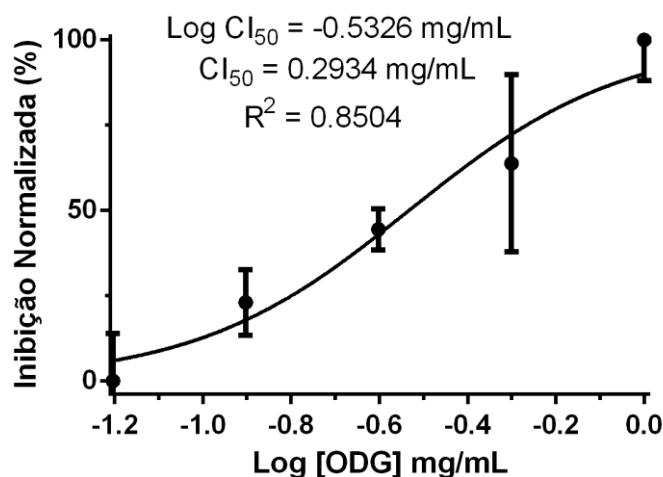
O teste quantitativo permitiu calcular a quantidade mínima de ODG capaz de inibir a atividade da AChE em 50%, chamada de concentração inibitória média (CI₅₀), mostrada na Figura 2.17, que foi de 0,2934 mg mL⁻¹ variando de 0,2197 a 0,3917 mg mL⁻¹ no intervalo de confiança de 95% e $R^2 = 0,8504$ na equação normalizada. Estes resultados são promissores, ainda que muito superior, quando comparamos a rivastigmina (CI₅₀ = 1,87.10⁻³ mg mL⁻¹) usada como controle positivo para inibição da acetilcolinesterase. A rivastigmina é um medicamento inibidor da AChE muito utilizado no tratamento de pessoas com DA (SERENIKI *et al.*, 2008). E também muito superior a outro padrão positivo, a galantamina (CI₅₀ = 0,37.10⁻³ mg mL⁻¹), esta substância é um alcaloide extraído de plantas da família Amaryllidaceae e comercializado com o nome de Reminil[®], vendido no Brasil desde novembro de 2000 sendo um dos fármacos mais utilizados no tratamento da DA por apresentar menos efeitos colaterais indesejáveis (FEITOSA *et al.*, 2015a).

Um alcaloide extraído da planta *Huperzia serrata*, a huperzina A, também atua como inibidor da acetilcolinesterase (CI₅₀ = 74,5 mmol L⁻¹), cuja administração demonstrou melhora significativa na memória de pessoas idosas e assim como de pessoas acometidas com a DA, associada a mínimos efeitos colinérgicos periféricos (ZHANG *et al.*, 2002). Lai e colaboradores (2013) estudaram o extrato alcaloidal e os alcalóides isolados das raízes da espécie vegetal *Stemona sessilifolia*. Sendo assim, dos cinco alcalóides testados, dois deles, estenina e estenina B, e o extrato alcaloidal apresentaram atividade anticolinesterásica significativa, com CI₅₀,

CAPÍTULO 2

respectivamente, igual a $19,8 \mu\text{mol L}^{-1}$; $2,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $102,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Logo percebe-se que alguns inibidores potentes da AChE são produtos naturais derivados de plantas, assim, como a substância em estudo ODG.

Figura 2.17: Gráfico de determinação da CI_{50} da substância ODG.



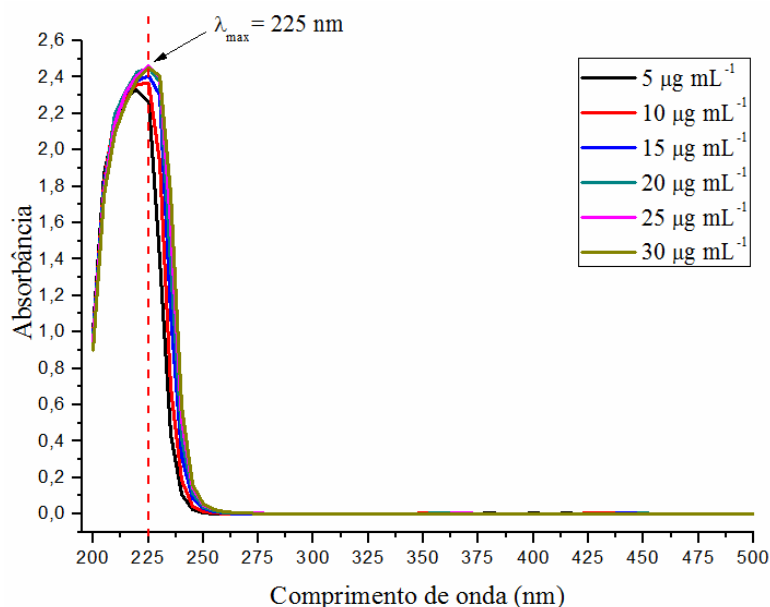
Fonte: Arquivo pessoal.

2.3.4 Ensaios de dissolução

A dissolução consiste no processo de liberação do fármaco de sua forma farmacêutica, tornando-se, dessa forma disponível para ser absorvido ou aproveitado pelo organismo (CHOWDARY; RAJYALAKSHMI, 1987). Assim os estudos de dissolução são importantes uma vez que permitem, através de ensaios *in vitro*, prever a disponibilidade do fármaco *in vivo*.

Por meio da técnica de espectrofotometria na região do UV-vis, observou-se que a substância 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol possui um pico máximo de absorbância no comprimento de onda, λ , de 225 nm em solução binária etanol-água (9:1). Para determinar o comprimento de onda máximo fez-se a varredura entre 200 a 500 nm para a substância em seis concentrações a saber: 5, 10, 15, 20, 25 e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ como mostra a Figura 2.18 o λ_{max} para a maioria das concentrações testadas foi de 225 nm. O comprimento de onda de 225 nm foi usado para construir a curva de calibração do triacilglicerol onde obteve a seguinte equação da reta: $Y = 0,01251 * X + 2,483$ ($R^2 = 0,9904$), onde Y é a absorbância; X é a concentração de ODG e R^2 é o coeficiente de correlação linear.

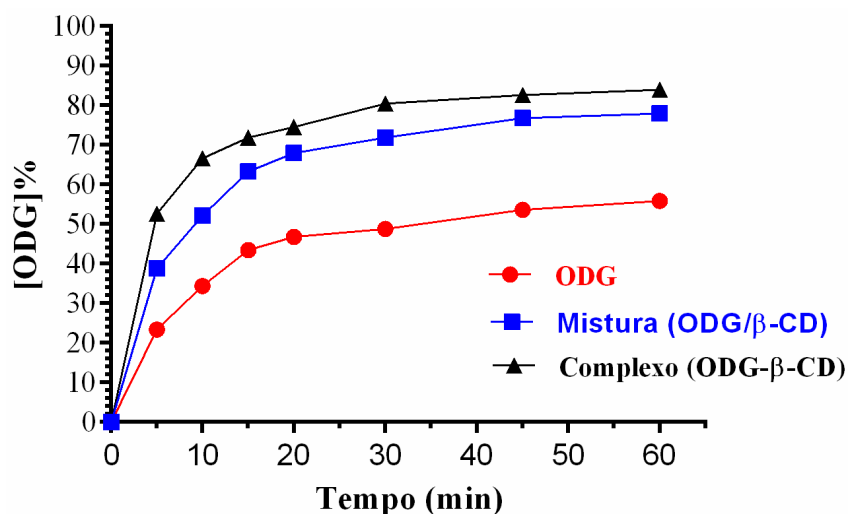
Figura 2.18: Leitura espectrofotométrica da ODG nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 2.19 mostra os diferentes perfis de dissolução da substância ODG, da mistura física (ODG/ β -CD) e do complexo de inclusão (ODG- β -CD) em cápsulas de gelatina. Em todos os tempos analisados a porcentagem acumulada de ODG na forma livre foi sempre menor que da mistura física (ODG/ β -CD) e do complexo de inclusão (ODG-HP- β -CD). Na Figura 2.19 mostra que o complexo evidentemente mostrou taxa de dissolução mais rápida em comparação com o ODG livre. Apenas cerca de 55% do fármaco foi dissolvido em 60 min, enquanto que as taxas dissolvidas da mistura e do complexo, foram respectivamente, 77% e 84% no mesmo tempo analisado. Para o complexo de inclusão (ODG- β -CD), a quantidade dissolvida após 20 minutos foi superior a 74%. A porcentagem liberada da ODG na forma livre e na forma encapsulada, tanto complexo de inclusão quanto a mistura física, mantiveram-se praticamente constante a partir dos 30 min. Assim, o complexo (ODG- β -CD) foi o mais eficaz na melhoria do comportamento de dissolução do fármaco. O alto aumento da taxa de dissolução do fármaco no complexo de inclusão pode ser devido às seguintes razões: formação do complexo de inclusão mais solúvel, maior amorfização do fármaco e consequente aumento da solubilidade, além de maior molhabilidade e redução do tamanho das partículas (VEIGA *et al.*, 2001).

Figura 2.19: Perfil de dissolução do ODG, da mistura física (ODG/ β -CD) e do complexo de inclusão (ODG- β -CD).



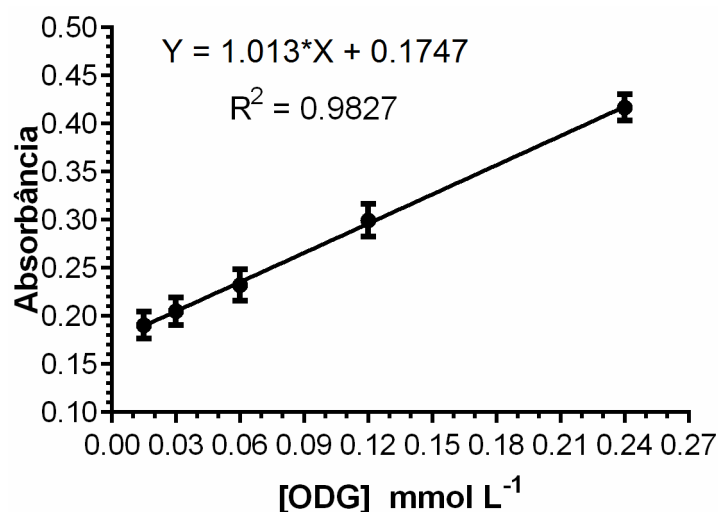
Fonte: Arquivo pessoal.

2.3.5 Perfil de solubilidade de fases

O método descrito por Higuchi e Connors (1956) é uma das abordagens mais utilizada para estudar o perfil de solubilidade de substâncias complexadas. Essa abordagem é considerada a primeira verificação de complexos de inclusão em solução, ela analisa o comportamento de solubilidade da molécula hóspede em soluções com concentrações crescentes de CD's, permitindo obter a constante de estabilidade aparente (K), a estequiometria de formação do complexo e a eficiência de inclusão (EI), a partir da solubilidade intrínseca do substrato (S_0) e da inclinação da reta resultante do diagrama de solubilidade (VEIGA *et al.*, 2001).

Por meio da leitura espectrofotométrica observou-se que ODG tem um pico máximo de absorvância em 225 nm em etanol:água (9:1) (Figura 2.18), comprimento de onda a partir do qual foi construída a curva de calibração da ODG nas concentrações: 0,015, 0,030, 0,060, 0,120 e 0,240 nmol L⁻¹ (Figura 2.20), obtendo-se a seguinte equação da reta: $Y = 1,013 \cdot X + 0,1747$. Verificou-se que o β -CD não possuía absorvância significativa na região do ultravioleta, não influenciando na leitura espectrofotométrica do ODG.

Figura 2.20: Curvas de calibração do ODG obtidas através da espectroscopia de absorção no $\lambda = 225 \text{ nm}$.

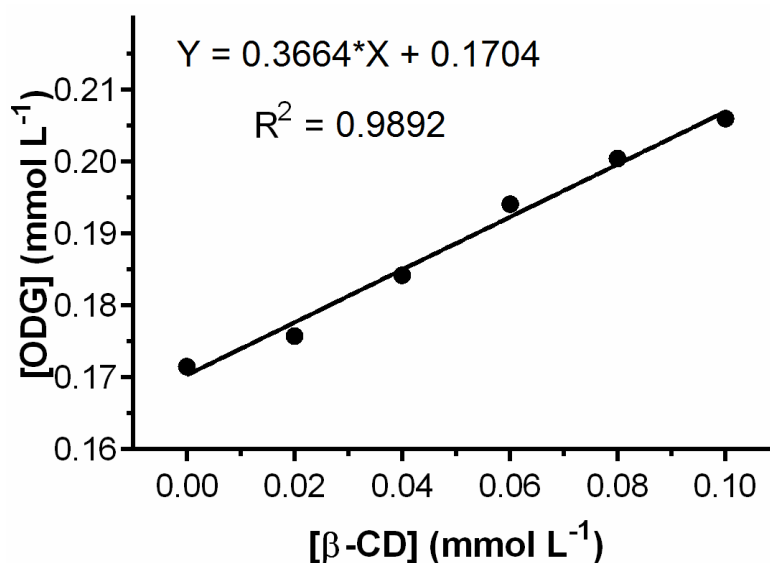


Fonte: Arquivo pessoal.

O diagrama de solubilidade obtido a partir de concentrações crescente de β -CD demonstrou um aumento linear ($R^2 = 0,9892$) da solubilidade de ODG (Figura 2.21). A estequiometria do complexo (ODG- β -CD) foi determinada pela técnica de solubilidade. A relação linear foi obtida entre a quantidade de 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol solubilizada e a concentração de β -CD em solução a qual foi classificada como tipo linear crescente (A_L) de acordo com a teoria de Higuchi e Connor's (HIGUCHI; CONNOR'S, 1965), ou seja, o aumento da solubilidade do fármaco é diretamente proporcional ao incremento das concentrações do agente complexante (β -CD). Esta relação linear sugere a formação de um complexo de inclusão com estequiometria molar 1:1 entre ODG e β -CD.

A partir do diagrama de solubilidade pode-se obter o coeficiente angular (inclinação da reta) cujo valor foi inferior a 1, indicando a estequiometria do complexo 1:1, característico de complexos do tipo A_L (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; LYRA *et al.*, 2010). A partir da equação da reta obtida do diagrama de solubilidade da β -ciclodextrina ($[\beta\text{-CD}] = 0,3664*[\text{ODG}] + 0,1704$), calculou-se a constante de estabilidade aparente (K), parâmetro que avalia a razão na qual a solução contendo ciclodextrina (CD) e fármaco (F), forma o complexo (F-CD) e a eficiência de inclusão (EI), a partir das equações formuladas por Higuchi e Connors (1965).

Figura 2.21: Diagrama de solubilidade de fases para o ODG em presença de concentrações crescente de β -CD determinada a temperatura ambiente.



Fonte: Arquivo pessoal.

Dentre os métodos utilizados para determinação do valor de K , estão as isotermas de solubilidade, onde a molécula a ser encapsulada, ao encontrar-se em um sistema composto por CD e água, pode mudar sua solubilidade. Esta mudança pode ser representada por um aumento até certo limite ou até mesmo uma diminuição da solubilidade inicial (MÁSSON, 1999). A constante de estabilidade aparente (K) é um importante parâmetro na caracterização da interação molecular entre os componentes do complexo e sua variedade prática, uma vez que complexos com alta valor de K podem originar complexos muito estáveis (AGUIAR *et al.*, 2014). A constante de estabilidade aparente (K) calculada para o complexo (ODG- β -CD) foi de $339,38 \text{ L mol}^{-1}$, indicando uma boa interação entre o ODG e a β -CD. A eficiência de inclusão (EI) do ODG calculada através do perfil de solubilidade de fases foi de 57,82%.

Relatos anteriores, sobre a inclusão de pigmentos de pimentão vermelho em β -CD por agitação magnética e ultrassom, resultaram em eficiências de inclusão de 52,95% e 62,43%, respectivamente (LIDIANE *et al.*, 2014). Em outros estudos sobre a eficiência de inclusão de carotenóides em β -CD apenas por agitação magnética foram de 48,96% (CHEN *et al.*, 2007) e 50% (NUNES; MERCADANTE, 2007). Assim, a eficiência de inclusão do ODG foi boa o que nos permite concluir que de cada 100 moléculas de ODG quase 58 foram incorporadas na cavidade de β -CD.

Quanto maior o valor de K obtido, maior facilidade de formação de complexo de inclusão. Em termos farmacêuticos, é desejável usar complexos de inclusão cuja constante de

estabilidade esteja entre 100 e 1000 L mol⁻¹. Fármacos com constante de estabilidade pequenos formam complexos instáveis, por outro lado, aqueles que têm K grande são estáveis demais o que tendem a dificultar a liberação do fármaco no organismo (RAMA *et al.*, 2005). De um modo geral, o intervalo de K entre as CD's ou seus derivados e a grande maioria dos fármacos é 100–20000 L mol⁻¹ (ZHOU *et al.*, 2013). Assim o valor encontrado de K nesse trabalho, 339,38 L mol⁻¹, está dentro do limite desejável, indicando uma boa interação entre o ODG e a β-CD.

2.3.6 Espectroscopia no infravermelho (IV)

Dentre as técnicas utilizadas para caracterizar os complexos de inclusão (CI), os métodos espectroscópicos oferecem vantagens importantes nas análises (CANNAVA *et al.*, 2008). A técnica de espectroscopia IV é uma metodologia analítica utilizada muitas vezes para a avaliação da ocorrência de interações moleculares no estado sólido, mediante comparação das bandas de absorção das moléculas hóspedes e da molécula hospedeira, com a mistura física e o complexo de inclusão (CORTI *et al.*, 2007; MACEDO; 2010). As bandas de absorção do espectro de IV, na maioria das vezes, mudam apenas ligeiramente quando há formação do complexo e, se a fração das moléculas hóspedes encapsuladas na cavidade das ciclodextrinas for, inferior a 25%, bandas que poderiam ser atribuídas à parte incluída são facilmente mascaradas pelas bandas do espectro da CD (SINGH *et al.*, 2010). Contudo, dependendo do sistema, a comparação minuciosa dos espectros pode fornecer evidências complementares da encapsulação. Ao contrário da estrutura cristalina do hóspede, que é perdida durante a formação do complexo, a estrutura molecular é mantida de tal forma que as ligações químicas podem ser detectadas nos espectros IV.

A formação dos CI's na fase sólida pode ser avaliada pela comparação entre os espectros de infravermelho do fármaco puro (molécula hóspede), da ciclodextrina (molécula hospedeira) e dos complexos sólidos obtidos por diferentes métodos de preparação (SPRICIGO *et al.*, 2008). Para isso, são verificadas interações em nível molecular, detectando as mudanças significativas na forma e na posição das faixas de absorbância, através do espectro vibracional dos diferentes grupos funcionais das moléculas de fármacos complexados ou livres (CORTI *et al.*, 2007; CANNAVÀ *et al.*, 2008; ARRAIS, 2012).

Os espectros de IV do ODG, β-CD, mistura física (ODG/β-CD) e do complexo de inclusão (ODG-β-CD) determinados em temperatura ambiente e na região espectral entre 4000-400 cm⁻¹ estão mostrados na Figura 2.22.

Embora as interações existentes no complexo de inclusão entre a β -ciclodextrina e a 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG) não serem muito fortes, uma vez que as forças que as mantêm unidas são as fracas interações de Van der Waals e/ou interações hidrofóbicas, observa-se desvios e mudanças de intensidade de algumas bandas, quando comparamos o complexo e o a substância livre. O espectro de IV da ODG (Figura 2.22a) mostra como principais bandas de absorção, as bandas fortes em $2922,63\text{ cm}^{-1}$ e $2847,50\text{ cm}^{-1}$ resultantes, respectivamente, da deformação axial assimétrica e simétrica da ligação C—H dos grupos metilênicos $[-(\text{CH}_2)_n-]$ e dos grupos metílicos $[\text{H}_3\text{C}-]$, outra banda de absorção intensa em $1743,80\text{ cm}^{-1}$ devida ao estiramento do grupo carbonila (C=O) característico de ésteres de triacilglicéris, outra banda de absorção verificada na Figura 2.22a aparece em $1469,62\text{ cm}^{-1}$ atribuída à deformação no plano do grupo metilênicos $[-(\text{CH}_2)_n-]$ e, por fim, a banda de absorção larga que aparece em $1168,33\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída ao estiramento ou deformação axial da ligação $[\text{C}-\text{O}-\text{C}]$ de ésteres (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2007).

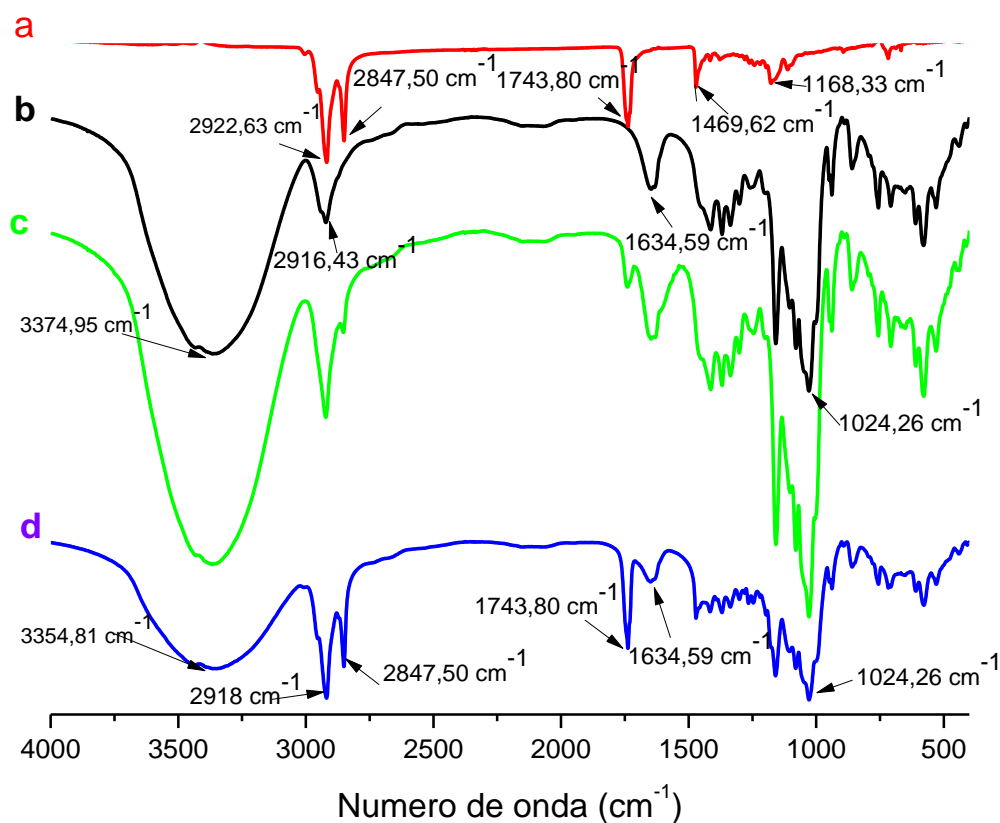
No espectro IV da β -CD (Figura 2.22b), pode-se observar principalmente a banda de absorção larga em $3374,95\text{ cm}^{-1}$ atribuída ao estiramento das ligações dos grupos hidroxilas (O—H) primários e secundários (GANNIMANI *et al.*, 2015), a banda de absorção $1634,59\text{ cm}^{-1}$ que pode ser atribuída a vibração de deformação angular no plano de O—H e a banda forte de absorção em $1024,96\text{ cm}^{-1}$ atribuída as vibrações da ligação C—OH de álcoois. Resultados semelhantes foram encontrados por Gannimani e colaboradores (2015).

No espectro da mistura física (Figura 2.22c) observou-se que houve sobreposição dos padrões de IV das bandas de absorção referentes ao ODG e β -CD livres, ou seja, permitiu identificar que os mesmos correspondem à simples sobreposição dos espectros dos compostos isolados, não indicando qualquer tipo de interação.

No espectro do complexo de inclusão (ODG- β -CD) observou-se que as bandas da β -CD $3374,95\text{ cm}^{-1}$ e $2916,43\text{ cm}^{-1}$, sofreram deslocamento nas frequências após a incorporação da molécula hóspede para $3354,81\text{ cm}^{-1}$ (frequência mais baixa) e 2918 cm^{-1} (frequência mais alta), respectivamente, (Figura 2.22d), a diminuição da frequência entre o complexo de inclusão e sua molécula constituinte deve-se às mudanças no microambiente que levam à formação de ligação de hidrogênio e à presença de forças de Van der Waals durante sua interação para formar o complexo de inclusão (HAMIDI *et al.*, 2010). As bandas $2847,50\text{ cm}^{-1}$ e $1743,80\text{ cm}^{-1}$ confirmam a presença do ODG no complexo. No espectro do complexo de inclusão (Figura 2.22d) observou-se um alargamento e diminuição da intensidade da banda de estiramento de grupos O—H da β -CD em $3354,81\text{ cm}^{-1}$ nesse espectro também foi observado quase o desaparecimento da banda de absorção em $1634,59\text{ cm}^{-1}$ atribuída a vibração de deformação

angular no plano de O–H. Estas alterações podem ser devido a inserção de uma molécula no interior da cavidade da ciclodextrina provocar uma restrição conformacional, reduzindo a livre movimentação das moléculas encapsuladas contribuindo para a redução da intensidade dos seus sinais (NASCIMENTO, 2013), mas também, essas mudanças podem ser atribuídas as interações intermoleculares entre os grupos carbonílicos da molécula hóspede (ODG) com os grupos hidroxilas externos da β -CD (NEGI, 2013) sugerindo a formação do complexo de inclusão.

Figura 2.22: Espectros de IV (a) ODG, (b) β -CD, (c) mistura física (ODG/ β -CD) e (d) complexo de inclusão (ODG- β -CD).



Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados dos espectros IV sugerem que houve formação efetiva do complexo de inclusão entre a substância 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG) e a beta-ciclodextrina e que a ODG foi incluída na cavidade hidrofóbica da molécula de β -CD.

2.3.7 Difração de raios X (DRX)

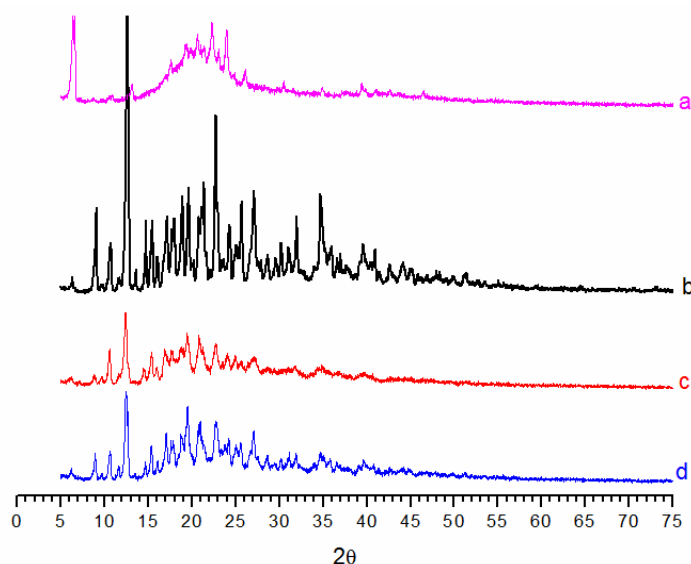
A técnica difração de Raios X (DRX) determina a natureza cristalina de sólidos, sendo considerada uma das técnicas mais adequada para caracterização dos complexos de inclusão, isso devido, sua simplicidade e rapidez (VEIGA *et al.*, 2006; MEIRELLES, 2012). O princípio desta técnica baseia-se no espalhamento coerente da radiação X por estruturas organizadas (cristais), permitindo um estudo morfológico das substâncias, ou seja, um estudo de sua estrutura cristalina. Dessa forma, dependendo da estrutura cristalina da molécula incluída, haverá formação de picos característicos no espectro de DRX. Assim, a formação do complexo de inclusão será avaliada por alterações nos picos característicos da molécula hóspede (fármaco) e da molécula hospedeira (ciclodextrina) com o complexo (TAKAHASHI, 2009; VEIGA *et al.*, 2006).

Os padrões de difração das substâncias livres ODG e β -CD, de sua mistura física e do complexo de inclusão foram estudados usando difração de raios X. Os difratogramas da ODG, β -CD, mistura física (ODG/ β -CD) e do complexo de inclusão (ODG- β -CD) estão mostrados na Figura 2.23. O difratograma de ODG (Figura 2.23a) apresentou-se com característica amorfa, com alguns picos de baixa intensidade e largos em $2\theta = 6,55^\circ; 13,21^\circ; 17,61^\circ; 19,21^\circ; 20,54^\circ; 22,27^\circ; 23,87^\circ; 26,14^\circ; 30,54^\circ; 39,34^\circ$ e $46,66^\circ$. Diferentemente, da forma amorfa da ODG, a β -CD apresentou estrutura de natureza cristalina evidenciada pela grande quantidade de picos mais finos e bem definidos observados no difratograma (Figura 2.23b), apresentando-se como uma substância de cristalinidade maior em relação a substância ODG. O difratograma da β -CD apresentou picos característicos bem definidos em $2\theta = 9,08^\circ; 10,68^\circ; 12,54^\circ; 14,80^\circ; 15,48^\circ; 17,07^\circ; 17,74^\circ; 18,81^\circ; 19,75^\circ; 21,20^\circ; 22,68^\circ; 24,41^\circ; 25,60^\circ; 27,07^\circ; 32,13^\circ; 34,53^\circ$ e $39,59^\circ$ o que evidenciou a natureza cristalina dessa substância. Resultados semelhantes foram encontrados por Li e colaboradores (2015).

Observou-se que o padrão de difração da mistura física (Figura 2.23c) foi apenas a superposição dos difratogramas de ODG e β -CD ainda que com diminuição das intensidades dos picos permitindo identificar à simples sobreposição dos difratogramas dos compostos livres, não indicando, assim, qualquer tipo de interação. A mistura física apresentou uma superposição dos padrões de DRX das espécies isoladas, com redução de alguns picos característicos da β -CD, mas mantendo o pico mais intenso da β -CD em $2\theta = 12,54^\circ$. No difratograma do complexo de inclusão (Figura 2.23d) mostrou que a estrutura da β -CD sofreu uma ligeira amorfização, tendo em vista que, os números de sinais foram reduzidos, bem como suas intensidades, o que caracterizou perda de cristalinidade e, conseqüentemente, aumento de

amorfização. A obtenção de um difratograma com características de um material amorfo, ou seja, sem picos finos bem definidos, pode ser um indicativo da ocorrência de complexação (CORTI *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2015).

Figura 2.23: Difratogramas de (a) ODG, (b) β -CD, (c) mistura física (ODG/ β -CD e (d) complexo de inclusão (ODG- β -CD)



Fonte: Arquivo pessoal.

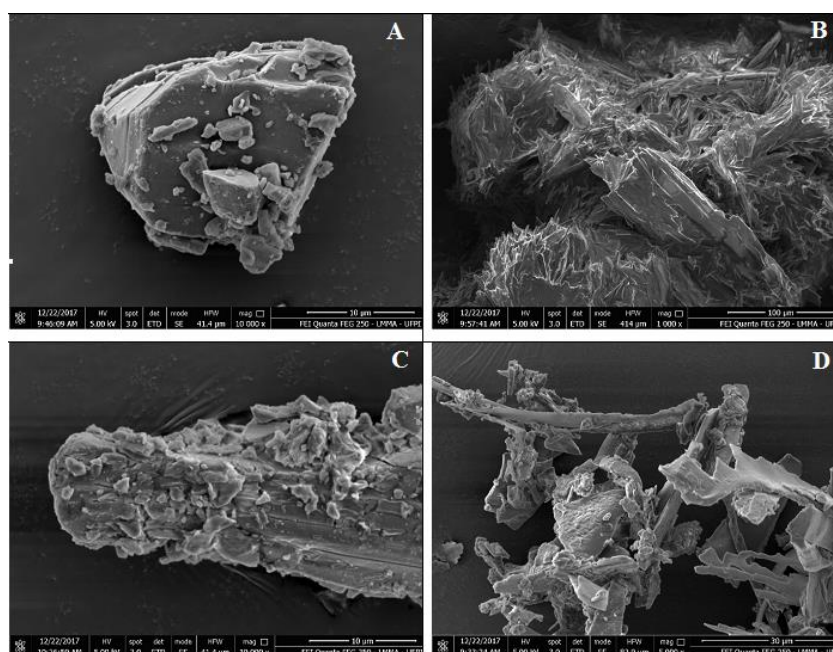
Portanto a formação do complexo de inclusão causa grandes mudanças no padrão de difração das moléculas livres, hóspede (fármaco) e hospedeiro (β -CD). As mudanças foram observadas sob a forma de desaparecimento, diminuição da intensidade e surgimento de novos picos. Mudanças no difratograma da β -CD pode confirmar a formação do complexo de inclusão entre a ODG e β -CD. Outros trabalhos com resultados semelhantes foram encontrados na literatura (LIU *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015).

2.3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica de análise qualitativa bastante adequada para visualizar a textura superficial dos filmes superficiais depositados, isto é, visualizar os aspectos morfológicos de materiais diversos, tais como, CD's e medicamentos, bem como, produtos obtidos por diferentes métodos de preparação (DUCHÊNE, 1987; ARAÚJO *et al.*, 2008). Esta análise constitui uma ferramenta importante para verificar mudanças no perfil cristalino de moléculas, decorrentes do processo de síntese ou do

processamento farmacêutico (RIBEIRO *et al.*, 2008). A Figura 2.24 mostram as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de β -CD, ODG, mistura física (ODG/ β -CD) e complexo de inclusão (ODG- β -CD).

Figura 2.24: Microscopia eletrônica de varredura de (A) β -CD, (B) ODG, (C) mistura física (ODG/ β -CD) e (D) complexo de inclusão (ODG- β -CD).



Fonte: Arquivo pessoal.

As micrografias da β -CD (Figura 2.24A) apresentou-se com morfologia homogênea e cristais poliédricos, estando esse resultado de acordo com os achados de Chen e colaboradores (2011), indicando um perfil mais cristalino. A Figura 2.24B mostra as imagens da substância ODG, nela pode-se observar que se trata de uma substância com característica amorfa. As imagens da mistura física entre β -CD e ODG (Figura 2.24C) revelaram semelhanças tanto com os cristais das moléculas de β -CD e a forma amorfa das moléculas de ODG, ou seja, a mistura física continha a morfologia de ambos os componentes isoladamente, exibindo cristais característicos da β -CD misturados com partículas de ODG ou aderidas a sua superfície. As imagens MEV mostraram que a forma e o tamanho do complexo de inclusão foram completamente diferentes das imagens dos componentes livres, β -CD e ODG. Em contraste, as imagens do complexo de inclusão (Figura 2.24D) apareceram como partículas irregulares, nas quais, a morfologia original dos componentes desapareceram e pequenos agregados de peças amorfas e de tamanhos irregulares estavam presentes. Essas imagens demonstraram ainda que, quando os pós de β -CD e ODG simplesmente se misturaram fisicamente, eles continuaram a

existir em suas formas originais e individuais, enquanto que, quando as soluções dos dois compostos foram misturadas, formaram uma estreita associação, onde houve uma mudança drástica na morfologia e na forma das partículas da ODG, provavelmente formando o complexo de inclusão, em que a β -CD já não existia em seu estado cristalino, revelando-se, assim, uma aparente interação entre ODG e β -CD, o que pode-se confirmar a formação do complexo de inclusão. Estas observações estão de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura (ZHOU *et al.*, 2013; LOUIZ *et al.*, 2015; GANNIMANI *et al.*, 2015).

2.3.9 Análises térmicas

Os métodos de análises térmicas são bastante utilizados na caracterização de sistemas constituídos por mais de um componente como os complexos de inclusão. Estes métodos são feitos comparando-se os comportamentos térmicos dos componentes isoladamente com os dos possíveis complexos de inclusão formados. As CD's são caracterizadas como hidratos apresentando diferentes quantidades de moléculas de água, dependendo do seu processo de preparação e das condições de estocagem (MACEDO, 2010).

Comumente, se detecta a formação do complexo de inclusão, utilizando análise termogravimétrica (TG), comparando-se a temperatura de início de degradação da molécula encapsulada com a do possível complexo. Quando ocorre a complexação, a degradação da molécula hóspede ocorrerá a temperaturas mais elevadas uma vez que esta molécula estará protegida na cavidade da ciclodextrina (ARAÚJO *et al.*, 2007).

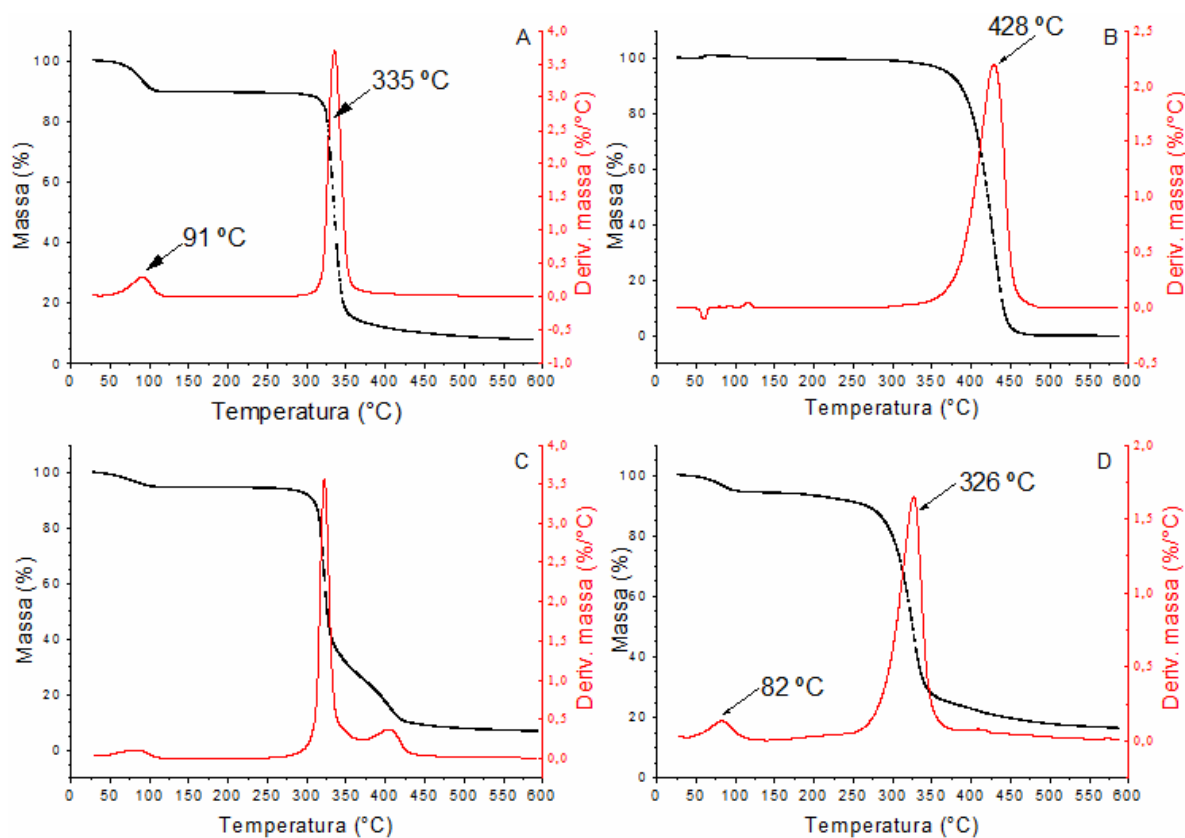
Na análise de TG, a massa de uma determinada amostra sob efeito de gás inerte, é monitorada continuamente em função do aumento da temperatura. Obtendo-se duas curvas, uma relacionada ao percentual de perda de massa (TG) e outra relacionada a derivada do percentual de perda de massa (DTG). Esta última permite a determinação precisa da temperatura em que ocorre determinada perda de massa da amostra (MACEDO, 2010). A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica bastante utilizada para confirmar a formação do complexo de inclusão no estado sólido, devido a sua sensibilidade em detectar possíveis alterações nos eventos térmicos característicos da molécula encapsulada quando ela se encontra no interior da cavidade da ciclodextrina, assim como a estabilidade do sistema e sua cristalinidade (LYRA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011).

As curvas termoanalíticas de TG e DTG para β -CD, ODG, mistura física (ODG/ β -CD) e complexo de inclusão (ODG- β -CD) são mostradas na Figura 2.25 e as curvas de DSC são mostradas na Figura 2.26. O termograma da β -CD (Figura 2.25A) mostra dois estágios de perda

de massa: o primeiro foi registrado em 91 °C indicando a perda de moléculas de água. Estudos anteriores reportam a presença de 11 moléculas de água, dependendo da umidade relativa na β -CD. As moléculas de água estão incluídas na cavidade e também localizadas nos interstícios entre as macromoléculas (LOUIZ *et al.*, 2015). O segundo estágio de perda de massa mais intenso foi registrado em 335 °C relacionado com a decomposição de estrutura β -CD devido à transição da fase sólida para líquida. Curva de DSC da β -CD (Figura 2.26b) corroboraram com estas observações, onde mostraram dois eventos endotérmicos o primeiro iniciando em 70 °C até 100 °C, possivelmente referente ao processo de evaporação de água presente no interior de sua cavidade hidrofóbica (WANG *et al.*, 2011) e o outro evento endotérmico com início em 312° até 342 °C possivelmente resultante da fusão das unidades glicosídicas da β -CD. O termograma de ODG (Figura 2.25B) mostrou que sua decomposição ocorreu em 428 °C. A curva termoanalítica de DSC da ODG (Figura 2.26a) confirmou esta observação na qual mostrou um evento endotérmico iniciando em 375 °C e terminando em 437 °C podendo ser atribuído ao início de fusão dos produtos de decomposição desta substância.

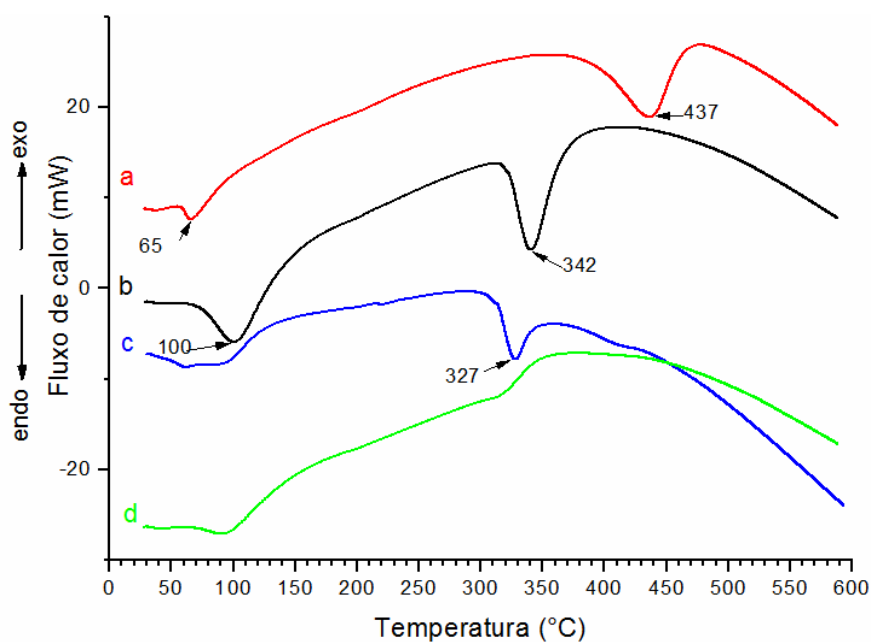
As curvas termoanalíticas da mistura física (Figura 2.25C e Figura 2.26c) foram a simples superposição dos compostos livres como pode ser observado na curva DTG onde mostrou claramente os três picos de derivada da perda de massa correspondente das substâncias na sua forma livre. Já as curvas termoanalíticas do produto obtido pela técnica de liofilização utilizando β -CD (Figura 2.25D) mostrou que a decomposição do complexo de inclusão ocorreu numa faixa maior de temperatura 225-400 °C, onde a derivada de perda de massa ocorreu em 326 °C. Entretanto, um padrão diferente foi observado na curva de DSC do complexo de inclusão (Figura 2.26d), resultando em um sistema com características únicas, diferentemente do comportamento termoanalítico das duas substâncias livres, sugerindo uma mudança na estrutura da substância após a formação do complexo de inclusão entre ODG e β -CD. Verificase que o evento endotérmico em 437 °C no termograma de DSC do ODG, associado a fusão, desaparece na curva do complexo de inclusão, indicando uma maior estabilidade do ODG complexado quando comparado ao ODG livre. Tal comportamento evidenciou um ganho de estabilidade térmica para o fármaco encapsulado, provavelmente como resultado de interações com a cavidade, isso pode indicar a complexação entre o ODG e β -CD.

Figura 2.25: Curvas termoanalíticas de TG e DTG referentes a, (A) β -CD, (B) ODG, (C) mistura física (ODG/ β -CD) e (D) complexo de inclusão (ODG- β -CD).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 2.26: Curvas termoanalíticas de DSC referentes a, (a) ODG, (b) β -CD, (c) mistura física (ODG/ β -CD) e (d) complexo de inclusão (ODG- β -CD).



Fonte: Arquivo pessoal.

Essas observações nas análises térmicas foram consistentes com outros trabalhos encontrados na literatura (ZHOU *et al.*, 2014; KFOURY *et al.*, 2014).

2.3.10 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Espectroscopia de RMN é uma importante ferramenta para estudar e caracterizar o modo de inclusão (LI *et al.*, 2015). É uma técnica que vem sendo bastante utilizada para determinar a formação de complexos de inclusão (VEIGA *et al.*, 2006) sendo muitas vezes usada para obtenção de informações adicional da formação de complexos em CD's (SUN *et al.*, 2006). Os deslocamentos químicos do hospedeiro e da molécula hóspede podem fornecer evidências para a formação de complexos de inclusão em solução, uma vez que são conhecidas mudanças significativas no microambiente que aparecerá entre os estados livre e encapsulado.

A Figura 2.27 mostram os espectros de RMN ^1H da β -CD e do complexo de inclusão da ODG com β -ciclodextrina, em dimetilsulfóxido (DMSO- d_6). A fim de se atribuir os sinais de RMN ^1H das moléculas em estudo, assim como observar possíveis alterações nos ambientes químicos dos hidrogênios das mesmas, quando forma o complexo de inclusão. Os deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios da β -CD na ausência e na presença de ODG são mostrados na Tabela 2, onde $\Delta\delta$ é a diferença entre o δ da beta-ciclodextrina na presença e na ausência de ODG.

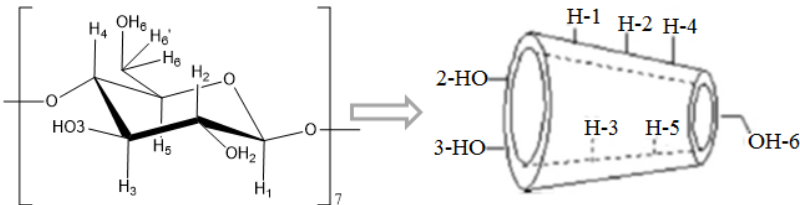
Os deslocamentos químicos (δ), dos átomos de hidrogênios (H-1, H-2, H-4 e H-6) que ficam na superfície exterior da cavidade de β -CD não apresentaram diferenças significativas na presença da molécula hóspede, no entanto, os átomos de hidrogênios que ficam na parte interna da β -CD (H-3 e H-5) mostraram mudanças relativamente proeminentes (Figura 2.27). Para uma melhor ilustração dessas mudanças, os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênios da β -CD na ausência e na presença de ODG foram listados na Tabela 2.1.

A parede interna da cavidade da β -CD é constituída pelos átomos de hidrogênios, H-3 e H-5, a estrutura do complexo de inclusão pode ser determinada, de acordo com as alterações nos deslocamentos químicos (δ). Pode ser visto a partir da Tabela 2.1 que houve mudança de ambiente químico para todos os hidrogênios, ainda que de diferentes intensidades, após a inserção de ODG na cavidade da β -CD. Diferentemente dos deslocamentos químicos dos hidrogênios externos, H-1, H-2, H-4 e H-6, que foram ligeiramente afetados pela presença de ODG. Os hidrogênios internos, H-3 e H-5, mostraram mudanças no ambiente químico relativamente proeminentes, 0,0235 ppm e 0,0123 ppm, respectivamente, em comparação aos outros átomos de hidrogênios da β -CD que estão localizados no lado externo da

cavidade. Notou-se que o deslocamento químico do H-3 foi maior que do H-5 após a formação do complexo de inclusão. O hidrogênio H-3 está situado próximo do lado mais largo da cavidade enquanto o hidrogênio H-5 está próximo do lado mais estreito, essas alterações dos deslocamentos químicos sugerem que o ODG entrou na cavidade da β -CD pelo lado mais largo de modo que o H-5 mostrou-se um desvio menor.

Tal como ilustrado na Tabela 2.1, um fenômeno semelhante ocorreu nos deslocamentos químicos dos grupos OH das β -CD após a formação do complexo de inclusão, o valor $\Delta\delta$ do OH-6 (lado estreito) foi de 0,0045 ppm, no entanto, os valores de $\Delta\delta$ para os grupos OH, que ficam do lado largo da cavidade, foram ligeiramente maiores, OH-2 (0,0264 ppm) e OH-3 (0,0522 ppm). Este fenômeno corroborou com a hipótese de que a ODG foi inserida na cavidade β -CD a partir do lado mais largo, e com base nesses resultados, deduzimos um possível modo de inclusão para o ODG- β -CD como mostrado na Figura 2.28 e que a parte inserida da molécula de ODG na cavidade da β -CD foi a que apresenta ligação dupla.

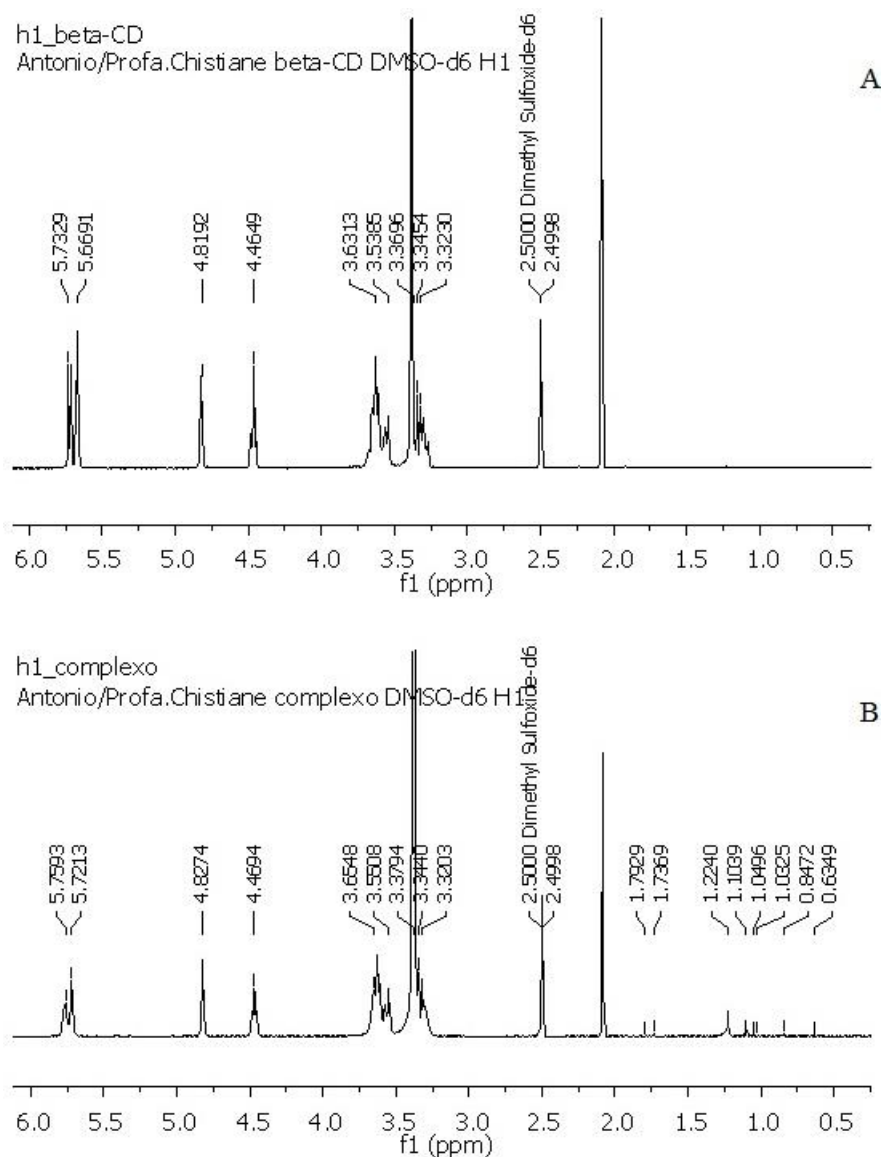
Tabela 2.1: Deslocamentos químicos (δ) de hidrogênios de β -CD na ausência e na presença de ODG.



Hidrogênios	$\delta_{\beta\text{-CD}}$ (ppm)	$\delta_{\text{ODG-}\beta\text{-CD}}$ (ppm)	$ \Delta\delta $ (ppm)
H-1	4,8192	4,8274	0,0082
H-2	3,3230	3,3203	0,0027
H-3	3,6313	3,6548	0,0235
H-4	3,3454	3,3440	0,0014
H-5	3,5385	3,5508	0,0123
H-6	3,3696	3,3794	0,0098
OH-2	5,7329	5,7593	0,0264
OH-3	5,6691	5,7213	0,0522
OH-6	4,4649	4,4694	0,0045

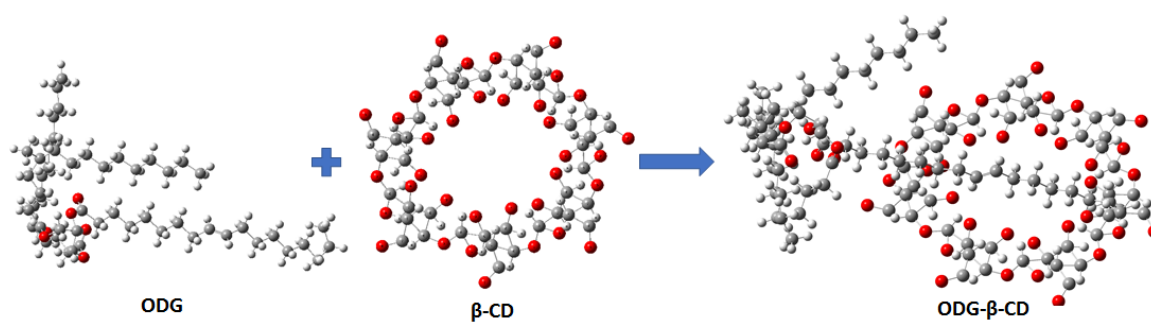
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 2.27: Espectros de RMN ^1H da β -CD (A) e do complexo de inclusão, ODG- β -CD, (B).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 2.28: Possível modo de inclusão da molécula ODG na cavidade da β -CD.



Fonte: Arquivo pessoal.

2.4 CONCLUSÃO

O composto 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG) foi obtido a partir da fração diclometânico do extrato hexânico das sementes de *Platonia insignis*. Através de determinação *in vitro* da atividade anticolinesterásica apresentou inibição significativa para acetilcolinesterase. O complexo de inclusão entre a substância ODG e β -CD foi preparado com êxito pelo método de solubilização seguido por liofilização e caracterizado por IV, DSC, TG, DRX, RMN e MEV. Os resultados deste trabalho mostraram claramente a efetiva formação do complexo de inclusão entre a substância ODG com β -ciclodextrina (ODG- β -CD). Com base nos dados de RMN ^1H foi possível inferir que a uma parte da molécula de ODG foi encapsulada pelo lado mais largo da cavidade da β -CD.

O trabalho mostrou que a complexação do ODG provocou mudanças nas propriedades deste composto, como um aumento na solubilidade e alteração no seu perfil de liberação. Estas mudanças foram de grande importância na aplicabilidade deste composto, podendo causar melhoras na biodisponibilidade do mesmo. Pelo diagrama de solubilidade, constatou-se que a constante de estabilidade aparente ($K = 339,38 \text{ L mol}^{-1}$) apresentou um valor relativamente alto, indicando uma boa interação entre o ODG e a β -CD e um aumento de solubilidade diretamente proporcional ao incremento das concentrações do agente complexante. Os resultados a partir do diagrama de solubilidade de fases demonstraram a formação do complexo de inclusão na proporção 1:1 e permitiram determinar a eficiência de inclusão ($EI = 57,82\%$). Os resultados mostraram que β -CD pode ser um excipiente adequado para aumentar a solubilidade e liberação controlada do ODG.

Tais resultados foram importantes para um melhor entendimento das propriedades físico-químicas do complexo de inclusão, podendo futuramente ser um potencial alternativa para a terapia de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, U. N.; LIMA, S. G.; ROCHA, M. S.; FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, R. M.; MOURA, L. C. B.; ALMEIDA, L. T. G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Crton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, n. 1, v. 37, p. 50-55, 2014.

CAPÍTULO 2

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 114-140, 2007.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavalailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 413-420, 1995.

ARAÚJO, E. C. et al. Use of medicinal plants by patients with cancer of public hospitals in João Pessoa (PB). **Revista Espaço para a Saúde**, v. 8, n. 2, p. 44-52, 2007.

ARAUJO, M. V. G.; VIEIRA, E. K. B.; LÁZARO, G. S.; CONEGERO, F. S.; FERREIRA, O. P.; ALMEIDA, L. E.; BARRETO, L. S.; COSTA-JR, N. B.; GIMENEZ, I. F. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: characterization, phase solubility and molecular modeling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p. 5788-5794, 2008.

ARRAIS, M. A. S. **Obtenção e caracterização físico-química do complexo de inclusão dapsona: β cd e dapsona: sbe β cd para incremento de solubilidade em forma farmacêutica.** Dissertação (Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Piauí. Teresina - Piauí, 93 p. 2012.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil Minas Gerais: Viçosa**, 309 p. 2002.

BILANDA, D. C.; DIMO, T.; DZEUFJET DJOMENI, P. D.; BELLA, N. M. T.; ABOUBAKAR, O. B. F.; NGUELEFACK, T. B.; TAN, P. V.; KAMTCHOUING, P. Antihypertensive and antioxidant effects of *Allanblackia floribunda* Oliv. (Clusiaceae) aqueous. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 634-640, 2010.

BRAGA, R. **Plantas medicinais do Nordeste: especialmente do Ceará**, ESAM, Mossoró, Brazil, 1976.

CAPÍTULO 2

Brasil. **Farmacopéia Brasileira**, volume 2/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p. 546. 2010.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.

CANNAVÀ, C.; CRUPI, V.; FICARRA, P.; GUARDO, M.; MAJOLINO, D.; STANCANELLI, R.; VENUTI, V. Physicochemical characterization of coumestrol/ β -cyclodextrins inclusion complexes by UV-vis and FTIR-ATR spectroscopies. **Vibrational Spectroscopy**, v. 48, n. 2, p. 172-178, 2008.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6 ed. Belém: CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 279 p. (Coleção Adolpho Ducke), 1996.

CHEN, X.; CHEN, R.; GUO, Z.; LI, C.; LI, P. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. **Food chemistry**, v. 101, p. 1580-1584, 2007.

CHEN, W.; YANG, L. J.; MA, S. X.; YANG, X. D.; FAN, B. M.; LIN, J. Crassicauline A/ β -cyclodextrin host-guest system: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1321-1328, 2011.

CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F. **Pós-colheita de frutos e hortaliças**, Lavras, p. 256. 2005.

CHOWDARY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **Eastern Pharmacist**, v. 30, p. 51-4, 1987.

COELHO, L. N. **Estudo da inclusão de filtros solares em ciclodextrinas e suas aplicações em dermocosmética**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 115 p. 2001.

CORTI, G; CAPASSO, G; MAESTRELLI, F; CIRRI, M; MURA, P. Physicochemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 480-486, 2007.

COSTA-JÚNIOR, J.S. **Análise Fitoquímica, Farmacológica e toxicological das sementes de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri)**, Tese (Doutorado em Genética e Toxicologia Aplicada). Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil, 2011a.

COSTA JUNIOR, J. S.; ALMEIDA, A. A. C.; FERRAZ, A. B. F.; ROSSATO, R. R.; SILVA, T. G.; SILVA, P. B. N.; MILITÃO, G. C. G.; CITÓ, A. M. G. L.; SANTANA, L. C. L. R.; CARVALHO, F. A. A.; FREITAS, R. M. Citotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Natural Product Research**, v. 27, p. 470-474, 2013.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, p. 1023-1035, 2004.

DUCHÊNE, D. **Cyclodextrins and their industrial uses**. Paris: Editions de Santé, 1987

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D. K.; ANDRES, V. J. R.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FEITOSA, C. M; TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTOS, F. J. B.; SILVA, D. C.; CAVALCANTE, A. A. C. M. A Doença de Alzheimer e o Uso de Plantas Medicinais. In: **Plantas Medicinais e a Doença de Alzheimer**, cap. 05, p.73-102, 2015a.

FEITOSA, C.; CAVALCANTE, A. N.; CHAVES, S. K. M.; ARAUJO, L. D. S. Medicinal plants of Brazil and Alzheimer's disease: Evolution in traditional use and pre-clinical studies. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, n. 6, v. 58, p. 1-13, 2016a.

FEITOSA, C. M.; CHAVES, S. K. M.; SANTOS, P. R. P.; CAVALCANTE, N. C.; COSTA JÚNIOR, J. S.; RASHED, K. Anticholinesterase activity and effects on memory in adult rats of 1, 3-distearoyl-2-oleoylglycerol substance isolated from *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro). **The Pharma Research**, n. 14, v. 2, p. 39-52, 2016b.

CAPÍTULO 2

FONTENELE, M. A.; FIGUEIREDO, R.W.; MAIA, G. A.; ALVES, R. E.; SOUSA, P. H. M. D.; SOUZA, V. A. B. D. Conservação pós-colheita de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) sob refrigeração e embalado em PVC. **Revista Ceres**, v.57, p. 292-296, 2005.

FRACETO, L.F.; GONÇALVES, M.M.; MORAES, C.M.; ARAÚJO, D.R.; ZANELLA, L.; PAULA, E.; PERTINHEZ, T.A. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína:β-ciclodextrina. **Química Nova**, v. 30, p. 1203-1207, 2007.

GANNIMANI, R.; RAMESH, M.; PILLAY, K.; SOLIMAN, M.E.; GOVENDER, P. Antipyrine–gamma cyclodextrin inclusion complex: Molecular modeling, preparation, characterization and cytotoxicity studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1089, p. 38-47, 2015.

GIACOBINI, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. **Neurochemical Research**, v. 28, p. 512-522, 2003.

GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; FRACETO, L. F.; BRITO, C. L.; TROSSINI, G. H. G.; MENESES, C. M. S.; FERREIRA, E. I.; MORAES, C. M. Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil-β-ciclodextrina. **Química Nova**, v. 31, p. 290-295, 2008.

GUIDOLIN, R. M.; CURCIO, G. R.; HANSEL, F. A. **Fracionamento de diferentes classes de compostos químicos por cromatografia líquida em coluna**. Anais do X evento de iniciação científica da EMBRAPA FLORESTAS. 2011.

HAMIDI, H.; ABDERRAHIM, R.; MEGANEM, F. Spectroscopic studies of inclusion complex of β-cyclodextrin and benzidine diammonium dipicrate. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, n. 75; p. 32-36, 2010.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. **Advanced Analytical Chemistry Instrumental**, v. 4, n. 2, p. 207-212, 1965.

KFLOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; RUELLAN, S.; FOURMENTIN, S. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. **Food Chemistry**, v. 164, p. 454-461, 2014.

KIENDREBEOGO, M; COULIBALY, A. Y.; NEBIE, R. C. H.; ZEBA, B.; LAMIEN, C. E.; LAMIEN-MEDA, A.; NACOULMA, O. G. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from six medicinal plants from Burkina Faso. **Revista Brasileira de Farmacognosia e Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 21, v. 1, p. 63-69, 2011.

LAI, D.; YANG, Z.; XUE, W.; SHENG, J.; SHI, Y.; YAO, X. Isolation, characterization and acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids from roots of *Stemona sessilifolia*. **Fitoterapia**, v. 89, p. 257-264, 2013.

LIDIANE, M. M. G.; NICOLLY, P.; VALERIA, G. C.; DEBORAH, Q. F.; KATIA, G. L. A. Inclusion complexes of bell pepper pigments with β -cyclodextrin: Preparation, characterization and application as natural colorant in yogurt. **Food Chemistry**, v. 148, p. 428-436, 2014.

LI, W.; LIU, X.; YANG, Q.; ZHANG, N.; DU, Y.; ZHU, H. Preparation and characterization of inclusion complex of benzyl isothiocyanate extracted from papaya seed with β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 184, p. 99-104, 2015.

LIU, R. **Water Insoluble Drug Formulation**, Interpharm, CRC Press. New York, 2000.

LIU, B.; LI, W.; ZHAO, J.; LIU, Y.; ZHU, X.; LIANG, G. Physicochemical characterisation of the supramolecular structure of luteolin/cyclodextrin inclusion complex. **Food Chemistry**, n. 141, p. 900-906, 2013.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmacy**, v. 225, p. 15-30, 2001.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do Infravermelho. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

CAPÍTULO 2

LOPES, C.R. et al. **Folhas de chá**. Viçosa: UFV, 2005.

LOUIZ, S.; LABIADH, H.; ABDERRAHIM, R. Synthesis and spectroscopy studies of the inclusion complex of 3-amino-5-methyl pyrazole with beta-cyclodextrin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 134, p. 276-282, 2015.

LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES SOBRINHO, J. L.; ROLIM NETO, P. J. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 117, 2010.

MACEDO, L, F, O. **Preparação e Caracterização de complexo de inclusão entre trimetoprim e 2-Hidroxiopropil-Gama-Ciclodextrina**. Dissertação - Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. 81 p. 2010.

MÁSSON, M.; LOFTSSON, T.; MÁSSON, G.; STEFÁNSSON, E. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. **Journal of Controlled Release**, v. 59, p. 107-118, 1999.

MEIRELLES, L. M. A. **Incremento de solubilidade do fármaco rifampicina por complexo de inclusão e dispersão sólida**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, 80 p. 2012.

MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**, Eduem, Maringá, Brazil, 2000.

MOURA, M. C. C.; HOMMA, A. K. O.; MENEZES, A. J. E. A. *et al.* **Bacuri: Agrobiodiversidade**. São Luís: Interamerican Institute for Cooperation on Agriculture, p. 210. 2007.

MOURÃO, K.S.M.; BELTRATI, C.M. Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). I. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento, **Acta Amazonica**, v. 25, p. 11-32, 1995.

NASCIMENTO, J. L. **Complexo de inclusão do extrato hexânico de *Platonia insignis* Mart e β -ciclodextrina: caracterização e avaliação das atividades gastroprotetora e antioxidante *in vitro***. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 137 p. 2013.

NEGI, J. S.; SING, S. Spectroscopic investigation on the inclusion complex formation between amisulpride and γ -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1835-1843, 2013.

NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z. Encapsulation of lycopene using spraydrying and molecular inclusion processes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 893-900, 2007.

PERES, T. B. **Noções Básicas de Cromatografia**. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental-Instituto Biológico. v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PERRY, E. K. **Behavioral and cognitive neuroscience**, v. 89, p. 261-264, 2003.

RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo**, v. 41, n. 3, p. 281-299, 2005.

REINECCIUS, T.; REIEENECCIUS, G.; PEPPARD, T. L. J. The Effect of Solvent Interactions on α -, β -, and γ -Cyclodextrin/Flavor Molecular Inclusion Complexes. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 388-392, 2005.

REIST, M.; DI GIOVANNI, S.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P. A. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 109-119, 2008.

RHEE, K. I.; VAN RIJN, M. R.; VERPOORTE, R. Qualitative Determination of false-positive effects in acetylcholinesterase assay using thin-layer chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 14, p. 127-131, 2001.

RIBEIRO, A.; FIGUEIRAS, A.; SANTOS, D.; VEIGA, F. Preparation and solid-state characterization of inclusion complex formed between miconazole and methyl- β -cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, p. 1102-1109, 2008.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SANTOS, P.R.P. **Estudos Farmacológicos e ensaios pré-clínicos de 1,3-diestearil-2- oleil-glicerol (TG1), derivado de *Platonia Insignis* Mart.** Dissertação (Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Piauí, 2012.

SANTOS, P. R. P.; CARVALHO, R. B. F.; COSTA JUNIOR, J. S.; FREITAS, R. M.; FEITOSA, C. M. Survey of physicochemical and pharmacological properties of extracts and compounds isolated from *Platonia insignis* Mart. a perspective for developing phytomedicines. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, p. 161-168, 2013.

SEIDL, C. **Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná/PR, 2010.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de psiquiatria do Rio Grande do Sul [online]**, v. 30, n. 1, p. 1-17, 2008.

SILVA, L. C.; FERREIRA, B. **Cromatografia em Coluna (C).** Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2009. Site: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAjJwAK/apostila-cromatografia-coluna>. (Acesso em 29/06/2015).

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6 ed., Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINGH, R.; BHARTI, N.; MADAN, J.; HIREMATH, S. N. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes – A Review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 171-183, 2010.

SKOOG, D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SPRICIGO, R.; BOTELHO, K.; CONSIGLIERI, V.; SERRA, C. H. R. Obtenção e Avaliação de Complexos de Inclusão de Furosemida com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina: Efeitos sobre as Propriedades de Dissolução do Fármaco. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 645-653, 2008.

SUN, D.Z.; LI, L.; QIU, X. M.; LIU, F.; YIN, B. L. 2006. Isothermal titration calorimetry and ^1H NMR studies on host-guest interaction of paeonol and two of its isomers with β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmacy**, v. 316, p. 7-13, 2006.

TAKAHASHI, A.I. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas**. Dissertação (Mestrado em fármaco e medicamentos). Universidade de São Paulo, São Paulo, 99 p. 2009.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

VEIGA, F.; FERNANDES, C.; MAINCENT. Influence of the Preparation Method on the Physicochemical Properties of Tolbutamide/Cyclodextrin Binary Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, p. 523-532, 2001.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Edições Minerva Coimbra. Coimbra. 1ª edição, 2006.

VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Total phenolics and antioxidant capacity "in vitro" of tropical fruit pulps. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 888-897, 2011.

ZHANG, Z.; WANG, X.; CHEN, Q.; SHU, L.; WANG, J.; SHAN, G. Clinical efficacy and safety of huperzine Alpha in treatment of mild to moderate Alzheimer disease, a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 82, p. 941-944, 2002.

ZHOU, Q.; WEI, X.; DOU, W.; CHOU, G.; WANG, Z. Preparation and characterization of inclusion complexes formed between baicalein and cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 733-739, 2013.

ZHOU, S. Y.; MA, S. X.; CHENG, H. L.; YANG, L. J.; CHEN, W.; YIN, Y. Q.; SHI, Y. M.; YANG, X. D. Host-guest interaction between pinocembrin and cyclodextrins: Characterization, solubilization and stability. **Journal of Molecular Structure**, v. 1058, p. 181-188, 2014.

YANG, R.; CHEN, J. B.; XIAO, C. F.; LIU, Z. C.; GAO, Z. Y.; YAN, S. J.; ZHANG, J. H.; ZANG, H. B.; LIN, J. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 655-662, 2014.

WANG, J.; CAO, Y.; SUN, B.; WANG, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1680-1685, 2011.

CAPÍTULO 3

(Artigo submetido a REVISTA toxicology reports)

toxicology
reports



Toxicity, cytotoxicity, mutagenicity and *in vitro* antioxidant models of 2-oleyl-1,3-dipalmitoyl-glycerol isolated from the hexane extract of *Platonia insignis* MART seeds

Antonio do Nascimento Cavalcante^{a,b,*}, Layana Karine Farias Lima^c, Felipe Pereira da Silva Santos^b, Matheus Oliveira do Nascimento^c, Cristiany Marinho Araújo^d, João Marcelo de Castro e Sousa^c and Chistiane Mendes Feitosa^{c,e}

^a Institute of Education, Science and Technology of Maranhão, 65760-000 Presidente Dutra – MA, Brazil, E-mail: antonio.cavalcante@ifma.edu.br/ant_cavalcante@yahoo.com.br, Tel: +55 86 99482 – 7734

^b Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Piauí, 64049-550 Teresina – PI, Brazil

^c Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, 64049-550 Teresina – PI, Brazil

^d Institute of Education, Science and Technology of Piauí, Teresina Campus South Zone, 64018-000 Teresina – PI, Brazil

^e Department of Chemistry, Federal University of Piauí, 64049-550 Teresina – PI, Brazil

**MODELOS ANTIOXIDANTES *IN VITRO*, TOXICIDADE,
CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO 2-OLEIL-1,3-
DIPALMITOIL-GLICEROL ISOLADO A PARTIR DO EXTRATO
HEXÂNICO DAS SEMENTES DE *Platonia insignis* MART**

Antonio do Nascimento Cavalcante, Layana Karine Farias Lima, Felipe Pereira da Silva Santos,
Matheus Oliveira do Nascimento, Cristiany Marinho Araújo, João Marcelo de Castro e Sousa e
Chistiane Mendes Feitosa

ABSTRACT

2-oleyl-1,3-dipalmitoyl-glycerol (ODG) was obtained from *Platonia insignis* seeds, for this triacylglycerol there are no studies on its toxicity and protective activities against oxidative stress. The objective of this study was to evaluate the toxicity of *Artemia salina*, the cytotoxic and mutagenic effects of *Allium cepa*, as well as to evaluate the *in vitro* antioxidant effects of ODG against the production of hydroxyl radicals, nitric oxide and reactive species with thiobarbituric acid (TBARS). ODG showed an median lethal dose (LD₅₀) greater than 1200 µg mL⁻¹ in *A. salina*. In the assay of *A. cepa* (0.002 – 0.2 mg mL⁻¹) the ODG compound at the highest concentration was slightly cytotoxic with a decrease in the size of roots and mitotic indexes, but did not induce chromosomal alterations. ODG (8.75 – 140.00 µg mL⁻¹) was found to reduce nitric oxide production by 41.6%, while the antioxidant standard ascorbic acid (AA) reduced 54.14%. ODG (15.625 – 250.00 µg mL⁻¹) promoted a removal of the hydroxyl radical by 35.69% at the highest concentration and was able to prevent lipid peroxidation induced by 2,2'-azobis-2-amidinopropane (AAPH), inhibiting the amount of TBARS formed, in up to 35.69%, a result close to that obtained with AA. Thus, ODG moderately reduced the levels of hydroxyl radicals, nitric oxide, and TBARS *in vitro* and was nontoxic at low concentrations.

Keywords: 2-oleyl-1,3-dipalmitoyl-glycerol; *Allium cepa*; *Artemia salina*; free radicals.

3.1 INTRODUÇÃO

As plantas e as ervas medicinais são consideradas uma das mais ricas fontes de agentes terapêuticos para o tratamento e prevenção de inúmeras doenças e enfermidades compondo cerca de 60% dos produtos farmacêuticos (PAN *et al.*, 2013). A crescente busca por novos fármacos a partir de plantas/ervas levou à descoberta de muitos compostos com potencial para

o desenvolvimento de drogas através do isolamento, elucidação da estrutura, composição e avaliação da bioatividade, com base na composição fitoquímica e nos usos na medicina tradicional (DIAS *et al.*, 2012; PAN *et al.*, 2013).

Nessa perspectiva as espécies pertencentes à família Clusiaceae são importantes plantas medicinais bastante utilizadas na medicina popular brasileira. Estudos envolvendo as propriedades biológico-farmacológicas dessa família podem ser comumente encontrados na literatura, sendo que a maior parte desses estudos se concentram, sobretudo, nos extratos vegetais de suas sementes (BILANDA *et al.*, 2010). As plantas pertencentes a família Clusiaceae possuem metabólitos secundários com importantes atividades biológicas. Esta família engloba árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras, produtos químicos de interesse farmacêutico e tintas (LUSTOSA, 2012). Pesquisas relacionadas sobre a composição química das plantas desta família apontam que elas são ricas em xantonas e benzofenonas poliisopreniladas que foram isolados não só a partir das resinas, mas também a partir de outras partes das plantas (PICCINELLI *et al.*, 2009; COSTA JUNIOR, 2011). Dentre as suas atividades biológicas conhecidas pode-se destacar: antidepressiva, antioxidante, antifúngica, anti-HIV e antibacteriana.

P. insignis é uma espécie que ocorre desde a Amazônia até o Piauí, onde o seu fruto (bacuri) é bastante consumido na forma *in natura* ou processado (AGUIAR *et al.*, 2008). As graxas obtidas a partir das sementes do bacuri são comumente utilizadas como cicatrizantes e anti-inflamatória (SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2010). Há relatos na literatura onde os extratos das sementes, frações e compostos isolados foram testados em várias atividades biológicas e apresentaram resultados promissores como, redução do *stress* oxidativo (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2010; RUFINO *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2014), eliminação de formas parasitárias (SILVA *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2018) e inibição enzimática da α -glucosidase e acetilcolinesterase (FREITAS *et al.*, 2018; CAVALCANTE *et al.*, 2019). Também foram relatados efeitos imuno-moduladores e baixa toxicidade *in vivo* para extratos obtidos das sementes (LUSTOSA *et al.*, 2016).

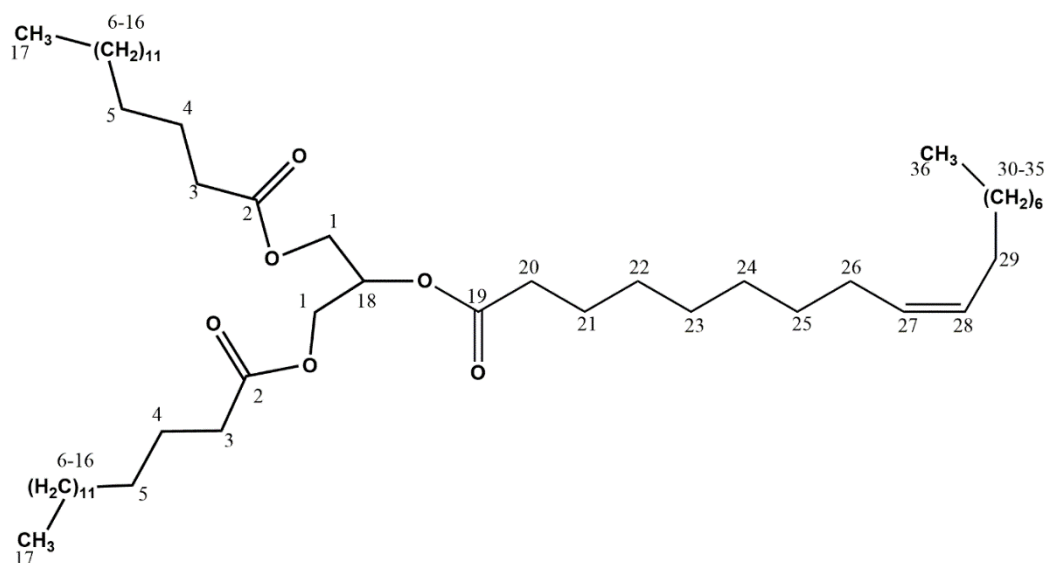
As sementes do bacuri são ricas em ácidos graxos, triacilgliceróis e em metabólitos com potencial atividade terapêutica, como as xantonas que exibem efeitos antiepiléticos e antiparasitários (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2011a; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013) e as benzofenonas poliisopreniladas, com efeito vasorelaxante em modelos animais (ARCANJO *et al.*, 2014). Um triacilglicerol isolado do extrato hexânico de suas sementes, o 1,3-diestearoil-2-oleil-glicerol (TG1), em formulações, foi efetivo em cicatrizar feridas em ratos (MENDES *et al.*, 2015).

Radical livre é definido como sendo todo átomo ou molécula que possui um ou mais elétrons desemparelhados sendo comumente formado em processos biológicos podendo ser eliminado por defesas antioxidantes (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010). Os antioxidantes podem atuar como defesas biologicamente importantes contra espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO's) e nitrogênio (ERN's) prevenindo ou diminuindo os danos oxidativos nos tecidos humanos produzidos por essas espécies reativas.

O processo de desenvolvimento de novos fármacos com ação antioxidante tem se tornado um importante objeto de pesquisa uma vez que a terapêutica farmacológica atual para o tratamento de várias doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, doença de Huntington, além de epilepsia e alguns tipos de neoplasias pode ser realizada devido às propriedades antioxidantes de muitos compostos naturais e/ou sintéticos (REED, 2011). Além disso, compostos com ação antioxidante podem retardar o envelhecimento (COSTA *et al.*, 2013). Dessa forma, a busca por novos agentes antioxidantes é extremamente necessária e atualmente é objeto de interesse em novas pesquisas pela indústria farmacêutica.

Nesse panorama o composto semi-sólido 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (Figura 3.1) é um triacilglicerol obtido das sementes de *P. insignis* Mart, para o qual ainda não há relatos na literatura sobre sua toxicidade e atividades protetoras contra o estresse oxidativo (EO), justificando assim, a necessidade da realização desse estudo. Considerando o potencial medicinal dos compostos obtidos de *P. insignis*, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos antioxidantes *in vitro*, bem como avaliar os efeitos toxicológicos e mutagênicos do composto 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol isolado da fração diclometânico do extrato hexânico das sementes do bacuri.

Figura 3.1: Estrutura química do 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG) obtido a partir das sementes de *Platonia insigninis*.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Reagentes e produtos químicos

Dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), sulfato de cobre penta hidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), $FeSO_4$, reagente modificado de Griess, 2-desoxirribose, ácido 2-tio-barbitúrico, dicloridrato de (2,20-azobis-(2-amidinopropano) [AAPH]); nitroprussiato de sódio (SNP), ácido tricloroacético, peróxido de hidrogênio, ácido ascórbico, ácido acético e monolato de polioxietilenosorbitano (Tween 80); dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma Co.

3.2.2 Preparo das amostras

O composto ODG foi isolado da fração diclorometânico a partir do extrato hexânico das sementes de *P. insigninis* conforme metodologia descrita por Cavalcante e colaboradores (2019), cuja estrutura foi elucidada por técnicas espectroscópicas (RMN 1H ; RMN ^{13}C e IV). O composto ODG e o ácido ascórbico (AA) foram solubilizados em Tween 80 0,05% (v/v) e solução salina com NaCl 0,9% (m/v).

3.2.3 Ensaio de Toxicidade3.2.3.1 Ensaio de letalidade de *Artemia salina*

A toxicidade frente à *Artemia salina* foi realizada de acordo com um ensaio proposto por Mclaughlin e colaboradores (1991). Nesse ensaio, os ovos de *A. salina* foram eclodidos em água com salinidade numa concentração de 12 ppm e após 48 horas, as larvas foram coletadas para os bioensaios. As diluições da amostra e do controle foram realizadas em água do mar artificial e em 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Soluções com ODG ($75 - 1200 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas em triplicata e também foi preparado um controle negativo somente com solução salina. Posteriormente foram adicionadas a estas soluções 10 náuplios (larvas) em cada tubo. Após 24 horas foi realizada a contagem das larvas sobreviventes. O procedimento foi repetido em concentrações intermediárias para se determinar a dose letal média (DL_{50}).

Para o preparo da água do mar sintética foi dissolvido em 1 litro de água destilada as seguintes substâncias com suas respectivas massas: NaCl – 15,153 g; MgCl – 1,398 g; MgSO₄ – 1,888 g; CaCl₂ – 0,652 g; KCl – 0,414 g e NaHCO₃ – 0,116 g.

3.2.3.2 Ensaio toxicogênico em *Allium cepa*

A citotoxicidade e mutagenicidade do composto ODG em *A. cepa* foram conduzidas de acordo com um procedimento proposto por Guerra e Souza (2002). Nesse método raízes de *A. cepa* com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram colocadas em recipientes contendo soluções com ODG ($0,002 - 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$), em triplicata, e observadas em diferentes tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). O tamanho das raízes (TR) foi utilizado como avaliação da toxicidade. Após a mensuração, as raízes foram fixadas em solução etanol-ácido acético (3:1), durante 24 h. Posteriormente as raízes foram lavadas em água destilada e hidrolisadas com HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ a 60°C , durante 10 minutos e coradas com uma solução aquosa de orceína acética a 2%. O potencial mutagênico foi avaliado por meio de análise do total de alterações cromossômicas (TAC) e de micronúcleos nas células meristemáticas de *A. cepa*, observando 1000 células por bulbo. O potencial citotóxico foi determinado pelo índice mitótico (IM). O IM de cada bulbo foi definido como o número de células em divisão por 1000 células. As análises foram realizadas em microscópio óptico 400X. O controle positivo (CP) foi uma solução aquosa diluída de sulfato de cobre $6 \times 10^{-4} \text{ mg mL}^{-1}$ e o controle negativo (CN) somente água destilada.

3.2.4 Avaliação da atividade larvicida do composto ODG frente as larvas do *Aedes aegypti*

A atividade larvicida, do ODG frente as larvas de *A. aegypti*, foi avaliado segundo o método proposto por World Health Organization (2005). A atividade do ODG foi analisada utilizando-se as concentrações, a saber: 30, 60, 90, 120 e 150 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) as quais foram dissolvidas em um meio de concentração de 1% (v/v) de DMSO, diluído em água destilada, para obter cada uma das concentrações. O controle negativo foi preparado usando apenas o veículo, solução aquosa de DMSO a 1% (v/v). 10 larvas do terceiro e/ou quarto estágio foram introduzidas em recipientes contendo as soluções de ODG (30 – 150 ppm) e também no recipiente contendo o controle. Este procedimento foi realizado em triplicata. O bioensaio da mortalidade larval foi registrado às 24 h e 48 h após o contato do ODG com as larvas, durante esse período as mesmas não foram alimentadas. A concentração letal (DL_{50}) que é a concentração da amostra necessária para matar 50% das larvas foi calculada usando o software Statistical GraphPad Prism 6.0 utilizado para cada tempo dos bioensaio com $p < 0,05$ considerados significativos.

As larvas de *A. aegypti* foram obtidas a partir de mosquitos adultos, provenientes do Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária (LAPES – UFPI) em Teresina-PI, mantidos em colônia semifechada a 28 ± 2 °C e 70 ± 10 % UR (Umidade Relativa). Os adultos foram alimentados com solução açucarada concentrada e as fêmeas realizam o repasto sanguíneo em camundongos. As larvas são alimentadas com ração de peixe trituradas durante toda fase evolutiva.

3.2.5 Atividade antioxidante *in vitro* do composto ODG**3.2.5.1 Ensaio de inibição dos radicais de oxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)**

O radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) foi gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 7,4). Após a geração, o $\text{NO}\cdot$ interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que serão medidos pela reação de Griess (BASU; HAZRA, 2006).

Após organizar os tubos de ensaios preparou-se as soluções da amostra ODG e do controle positivo, ácido ascórbico (AA), em 5 concentrações: 8,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 17,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$ usando como solvente/veículo solução de Tween 80 0,05% (v/v) dissolvido em solução aquosa de NaCl 0,9% (m/v).

Transferiu-se, em triplicata, 200 μL destas soluções para tubos de ensaios, em seguida adicionou 1 mL do meio reacional (nitroprussiato de sódio (NPS) 10 mmol L^{-1} em tampão fosfato de sódio 20 mmol L^{-1} em pH 7,4). Posteriormente colocou-se os tubos em banho-maria a 37 °C por 60 minutos. A 500 μL dessa solução, foram acrescentados 500 μL do reagente de Griess até completa homogeneização. Após 10 minutos as absorvâncias foram medidas em 540 nm (AJX-3000PC UV-Vis spectrophotometer).

A porcentagem de inibição do óxido nítrico gerado foi medida por meio da comparação dos valores de absorvância do controle (nitroprussiato de sódio) e dos valores de absorvância do meio reacional. O grupo NPS que reflete a produção de nitrito por meio da decomposição espontânea do NPS foi considerado como 100% da produção de $\text{NO}\cdot$.

A porcentagem da produção nitrito foi calculada pela Equação 3.1.

$$\% \text{NITRITO} = [(Ab_{\text{Scontrole}} - Ab_{\text{Smisturareacional}})] \times 100 / Ab_{\text{Scontrole}} \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde $Ab_{\text{Scontrole}}$: absorvância do controle (nitroprussiato de sódio); $Ab_{\text{Smisturareacional}}$: absorvância do meio reacional.

Enquanto a porcentagem de redução na produção de nitrito (%) foi calculada a partir da fórmula $\% = \text{NPS} - C$, onde NPS corresponde a nitroprussiato de sódio, que equivale à porcentagem de máxima produção (100%) do radical nitrito, e C corresponde à produção de nitrito na presença do ODG e do AA nas concentrações (8,75 – 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito formado por NPS sozinho (CARVALHO *et al.*, 2018).

3.2.5.2 Ensaio de inibição dos radicais hidroxilas ($\text{OH}\cdot$)

O radical hidroxila foi gerado pelo sistema de absorção de Fe^{3+} -EDTA- H_2O_2 (reação de Fenton). Este ensaio foi realizado por um método padrão (LOPES *et al.*, 1999), o princípio deste método é a quantificação do produto resultante da degradação da 2-deoxiribose, o malonaldeído (MDA), por meio da condensação desta substância com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, as reações foram iniciadas pela adição de Fe^{2+} a partir da mistura de soluções aquosa de FeSO_4 com concentração 6 mmol L^{-1} , 2-deoxiribose 5 mmol L^{-1} , H_2O_2 30% e tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 7,2).

CAPÍTULO 3

Após organizar os tubos de ensaios, preparou-se as soluções da ODG e do controle positivo, ácido ascórbico (AA), em 5 concentrações a saber: 15,625 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ usando como solvente solução de Tween 80 0,05% (v/v) dissolvido em solução aquosa de NaCl 0,9% (m/v).

Transferiu-se, em triplicata, 200 μL destas soluções preparadas para tubos de ensaios e em seguida adicionou-se 480 μL do meio reacional (100 μL do tampão fosfato 20 mmol L^{-1} pH 7,2; 40 μL da solução deoxirribose 5 mmol L^{-1} e 340 μL de H_2O_2 30%) e 20 μL de solução de FeSO_4 6 mmol L^{-1} . Após 15 min em temperatura ambiente adicionou-se 500 μL de ácido fosfórico 4% (v/v), seguido da adição de 500 μL TBA 1% (v/v, em NaOH 50 mmol L^{-1}). As soluções foram aquecidas em banho maria durante 60 min a 37 °C e depois resfriadas à temperatura ambiente por 10 min.

As absorvâncias foram medidas num espectrofotômetro modelo AJX-3000PC spectrophotometer em 532 nm. Os resultados foram expressos como equivalentes do MDA formados por Fe^{2+} e H_2O_2 .

A porcentagem da produção de malonaldeído foi calculada pela Equação 3.2.

$$(\%)\text{malonaldeído} = [(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{misturareacional}})] \times 100/\text{Abs}_{\text{controle}} \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde $\text{Abs}_{\text{controle}}$: absorvância do controle; $\text{Abs}_{\text{misturareacional}}$: absorvância do meio reacional.

As porcentagens de redução na produção de malonaldeído (%MDA) foram calculadas a partir da fórmula $\% \text{MDA} = \text{Sistema} - \text{C}$, onde o Sistema corresponde a uma mistura de FeSO_4 , 2-deoxirribose, H_2O_2 e equivalente em tampão fosfato à porcentagem de produção máxima (100%) de malonaldeído, e C corresponde à porcentagem de produção de malonaldeído na presença de do ODG e AA nas concentrações (15,625 – 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (CARVALHO *et al.*, 2018).

3.2.5.3 Ensaio de peroxidação lipídica (TBARS)

Foi utilizado homogenato da gema de ovos como meio rico em lipídios, conforme metodologia proposta por (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990; GUIMARÃES *et al.*, 2010). 200 μL das soluções do composto ODG em 5 concentrações: 15,625 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e do controle AA nas mesmas concentrações foram transferidas, em triplicata, para tubos com 500 μL do homogenato da gema do ovo em tampão

CAPÍTULO 3

fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 7,4). Em seguida alíquota de 100 µL a 0,12 mol L⁻¹ de dihidrocloridrato de 2,2'-azobis-2-metilpropinamida (AAPH) foram adicionados para induzir a peroxidação lipídica. Logo após, o sistema foi mantido sob agitação por 30 minutos a 37 °C. Após o resfriamento, adicionou-se 500 µL de ácido tricloroacético (15%) e centrifugou-se o sistema a 100 rpm por 10 minutos. Depois recolheu-se uma alíquota de 500 µL do sobrenadante e adicionou-se 500 µL da solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (0,67% m/v) onde a reação foi mantida sob aquecimento a 95 °C por 30 minutos.

As absorbâncias foram medidas a 532 nm (AJX-3000PC UV-Vis spectrophotometer). Os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas apenas por AAPH sozinho (controle induzido durante a peroxidação lipídica). A porcentagem da produção de TBARS (%TBARS) foi calculada pela fórmula: (%TBARS) = [(Ab_{Scontrole(AAPH)} - Ab_{Smisturareacional})] x 100/Ab_{Scontrole(AAPH)}.

As porcentagens de redução na produção de TBARS (%TBARS) foram calculadas a partir da fórmula %TBARS = Sistema - C onde, o Sistema corresponde à porcentagem de produção máxima (100%) do controle induzido (AAPH), e C corresponde à porcentagem de produção de TBARS na presença do ODG e AA nas concentrações (15,625 - 250 µg mL⁻¹) (CARVALHO *et al.*, 2018).

As atividades antioxidantes foram expressas como CE₅₀, definido como a Concentração Efetiva do composto ODG necessária para reduzir em 50% a concentração inicial dos radicais gerados.

3.2.6 Análises estatísticas

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (DP). Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) seguida de One-way, e testes de Bonferroni usando o GraphPad Prism (versão 6.0). Para significância estatística dos ensaios antioxidantes foi utilizada análise unidireccional da variância seguida da comparação múltipla de Holm-Šídák. Significância estatística foi definida como p ≤ 0.05 em relação ao controle, a nível de confiança de 95%. Os valores da CE₅₀ foram calculados por análise de regressão linear entre a porcentagem de inibição contra as concentrações do composto.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Toxicidade contra *Artemia salina* do composto 2-oleil-1,3-dimalpitoil-glicerol

A. salina (família Artemidae) é um microcrustáceo de água salgada muito consumido por peixes e outros crustáceos no ambiente natural devido à riqueza de proteínas, vitaminas e sais minerais. Os náuplios, que correspondem ao estágio larvar ou plactônico, de *A. salina* se reproduzem partogeneticamente e é uma espécie adaptada às mudanças ambientais de temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido. Como seus ovos podem ser facilmente encontrados em lojas de piscicultura bioensaios de toxicidade desse microcrustáceo apresentam praticidade e simplicidade o que torna sua utilização sistemática dentro de um laboratório de pesquisa (MEYER *et al.*, 1982).

Os testes de toxicidade são fundamentais para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos ou naturais. Análises pré-clínicas *in vitro*, *in silico* e em sistemas biológicos revelam efeitos tóxicos específicos e doses seguras que guiarão pesquisa futuras (PARASURAMAN, 2011). O bioensaio com *A. salina* é considerado útil para avaliações preliminares de toxicidade geral, sendo amplamente utilizado devido ao seu baixo custo e rapidez (NUNES *et al.*, 2006).

Os resultados deste bioensaio estão mostrados na Tabela 3.1, como pode-se verificar não houve morte de nenhum náuplio nas cinco concentrações testadas, assim como também no controle negativo, ou seja, todas as larvas de *A. salina* sobreviveram nestas concentrações.

Tabela 3.1: Resultados dos testes de toxicidade contra *A. salina*. n = 6 em triplicata.

Grupos	Número de náuplios	
	(t = 0 h)	(t = 24 h)
CN	10	10
75 µg mL ⁻¹	10	10
150 µg mL ⁻¹	10	10
300 µg mL ⁻¹	10	10
600 µg mL ⁻¹	10	10
1200 µg mL ⁻¹	10	10

Fonte: Arquivo pessoal.

CN: Controle negativo solução salina artificial

O composto ODG não apresentou toxicidade frente a *A. salina*, uma vez que a $DL_{50} > 1200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de DL_{50} abaixo de 1000 ppm em *A. salina* (MEYER *et al.*, 1982).

Portanto a substância ODG pode ser considerada atóxica ou de baixíssima toxicidade, conforme proposto por (McLAUGHLIN *et al.*, 1988) e quando comparado com as frações diclorometano e acetato de etila das sementes do bacuri, que apresentaram toxicidade média de 24,89 e 129,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013). A baixa toxicidade apresentada pelo ODG corrobora com resultados encontrados com outro triacilglicerol isolado das sementes do bacuri, o TG1 em células cancerosas (FEITOSA *et al.*, 2015).

3.3.2 Testes citogenéticos frente a *Allium cepa* do composto 2-oleil-1,3-dimalpitoil-glicerol

No planeta as plantas medicinais são bastante utilizadas na terapia de muitas doenças, sendo que em relação ao estudo do potencial citotóxico/mutagênico da maioria dessas plantas ainda não foram suficientemente estudados, o qual pode ser monitorado pelo uso do sistema teste de *A. cepa* (BAGATINE *et al.*, 2007).

Vicentini e colaboradores (2001), relataram que os chás e infusões de plantas medicinais podem conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos. Por outro lado, o consumo de chás pode suprimir os efeitos de agentes mutagênicos que estejam atuando sobre o organismo humano (SILVA *et al.*, 2004). Neste contexto, sendo de grande relevância estudos de citotoxicidade e mutagenicidade dessas substâncias, pois contribuem para utilização com mais segurança e eficácia dos fármacos obtidos a partir de plantas medicinais. Os parâmetros, índice mitótico e índice de replicação, são usados como indicadores de proliferação adequada das células (GADANO *et al.*, 2002), o que pode ser medido através do sistema teste vegetal de *A. cepa*. O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, WHO) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; SILVA *et al.*, 2004).

A caracterização toxicogenética do ODG foi avaliada por parâmetros macroscópicos e citogenéticos: tamanho das raízes (TR); índice mitótico (IM), e total de alterações cromossômicas (TAC). Na Tabela 3.2 pode-se observar que nas concentrações mais baixas do ODG (0,002 e 0,02 mg mL^{-1}) os resultados em relação à toxicidade e citotoxicidade mostraram

efeitos não tóxicos e não citotóxico estatisticamente significantes. Porém, na maior concentração ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) mostrou-se ligeiramente tóxica e citotóxica quando comparado ao controle negativo (CN) no tempo de exposição avaliados de 72 h, onde o TR diminui de $206,20 \pm 9,87$ para $127,84 \pm 8,78$ e o IM teve uma redução de $53,80 \pm 4,84$ para $29,89 \pm 4,12$. Em relação a avaliação mutagênica pode-se observar que nenhuma das concentrações analisadas apresentaram efeito mutagênico estatisticamente significativo como pode-se observar na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica do composto ODG em células meristemáticas de *A. cepa*.

Tratamento	Toxicidade	Citotoxicidade	Mutagenicidade
	TR (mm)	IM	TAC
CN	$206,20 \pm 9,87^b$	$53,80 \pm 4,84^b$	$2,80 \pm 0,83^b$
CP	$71,40 \pm 7,73^a$	$11,36 \pm 0,59^a$	$29,20 \pm 2,95^a$
$0,002 \text{ mg mL}^{-1}$	$244,66 \pm 11,23^b$	$49,20 \pm 2,37^b$	$6,00 \pm 2,34^b$
$0,02 \text{ mg mL}^{-1}$	$164,64 \pm 10,94^b$	$45,45 \pm 4,67^b$	$3,80 \pm 2,49^b$
$0,2 \text{ mg mL}^{-1}$	$127,84 \pm 8,78^a$	$29,89 \pm 4,12^{ab}$	$6,90 \pm 2,58^b$

Fonte: Arquivo pessoal.

TR: tamanho de raiz; IM: índice mitótico; TAC: total de alterações cromossômicas. CN: Controle negativo (água destilada); CP: Controle positivo (solução aquosa de sulfato de cobre a $6.10^{-4} \text{ mg mL}^{-1}$). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. $n=5$. Valores significantes (MD \pm DP) de $p<0,05$ para ^b comparado ao grupo sem tratamento, ^a à CP.

O ensaio de avaliação tóxica e citotóxica utilizando *A. cepa* é considerado um dos melhores sistemas de avaliação dos efeitos citogenéticos *in vivo* devido à sua alta sensibilidade, boa correlação com outros sistemas de teste, além do conveniente da espécie possuir cromossomos grandes e em pequeno número ($2n = 16$), sendo que seus resultados podem ser extrapolados para outros animais e plantas (BAGATINE *et al.*, 2007; ISLAM *et al.*, 2017).

A análise do parâmetro macroscópico (crescimento da raiz) de *A. cepa*, e do IM, que é calculado dividindo-se o número de células em divisão pelo número total de células observadas, mostraram que ODG teve um leve efeito tóxico na concentração de teste mais elevada ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$), em comparação com o controle negativo ($p<0,001$). Uma redução no IM pode ser interpretada como morte celular resultante de condições celulares anormais causadas pelo tratamento, que vão desde a parada do curso normal do ciclo celular, quebra do DNA, inibição

da formação de microtúbulos, até a da redução dos níveis de ATP, importantes na dinâmica da divisão celular (LEITE *et al.*, 2015). No entanto, a mutagenicidade, atividade baseada no número de alterações cromossômicas, com a presença de pontes e fragmentos relacionados a distúrbios na montagem de microtúbulos e morte celular não foram significativos quando comparado ao controle. Estes resultados mostraram que o composto apresenta uma toxicidade baixa e seletiva, e dependente de altas concentrações, semelhante a outro composto isolado das sementes do bacuri, a Garcinielliptona FC (GFC), que em camundongos apresentou baixa frequência de danos à medula óssea, fígado e sistema nervoso central (COELHO *et al.*, 2018). Apesar de alguns extratos das sementes do bacuri exibirem efeitos tóxicos *in vitro* e *in vivo*, inclusive com danos ao DNA, os compostos isolados têm apresentado uma maior segurança, fato esse que pode estar relacionado à presença no extrato de uma maior composição de compostos bioativos, como as xantonas, que somaticamente podem induzir uma determinada citotoxicidade (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013).

3.3.3 Avaliação da atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti*

Não houve diferença significativa na mortalidade larval entre as cinco concentrações avaliadas (30 – 150 ppm) e o grupo controle negativo, nas observações realizadas com 24 e 48 horas, após a montagem do experimento (Tabela 3.3). Contudo, a mortalidade larval nas concentrações de 60 e 90 ppm após 48 horas de exposição e a concentração de 150 ppm após 24 horas, foram significativamente mais efetivas quando comparadas ao grupo controle (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Resultados dos testes de toxicidade contra *A. aegypti*. n = 6 em triplicata.

Grupos	Nº larvas vivas	Nº larvas vivas	Nº larvas vivas
	(t = 0 h)	(t = 24 h)	(t = 48 h)
CN	10	10	10
30 ppm	10	10	10
60 ppm	10	10	9
90 ppm	10	10	9
120 ppm	10	10	10
150 ppm	10	10	10

Fonte: Arquivo pessoal.

CN: Controle negativo solução aquosa de DMSO 1% (v/v).

O composto ODG não apresentou atividade larvicida frente ao *A. aegypti*, uma vez que a $DL_{50} > 150$ ppm (maior concentração testada). De acordo com Cheng e colaboradores (2003) valores de $DL_{50} < 100$ ppm são considerados ativos. A DL_{50} obtida qualifica o ODG como um agente não larvicida uma vez que bons agentes larvicidas são as substâncias cujos valores de DL_{50} são inferiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.4. Ensaio de inibição dos radicais de óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)

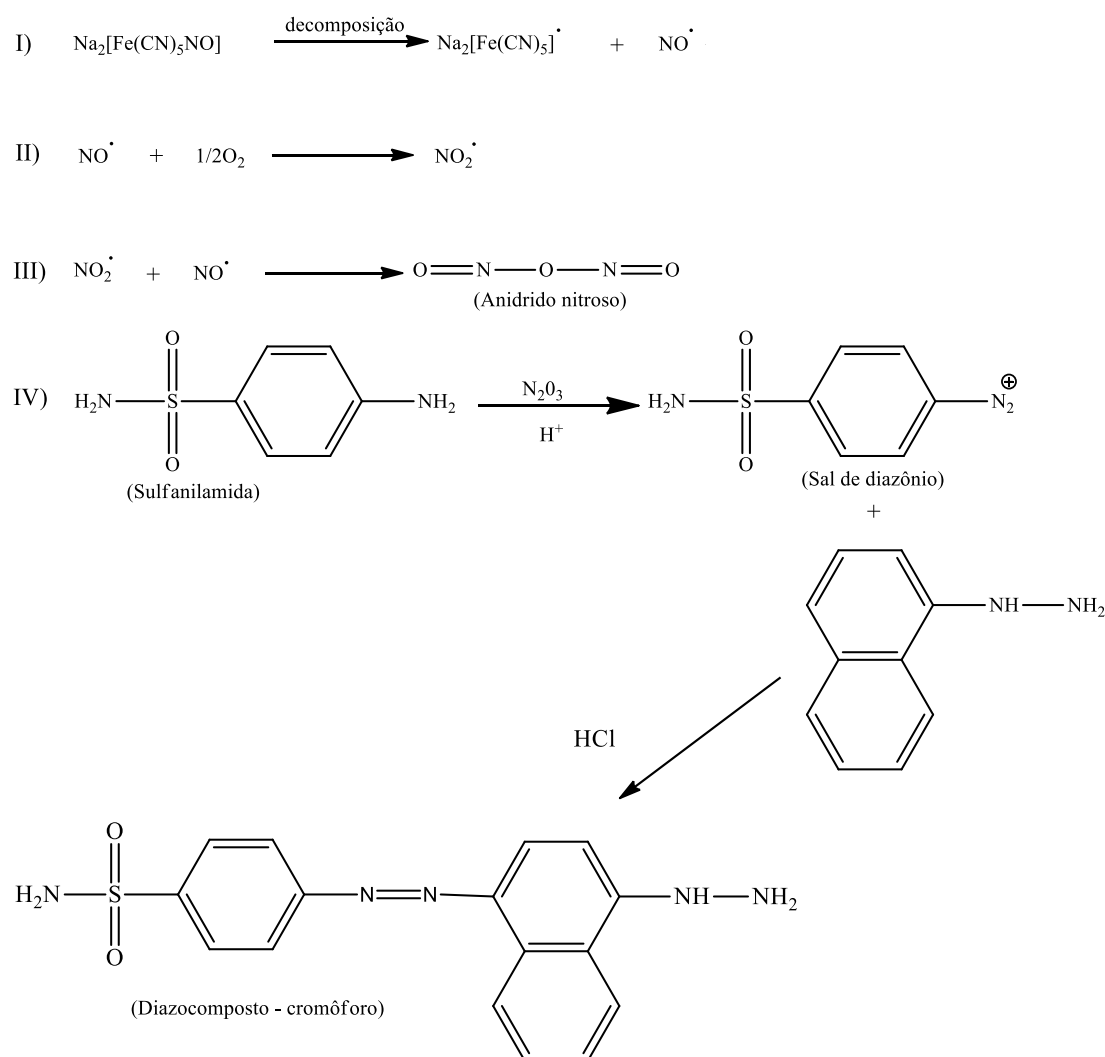
Em definição mais atual, pode-se dizer que antioxidante é uma substância que previne ou repara o dano oxidativo de uma molécula-alvo (ORAIAN; ESCRICHE, 2015). Nos últimos anos, os antioxidantes ganharam grande importância no tratamento ou prevenção de muitas doenças, como, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (HEPEL; ANDREESCU, 2015).

Na literatura mostram algumas evidências que o estresse oxidativo acelera os processos patológicos relacionados com a DA, como diminuição da memória e deposição de placas amilóides, sugerindo que substâncias antioxidantes possam ser reconhecidas como uma alternativa de tratamento para essa doença (LLEÓ *et al.*, 2006; KANAMARU *et al.*, 2015). Assim, nesse contexto, nos últimos tempos está havendo um grande interesse por estudos objetivando investigar o potencial terapêutico de compostos antioxidantes para prevenir ou até mesmo controlar o estresse oxidativo nos mais variados tipos de enfermidades (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O método de remoção do íon nitrito para avaliação da atividade antioxidante também foi utilizado, baseado na produção de radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) a partir da decomposição de nitroprussiato de sódio (NPS) em solução aquosa, como mostra as reações na Figura 3.2.

A primeira reação ocorre a decomposição espontânea do composto NPS gerando dois radicais como pode ser visto na etapa I. Na etapa II o radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) reage com o oxigênio do ar produzindo o radical nitrito ($\text{NO}_2\cdot$) que por sua vez vai reagir com o radical óxido nítrico (etapa III) formando o anidrido nitroso, reagente nitrosante (SYKES, 1991). O anidrido nitroso ao reagir com a sulfanilamida do reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina) a 1% em água, forma-se o sal de diazônio, que em seguida, realiza acoplamento diazo com o N-(1-naftil)-etilenodiamina para produzir o diazo composto de coloração violeta, um cromóforo de absorção máxima em 546 nm. Se no meio reacional houver substâncias antioxidantes, estas vão competir com o oxigênio, e a produção do radical nitrito $\text{NO}_2\cdot$ será reduzida.

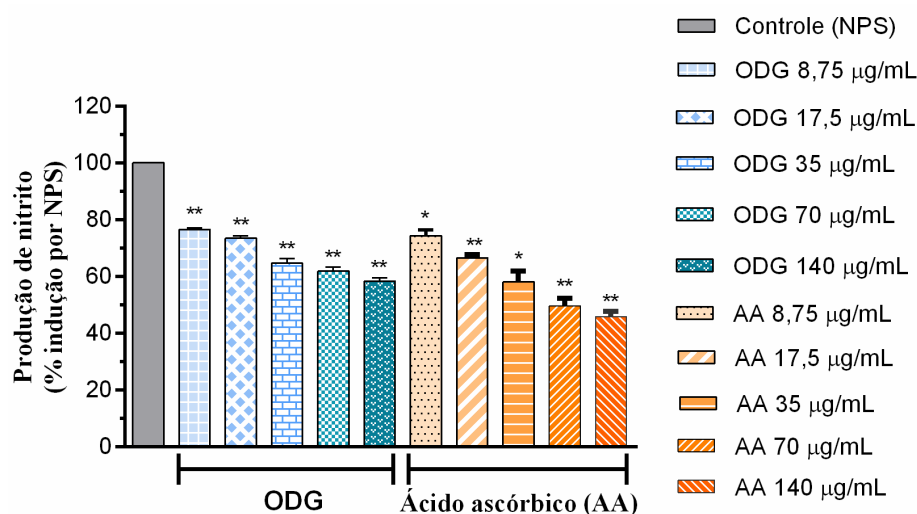
Figura 3.2: Mecanismo de reação para determinação dos radicais nitritos, segundo método de Griess.



Fonte: Adaptado NASCIMENTO, 2013.

Os resultados apresentados na Figura 3.3 demonstraram que o composto ODG foi capaz de diminuir o conteúdo de nitrito a partir de nitroprussiato de sódio (NPS) de maneira moderada, e de forma concentração dependente, quando comparado ao controle positivo AA. As concentrações utilizadas (8,75; 17,50; 35,00; 70,00 e 140,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de ODG e do controle AA reduziram a produção de nitrito em (23,44; 26,58; 35,35; 38,19 e 41,6%) e (25,66; 33,47; 41,96; 50,32 e 54,14%), respectivamente. Dessa forma, a substância ODG foi capaz de sequestrar o radical NO^\cdot e conseqüentemente diminuir o conteúdo de nitrito formado de maneira significativa em até 41,6% na maior concentração testada, e que o ácido ascórbico utilizado como controle positivo, nessa mesma concentração, reduziu a formação do nitrito em 54,14%, valores bem próximos como se observa na Figura 3.3.

Figura 3.3: Capacidade antioxidante da substância ODG e do controle positivo ácido ascórbico (AA), em diferentes concentrações (8,75 – 140 µg/mL), contra a produção do radical nitrito.



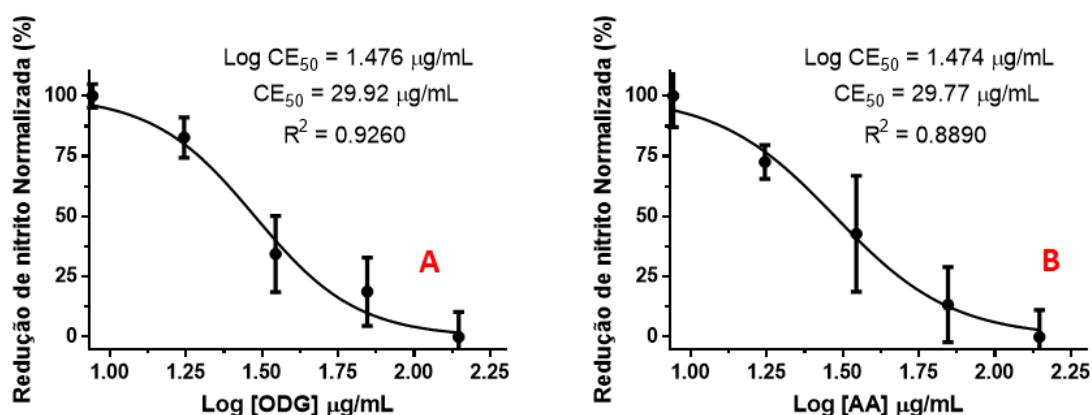
Fonte: Arquivo pessoal.

Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 5$ experimentos em triplicata. Considera-se estatisticamente significativo "p" quando ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao controle. Análise unidirecional da variância seguida da comparação múltipla de Holm-Šidák.

A concentração efetiva de ODG que reduz de 50% o conteúdo de radical nitrito (CE_{50}) foi de aproximadamente $29,92 \mu\text{g mL}^{-1}$ variando de $24,97$ a $35,86 \mu\text{g mL}^{-1}$ com intervalo de confiança de 95% e R^2 de 0,9260 enquanto que a CE_{50} do ácido ascórbico (AA) foi de $29,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ variando de $23,50$ a $37,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ com intervalo de confiança de 95% e R^2 de 0,8890 como pode-se observar na Figura 3.4 e Tabela 3.5. Com esses valores tão similares é possível afirmar que a substância ODG é antioxidante natural tão bom quanto o antioxidante sintético na redução do radical nitrito.

Valores próximos ao encontrado foi determinado em experimentos realizados por Sannigrahi e colaboradores (2010) onde a fração de acetato de etila do extrato metanólico de *Enhydra fluctuans* Lour, planta amplamente utilizada pela medicina indígena para diferentes fins, também inibiu moderadamente o óxido nítrico de forma dependente da dose com uma concentração eficiente média (CE_{50}) de $26,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em testes com a *Rhododendron anthopogonoides* Maxim, uma espécie de medicina tibetana tradicional, obteve-se uma CE_{50} de $183,83 \pm 2,34 \mu\text{g mL}^{-1}$ (JING *et al.*, 2015), valores bem mais altos comparados à ODG. De acordo com Ahmadi e colaboradores (2010) quanto menor o valor CE_{50} maior o potencial antioxidante da amostra.

Figura 3.4: Determinação da CE_{50} da redução do radical nitrito para ODG (A) e AA (B).



Fonte: Arquivo pessoal.

Os ensaios antioxidantes são bastantes realizados em plantas medicinais para avaliar a contribuição destas na minimização dos efeitos do estresse oxidativo nos processos fisiopatológicos, como ocorre nas doenças neurodegenerativas (KASOTE *et al.*, 2015). Na doença de Alzheimer o estresse oxidativo contribui para acelerar os processos patológicos relacionados com a patologia, como diminuição da memória e deposição de placas amilóides (HUANG *et al.*, 2016). Apesar do organismo apresentar defesas antioxidante endógenas a exacerbação do estresse oxidativo causa um desequilíbrio, que pode ser compensado pela suplementação com antioxidantes naturais (BIRBEN *et al.*, 2012). Dessa forma, produtos naturais poderiam ser uma alternativa na prevenção e no controle do estresse oxidativo e consequentemente modular os mecanismos neurodegenerativos subjacentes (LIMA *et al.*, 2018) como a substância ODG.

O composto ODG reduziu moderadamente, e de forma significativa o conteúdo de nitrito formado pela reação de Griess em concentrações próximas ao ácido ascórbico, dessa forma, seu uso na prevenção às lesões produzidas pelo óxido nítrico às membranas celulares em metodologias *in vivo* deve ser estimulado.

3.3.5 Ensaio de inibição dos radicais hidroxilas ($\text{OH}\cdot$)

Outra metodologia utilizada para avaliar o potencial antioxidante do ODG foi a avaliação da capacidade de remoção de radicais hidroxilas. Estes radicais são gerados sob condições fisiológicas e patológicas e mantêm a homeostase a nível celular em tecidos normais

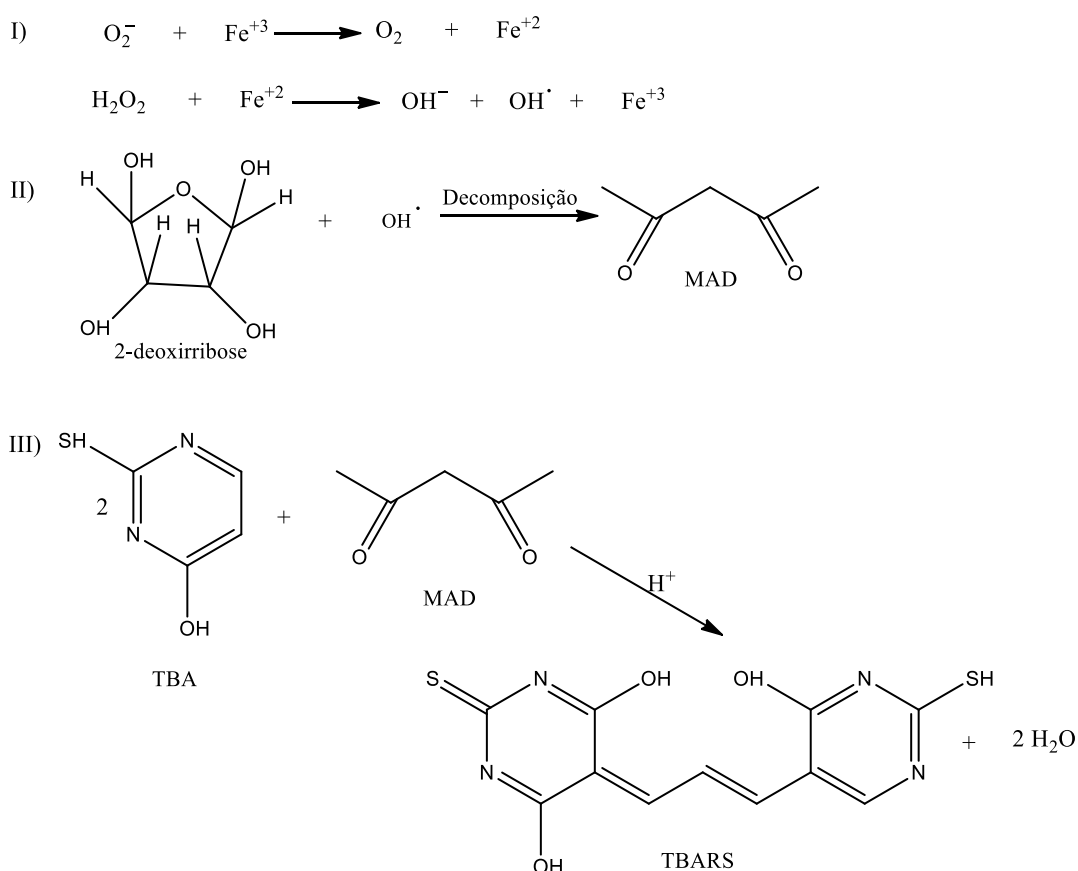
CAPÍTULO 3

e saudáveis, estando intimamente ligados a vários modelos de patologia, supostamente implicando estresse oxidativo (CHENG *et al.*, 2002).

A produção do radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) foi quantificada por meio da reação de Fenton (Figura 3.5 – I). Sendo que nesta reação o efeito *in vitro* da ODG contra a produção de $\text{OH}\cdot$ produzido pela degradação oxidativa da 2-deoxirribose (LOPES *et al.*, 1999). Na presença do radical hidroxila, a 2-deoxirribose é degradada a malonaldeído (MAD), posteriormente sendo quantificado, cujo processo reacional está descrito na Figura 3.5 – II (HUANG *et al.*, 2005; SERAFINI *et al.*, 2011).

O princípio deste método é a quantificação do produto resultante da degradação da 2-deoxirribose, o malonaldeído, por meio da condensação desta substância com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, as reações foram iniciadas pela adição de Fe^{2+} a partir da mistura de soluções aquosa de FeSO_4 com concentração 6 mmol L^{-1} , 2-deoxirribose 5 mmol L^{-1} , H_2O_2 30% e tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 7,2).

Figura 3.5: Reações envolvidas na quantificação do malonaldeído.

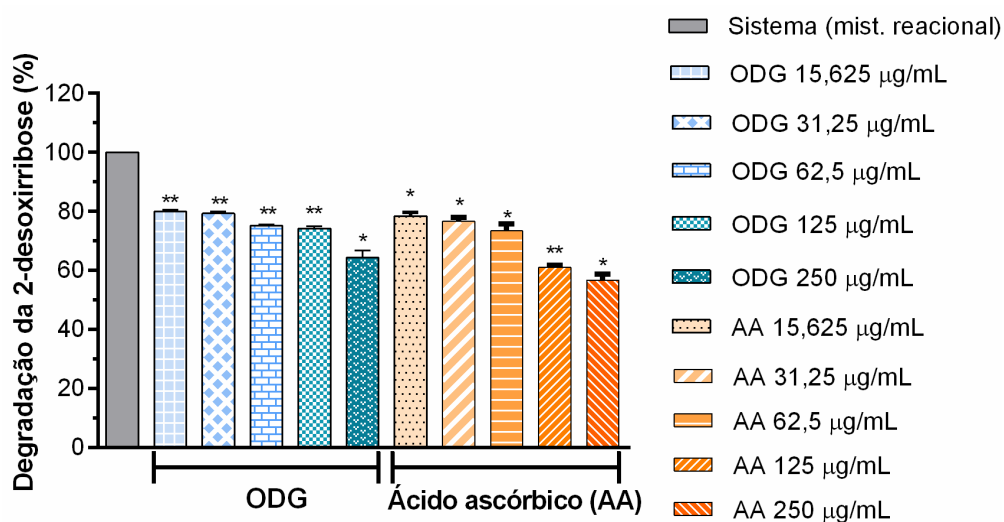


A atividade de eliminação de radicais hidroxilas foi quantificada utilizando a degradação oxidativa da 2-deoxirribose *in vitro*, que produz malonaldeído por condensação com

CAPÍTULO 3

ácido 2-tiobarbitúrico, com formação de um cromógeno rosa (HALLIWELL *et al.*, 1987; LOPES *et al.*, 1999). Nas concentrações testadas o ODG foi capaz de reduzir o radical hidroxila moderadamente e de maneira concentração dependente, quando comparado ao controle positivo AA. As concentrações utilizadas ($15,625 - 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) de ODG e do controle AA reduziram a produção de hidroxila em (19,92; 20,66; 24,87; 25,79 e 35,69%) e (21,51; 23,38; 26,51; 38,88 e 43,23%), respectivamente, (Figura 3.6). Dessa forma, a substância ODG, foi capaz de inibir o radical OH \cdot próximo de 36% na maior concentração testada, enquanto que o ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, nessa mesma concentração, reduziu a formação do radical hidroxila em quase 44%.

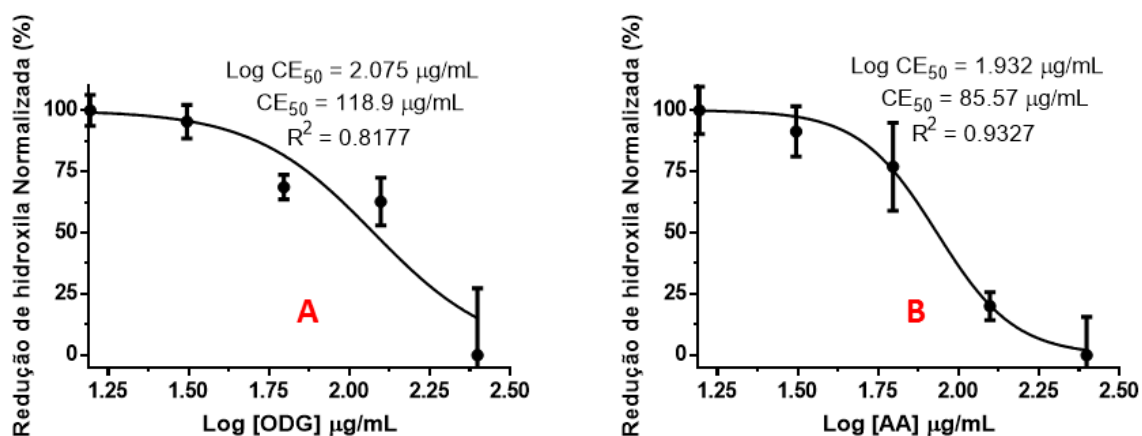
Figura 3.6: Capacidade antioxidante da substância ODG e do ácido ascórbico (AA), em diferentes concentrações ($15,625 - 250 \mu\text{g/mL}$), contra a formação do radical hidroxila.



Fonte: Arquivo pessoal.

Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 5$ experimentos em triplicata. Considera-se estatisticamente significativo "p" quando ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao controle. Análise unidirecional da variância seguida da comparação múltipla de Holm-Šidák.

A concentração efetiva média (CE_{50}) do ODG para inibição de formação do radical hidroxila foi de aproximadamente $118,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ variando de $88,06$ a $158,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ com intervalo de confiança de 95% e R^2 de 0,8177, por outro lado, o valor da CE_{50} do ácido ascórbico foi de aproximadamente $85,57 \mu\text{g mL}^{-1}$ variando de $72,79$ a $100,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ com intervalo de confiança de 95% e R^2 de 0,9327 como pode-se observar na Figura 3.7 e Tabela 3.5.

Figura 3.7: Determinação da CE₅₀ de redução do radical hidroxila para ODG (A) e AA (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

Estes radicais são gerados sob condições fisiológicas e patológicas, e são as principais espécies reativas de oxigênio (ERO's), causando peroxidação lipídica além de enormes danos biológicos (CHENG *et al.*, 2002; PHANIENDRA *et al.*, 2015). Quando estes radicais reagem com ácidos graxos poliinsaturados de fosfolípidios da membrana celular os radicais hidroxilas produzem hidroperóxidos lipídicos que podem ser decompostos por numerosos produtos carbonílicos, como o malonaldeído (MDA) (AYALA *et al.*, 2014). Os produtos carbonílicos são responsáveis por danos ao DNA e às proteínas, que culminam com câncer e doenças relacionadas ao envelhecimento. Assim, a diminuição da concentração de MDA indica o papel dos compostos testados como antioxidante (REPETTO *et al.*, 2012). Na doença de Alzheimer o conteúdo de MDA é aumentado como consequência da vulnerabilidade à peroxidação lipídica do cérebro, que ocorre devido à presença de um rico conteúdo de ácidos graxos e fosfolípidios em suas membranas e ao seu alto consumo de oxigênio (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993).

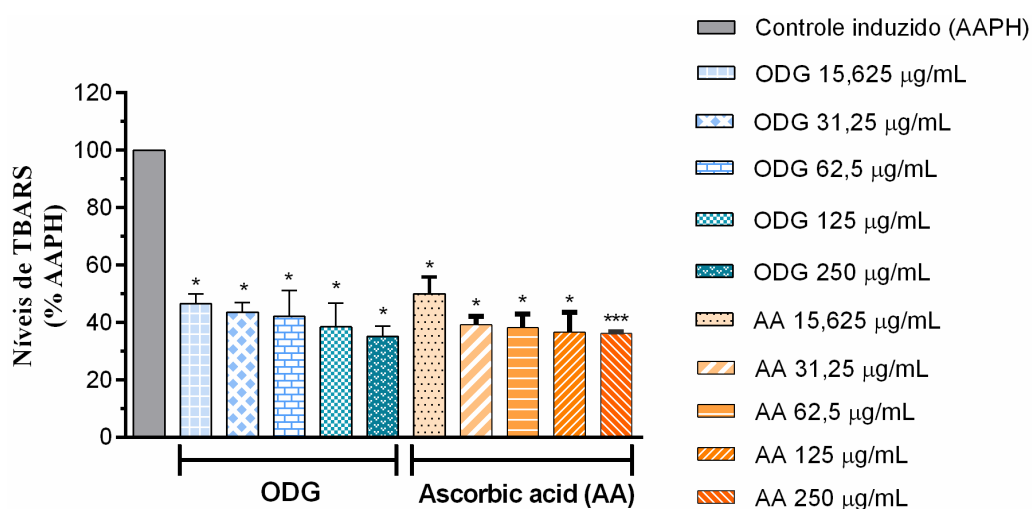
O composto ODG suprimiu a degradação da deoxiribose mediada por radicais hidroxila de um modo dependente da concentração, conforme o AA. Os resultados obtidos com o composto ODG são inferiores aos encontrados para o extrato hexânico das sementes do bacuri e seu complexo de inclusão, cuja maior redução foi observada no conteúdo de MDA (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Assim como o efeito tóxico, os efeitos antioxidante dos extratos das sementes do bacuri, também podem ser justificados pela presença de outras substâncias, como os compostos fenólicos, que atuam aditivamente na redução das espécies reativas (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013).

3.3.6 Ensaio de peroxidação lipídica (TBARS)

A determinação do conteúdo de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada para quantificar o nível de peroxidação lipídica (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Neste ensaio, o substrato rico em lipídios, usado foi a gema do ovo homogeneizada (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

A peroxidação lipídica pode ser definida como os danos biológicos causados por radicais livres que são formados durante estresse oxidativo (ZIN *et al.*, 2002). Vários extratos de plantas medicinais têm demonstrado efeito inibitório contra a peroxidação lipídica conforme verificado pelo método de produção de TBARS *in vitro* (MANIAN *et al.*, 2008). A peroxidação lipídica foi analisada pelo método de quantificação do TBARS, que é um ensaio bastante utilizado para estimar a peroxidação dos lipídios nas membranas, assim como em sistemas biológicos (AYALA *et al.*, 2014). O composto ODG nas concentrações testadas (15,625; 31,25; 62,50; 125,0 e 250,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) reduziu significativamente a peroxidação lipídica em (53,43; 56,33; 57,74; 61,48 e 64,7%), respectivamente, em relação ao grupo dihidrocloridrato de 2,2'-azobis-2-metilpropinamida (AAPH). O ácido ascórbico (AA) nas mesmas concentrações (15,625 – 250) reduziu a peroxidação lipídica em (49,96; 60,72; 61,74; 63,36 e 63,72%), respectivamente, como é mostrado na Figura 3.8.

Figura 3.8: Capacidade antioxidante da substância ODG e do ácido ascórbico (AA) contra a produção de TBARS em diferentes concentrações (15,625 – 250 $\mu\text{g/mL}$).



Fonte: Arquivo pessoal.

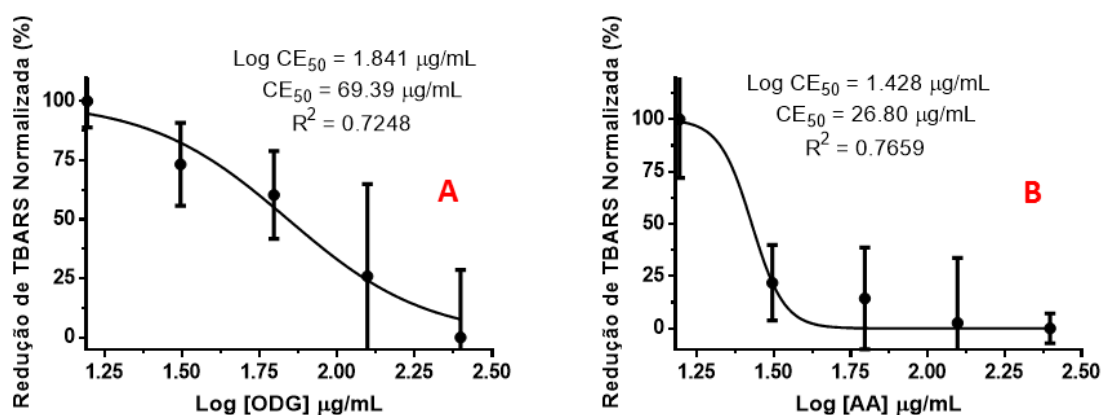
Efeitos ODG contra a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, n = 5 experimentos em triplicata. Considera-se "p" estatisticamente significativo quando *** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao controle. Análise unidirecional da variância seguida da comparação múltipla de Holm-Šidák.

CAPÍTULO 3

Dessa forma, a substância ODG, foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica em quase 65% na maior concentração testada, enquanto que o ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, nessa mesma concentração, diminuiu a peroxidação lipídica em quase 64%, valores bem consideráveis, como mostra a Figura 3.8.

A ODG diminuiu os níveis de peroxidação lipídica *in vitro* e promoveu a redução de 50% da produção das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) com um valor da CE_{50} de $69,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ variando de $45,57$ a $105,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ com intervalo de confiança de 95% e $R^2 = 0,7248$. O valor da CE_{50} do AA nas mesmas condições foi de $26,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ variando de $14,02$ a $51,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ com intervalo de confiança de 95% e $R^2 = 0,7659$ como pode-se observar na Figura 3.9 e Tabela 3.5. Embora a CE_{50} do ODG tenha sido 3,9 maior que a do controle AA, este composto é considerado um bom antioxidante natural uma vez que reduziu de forma significativa a produção de TBARS.

Figura 3.9: Determinação da CE_{50} de redução de TBARS para ODG (A) e AA (B).



Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 3.5, mostra os valores da CE_{50} para os testes antioxidantes avaliados bem como os limites mínimos e máximos no nível de confiança de 95%.

Tabela 3.5: CE_{50} do potencial antioxidante *in vitro* da ODG na produção de TBARS, teor de radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e formação de nitrito.

Teste	ODG		Ácido ascórbico (AA)	
	$CE_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$			
	CE_{50}	95%	CE_{50}	95%

NO·	29,92	24,97 – 35,86	29,77	23,50 – 37,70
OH·	118,9	88,06 – 158,6	85,57	72,79 – 100,6
TBARS	69,39	45,57 – 105,7	26,80	14,02 – 51,22

Fonte: Arquivo pessoal.

CE₅₀: Concentração Efetiva 50% em µg mL⁻¹; 95%: intervalo de confiança em µg mL⁻¹

Segundo Ahmadi e colaboradores (2010) quanto menor o valor da CE₅₀ maior o potencial antioxidante da amostra. Apesar do composto ODG apresentar altas concentrações efetivas médias de inibição dos radicais hidroxila e TBARS em relação ao controle positivo AA foi efetivo em todas as concentrações testadas em prevenir a peroxidação lipídica das membranas celulares, induzida por radicais peroxila gerados por AAPH, de forma bastante significativa. Esse fato pode ser explicado em parte, pela interação dos componentes do ODG com intermediários da redução parcial do oxigênio e do metabolismo do óxido nítrico, além de uma possível proteção contra a autooxidação lipídica das membranas, principais fatores envolvidos na peroxidação lipídica (REPETTO *et al.*, 2012). Estes resultados sugerem que o composto ODG exerce uma ação protetora às biomoléculas contra a peroxidação dos fosfolipídios, triacilgliceróis e ácidos graxos poliinsaturados, imprescindíveis para a função da membrana celular e sinalização parácrina (COSTA *et al.*, 2013).

3.4 CONCLUSÃO

O composto 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol não apresentou toxicidade frente a *A. salina*. Em relação aos ensaios frente a *A. cepa* a substância mostrou-se efeitos não tóxicos e não citotóxicos em baixas concentrações, porém, em concentração mais elevada a substância ODG mostrou-se ligeiramente tóxico e citotóxico em comparação ao controle negativo. A substância ODG não apresentou efeito mutagênico. A substância ODG não apresentou atividade larvicida frente as larvas de *Aedes aegypti* nas concentrações analisadas.

Diante dos resultados, os ensaios antioxidantes *in vitro* indicaram que o composto ODG é um composto antioxidante natural, e com baixa toxicidade nos modelos analisados, que pode ser útil na prevenção e no progresso de várias doenças, inclusive as neurodegenerativas. Os resultados deste trabalho contribuem para ampliar o conhecimento sobre as propriedades antioxidantes e tóxicas da ODG, uma vez que ainda não haviam sido descritos na literatura.

Entretanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os possíveis mecanismos de ação que medem à ação antioxidante da ODG, principalmente *in vivo* para justificar seu possível uso no tratamento clínico.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. P.; FIGUEIREDO, R. W. D.; ALVES, R. E.; MAIA, G. A.; SOUZA, V. A. B. D. *et al.* Physical and physico-chemical characterization of fruits from diferente genotypes of bacuri (*Platonia insignis* Mart.). **Food Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 423-428, 2008.

AHMADI, F.; SADEGHI, S.; MODARRESI, M.; ABIRI, R.; MIKAELI, A. Chemical composition, in vitro anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth., of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, n. 48, v. 5, p. 1137-1144, 2010.

ARCANJO, D. D. R; COSTA JÚNIOR, J. S.; MOURA, L. H. P; FERRAZ, A. B. F.; ROSSATTO, R. R.; DAVID, J. M.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; OLIVEIRA, R. C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; OLIVEIRA, A. P. Garcinielliptone FC, a polyisoprenylated benzophenone from *Platonia insignis* Mart., promotes vasorelaxant effect on rat mesenteric artery. **Natural Product Research**, v. 28, n. 12, p. 923-927, 2014.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-31, 2014.

BAGATINE, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 17, v. 3, p. 444-447, 2007.

BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, *in vitro* and *ex vivo*, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 10, p. 896-900, 2006.

CAPÍTULO 3

BILANDA, D. C.; DIMO, T.; DZEUFIEF DJOMENI, P. D.; BELLA, N. M. T.; ABOUBAKAR, O. B. F.; NGUELEFACK, T. B.; TAN, P. V.; KAMTCHOUING, P. Antihypertensive and antioxidant effects of *Allanblackia floribunda* Oliv. (Clusiaceae) aqueous. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 634-640, 2010.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, p. 9-19, 2012.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, p. 211-214, 1999.

CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R. D.; FARIAS, R. R. S. D.; CHAVES, M. H.; FEITOSA, C. M.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; PESSOA, C. D. Ó. Phenolic derivatives and antioxidant activity of polar extracts from *Bauhinia pulchella*. **Química Nova**, v. 41, p. 405-411, 2018.

CAVALCANTE, A. C.; FEITOSA, C. M.; SANTOS, F. P. S.; SOUSA, A. P. R.; JÚNIOR, R. S. S.; SOUZA, A. A.; PINTO, B. F.; ARAÚJO, C. M.; RASHED, K. Elaboration and characterization of the inclusion complex between β -cyclodextrin and the anticholinesterase 2-oleyl-1,3-dipalmitoyl-glycerol extracted from the seeds of *Platonia insignis* MART. **Journal of Molecular Structure**, v. 1177, p. 286-301, 2019.

CHENG, F. C.; JEN, J. F.; TSAI, T. H. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. **Journal of Chromatography B**, v. 781, p. 481-496, 2002.

CHENG, S. S.; CHANG, H. T.; CHANG, S. T.; TSAI, K. H.; CHEN, W. J. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, p.99-102, 2003.

COÊLHO, E. S.; LOPES, G.L.N.; PINHEIRO, I. M.; HOLANDA, J. N. P.; ALVES, M. M. M.; NOGUEIRA, N. C.; CARVALHO, F. A. A.; CARVALHO, A. L. M. Emulgel based on amphotericin B and bacuri butter (*Platonia insignis* Mart.) for the treatment of Cutaneous Leishmaniasis: characterisation and *in vitro* assays, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, p. 1-38, 2018.

CAPÍTULO 3

COELHO, V. R.; PRADO, L. S.; ROSSATO, R. R.; FERRAZ, A. B. F.; VIEIRA, C. G.; SOUZA, L. P.; PFLUGER, P.; REGNER, G. G.; VALLE, M. T. C.; LEAL, M. B.; DALLEGRAVE, E.; CORRÊA, D. S.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P. A 28-day sub-acute genotoxic and behavioural assessment of garcinielliptone FC. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 123, p. 207-212, 2018.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FREITAS, R. M.; CITÓ, A. M. G. L.; HENRIQUES, J. A. P.; SAFFI, J. Evaluation of effects of ethanolic extract (EE) from *Platonia insignis* Mart. on pilocarpine-induced seizures. **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2010.

COSTA JÚNIOR, J. S. **Análise Fitoquímica, Farmacológica e toxicológica das sementes de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri)**. Tese (Doutorado em Genética e Toxicologia Aplicada). Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil, 217 p. 2011.

COSTA JÚNIOR, J. S.; ALMEIDA, A. A. C.; TOMÉ, A. D. R.; CITÓ, A. M. G. L.; SAFFI, J.; FREITAS, R. M. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 4, p. 678- 684, 2011a.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; SOUSA, T. O.; SILVA, R. A. C.; LIMA, S. G.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; MELO CAVALCANTE, A. A. C.; FREITAS, R. M.; MOURA SPEROTTO, A. R. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. seed. **Basic Clinical Pharmacology e Toxicology**, v. 112, n. 1, p. 34-41, 2013.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, p. 689-695, 1993.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, n. 27, p. 407-421, 1990.

CAPÍTULO 3

FEITOSA, C. M.; SANTOS, P. R. P.; FREITAS, R. M.; RODRIGUES, A. M. X.; COSTA JÚNIOR, J. S.; CAVALCANTE, A. N. Pre-clinical trials in rats treated with 1, 3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) constituent isolated from *Platonia insignis*. **ConScientiae Saúde**, v. 14, p. 327-345, 2015.

GADANO, A. et al. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 11-6, 2002.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561-64, 2010.

GUERRA, M.; SOUZA, M. **Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto SP: FUNPEC, p. 19, 2002.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J. P. A.; ROCHA, R.; MOREIRA, J. C. F.; ARAÚJO, A. A.; GELAINN, D. P.; QUINTANS JÚNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, n. 107, v. 6, p. 949-57, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, v. 165, p. 215-219, 1987.

HEPEL, M.; ANDREESCU, S. Oxidative stress and human health. In: HEPEL, M.; ANDREESCU, S. (Ed.). **Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy**. Washington: **American Chemical Society**, v. 2, p. 1-33, 2009.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, W. J.; ZHANG, X. I. A.; CHEN, W. W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease, **Biomedical Reports**, v. 4, p. 519-522, 2016.

CAPÍTULO 3

ISLAM, M. T.; STRECK, L.; ALENCAR, M. V. O. B.; SILVA, S. W. C.; MACHADO, K. C.; COSTA JÚNIOR, J. S. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion, **Chemosphere**, v. 177, p. 93-101, 2017.

JING, L.; MA, H.; FAN, P.; GAO, R.; JIA, Z. Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 287-299, 2015.

KANAMARU, T.; KAMIMURAA, N.; YOKOTA, T.; IUCHI, K.; NISHIMAKI, K.; TAKAMI, S.; AKASHIBA, H.; SHITAKA, Y.; KATSURA, K.; KIMURA, K.; OHTA, S. Oxidative stress accelerates amyloid deposition and memory impairment in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 587, p. 126-131, 2015.

KASOTE, D. M.; KATYARE, S. S.; HEGDE, M. V.; BAE, H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International Journal Biological Science**, v. 11, p. 982-991, 2015.

LEITE, A. D. S.; DANTAS, A. F.; OLIVEIRA, G. L. D. S.; GOMES JÚNIOR, A. L.; LIMA, S. G.; CITÓ, A. M. D. G. L.; LOPES, J. A. D. Evaluation of toxic, cytotoxic, mutagenic, and antimutagenic activities of natural and technical cashew nut shell liquids using the *Allium cepa* and *Artemia salina* bioassays, **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-16, 2015.

LIMA, L. K. F.; PEREIRA, S. K. S.; SANTOS JÚNIOR, R. S.; SANTOS, F. P. S.; NASCIMENTO, A. S.; FEITOSA, C. M.; FIGUERÊDO, J. S.; CAVALCANTE, A. N.; ARAÚJO, E. C. C.; RAI, M. A brief review on the neuroprotective mechanisms of vitexin. **Biomed Research International**, v. 2018, p. 1-8, 2018.

LLEÓ, A.; GREENBERG, S. M.; GROWDON, J. H. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. **Annual Review of Medicine**, v. 57, p. 513-533, 2006.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; LIMA, M. H. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.

LUSTOSA, A. K. M.; ARCANJO, D. D.; RIBEIRO, R. G.; RODRIGUES, K. A. F.; PASSOS, F. F. B.; PIAUILINO, C. A. *et al.* Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 77-82, 2016.

MANIAN, R.; ANUSUYA, N.; SIDDHURAJU, P.; MANIAN, S. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1000-1007, 2008.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A. (Org.). **Studies in Natural Product Chemistry**, p. 383-409, 1991.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L. ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Therapeutic Innovation & Regulatory Science**, v. 32, n. 2, p. 513-524, 1998.

MENDES, M. C. S.; LACERDA, J. S.; JUNIOR, L. M. R.; SILVA, M. L. D. G.; COELHO, M. L.; TOME, A. R.; FREITAS, R. M. Evaluation of the cicatrizant activity of a semisolid pharmaceutical formulation obtained from *Platonia insignis* Mart. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 6, p. 154-164, 2015.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; Mcl. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

NASCIMENTO, J. L. **Complexo de inclusão do extrato hexânico de *Platonia insignis* MART e β -ciclodextrina: caracterização e avaliação das atividades gastroprotetora e antioxidante *in vitro***. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 137 p. 2013.

NASCIMENTO, J. L.; COELHO, A. G.; BARROS, Y. S. O.; SILVA, O. A.; FREITAS, R. M.; ROCHA, M. S.; CITÓ, A. M. D. G. L. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato

CAPÍTULO 3

hexânico da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina. **Boletim Informativo Geum**, v. 2, p. 1-18, 2014.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; STAPPEN, G. V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 453-462, 2006.

OLIVEIRA, G. L. D.; SILVA, A. P. S. C. L.; FEITOSA, C. M.; ALMEIDA, F. R. C. Considerações Sobre antioxidantes e o Estresse Oxidativo. In: **Antioxidantes: aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos**. Campinas-SP. Editora Átomo. Cap. 1, p. 11-18, 2017.

ORAIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p.10-36, 2015.

PAN, S. Y.; ZHOU, S. F.; GAO, S. H.; YU, Z. L.; ZHANG, S. F.; TANG, M. K. *et al.* New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-25, 2013.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 74-79, 2011.

PICCINELLI, A. L.; CAMPONE, L.; DAL PIAZ, F.; CUESTA-RUBIO, O.; RASTRELLI, L. Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1688-1698, 2009.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, p. 11-26, 2015.

REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1302-1319, 2011.

CAPÍTULO 3

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. **Lipid peroxidation**, p. 716, 2012.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA CALIXTO, F.; MANCINI FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SANNIGRAHI, S.; KANTI MAZUDER, U.; KUMAR PAL, D.; PARIDA, S.; JAIN, S. Antioxidant Potential of Crude Extract and Different Fractions of *Enhydra fluctuans* Lour. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**, v. 9, n. 1, p. 75-82, 2010.

SANTOS JÚNIOR, R. Q.; SOARES, L. C.; MAIA FILHO A. L. M.; ARAÚJO, K. S.; SANTOS, I. M. S. P.; COSTA JÚNIOR, J. S. SAFFI, J. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). **ConScientiae Saúde**, v. 9, n. 4, p. 575-581, 2010.

SERAFINI, M. R.; SANTOS, R. C.; GUIMARÃES, A. G.; SANTOS, J. P. A.; SANTOS, A. D. C.; ALVES, I. A.; GELAIN, D. P.; NOGUEIRA, P. C. L.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; ARAÚJO, A. A. S. *Morinda citrifolia* Linn leaf extract possesses antioxidant activities and reduces nociceptive behavior and leukocyte migration. **Journal of Medicinal Food**. v. 14, n. 10, p. 1159-1166, 2011.

SILVA, A. P.; SILVA, M. P.; OLIVEIRA, C. G.; MONTEIRO, D. C.; PINTO, P. L.; MENDONÇA, R. Z.; MORAES, J. Garcinielliptone FC: antiparasitic activity without cytotoxicity to mammalian cells. **Toxicology In Vitro**, v. 29, p. 681-687, 2015.

SILVA, C. R.; MONTEIRO, M. R.; CALDEIRA, A.; BEZERRA, R. J. A. C. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 1-3, 2004.

SYKES, P. A Guidebook to mechanism in organic chemistry, 6th. ed., **Longman Scientific & Technical**, Londres, 1991.

CAPÍTULO 3

VICENTINI, V. E. P. *et al.* *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 593-598, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION COMMUNICABLE DISEASE CONTROL, PREVENTION AND ERADICATION WHO PESTICIDE EVALUATION SCHEME. GUIDELINES FOR LABORATORY AND FIELD TESTING OF MOSQUITO LARVICIDES, 2005.

ZIN, Z. M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**, v. 78, p. 227-231, 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos estudos fitoquímicos e farmacológicos dos extratos assim como das substâncias isoladas a partir de *P. insignis* mostraram que esta espécie é uma potencial fonte promissora para elaboração de possíveis fármacos. Algumas das propriedades farmacológicas encontradas nos extratos dessa espécie vegetal e a partir de compostos isolados foram antiinflamatória, antioxidante, anticonvulsiva, cicatrizante e anticolinesterásica, dentre outras. Em sua composição química o bacurizeiro apresenta classes de terpenos, xantonas e compostos fenólicos como constituintes majoritários.

O composto 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol (ODG) foi isolado a partir da fração diclometânico do extrato hexânico das sementes de *P. insignis* e elucidado através das técnicas de RMN ¹H; RMN ¹³C e IV.

Através de determinação *in vitro* da atividade anticolinesterásica apresentou inibição qualitativa e quantitativa significativa para a enzima AChE.

Foi determinado o potencial antioxidante *in vitro* do composto ODG através da redução dos radicais óxido nítrico, hidroxila e TBARS, onde verificou-se redução de até 41,6%; 35,69% e 64,7%, respectivamente.

O composto ODG não apresentou toxicidade frente a *A. salina* nas concentrações analisadas. Em relação aos ensaios toxicogenéticos frente a *A. cepa* a substância mostrou-se efeitos não tóxicos e não citotóxicos em baixas concentrações, porém, em concentração mais elevada mostrou-se ligeiramente tóxico e citotóxico em comparação ao controle negativo. A substância ODG não apresentou efeito mutagênico em nenhuma das concentrações testadas.

ODG não apresentou atividade larvicida frente as larvas de *Aedes aegypti* nas concentrações analisadas.

Diante dos resultados analisados, os ensaios antioxidantes *in vitro* indicaram que o composto ODG é bom antioxidante natural, e com baixa toxicidade nos modelos analisados, que pode ser útil na prevenção e no progresso de várias doenças, inclusive as neurodegenerativas. Os resultados deste trabalho contribuem para ampliar o conhecimento sobre as propriedades antioxidantes e tóxicas do ODG, uma vez que ainda não haviam sido descritos na literatura.

Foi preparado complexo de inclusão entre a substância ODG e β -CD pelo método de solubilização seguido por liofilização e caracterizado por IV, DSC, TG, DRX, RMN e MEV. Os resultados mostraram a efetiva formação do complexo ODG- β -CD e o modo de inclusão.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho mostrou que a complexação do ODG provocou mudanças nas propriedades deste composto, como um aumento na solubilidade e alteração no perfil de liberação.

A constante de estabilidade aparente apresentou um valor relativamente alto (339,38 L mol⁻¹), indicando uma boa interação entre o ODG e a β -CD. A estequiometria de formação do complexo foi de 1:1 e a eficiência de inclusão foi de 57,82%.

Os resultados mostraram que β -CD pode ser um excipiente adequado para aumentar a solubilidade e liberação controlada do ODG.

Tais resultados foram importantes para uma melhora no entendimento das propriedades físico-químicas do complexo de inclusão, podendo futuramente ser um potencial alternativa para a terapia de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer.

ANEXOS

FIGURA A1: Artigo publicado em 2015 na Revista científica *ConScientiae Saúde*.

DOI:10.5585/ConsSaude.v14n4.5658

Recebido em 22 abr. 2015 / aprovado em 19 nov. 2015

Ensaio pré-clínico em ratos tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol, constituinte isolado de *Platonia insignis*

Pre clinical trials in rats treated with 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol (TG1) constituent isolated from Platonia insignis

Chistiane Mendes Feitosa^{1,3}; Patricia Régia Pereira dos Santos²; Rivelilson Mendes de Freitas³; Aldenora Maria Ximenes Rodrigues⁴; Guilherme Antônio Lopes de Oliveira⁵; Joaquim Soares da Costa Júnior⁶, Antonio do Nascimento Cavalcante⁷

¹Bolsista de Produtividade do CNPq, docente dos programas de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Química da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, PI - Brasil.

²Mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina-Piauí, Brasil.

³*In memoriam*. Bolsista de Produtividade do CNPq, docente dos programas de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Rede Nordeste de Biotecnologia-Ponto focal – RENORBIO da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, PI - Brasil.

⁴Mestranda do Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina, PI - Brasil.

⁵Doutorando do programa Rede Nordeste de Biotecnologia-Ponto focal – RENORBIO da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, PI - Brasil.

⁶Professor Doutor do Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Piauí - IFPI, Teresina - PI, Brasil.

⁷Doutorando do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Piauí -UFPI, Teresina, PI - Brasil.

Autor para correspondência:

Chistiane Mendes Feitosa
Universidade Federal do Piauí, Campus
Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga,
64049-550 - Teresina, PI [Brasil]
Chistiane@ufpi.edu.br

Resumo

Introdução: Avaliou-se a toxicidade aguda de 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1), composto obtido de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro), após administração oral em ratos Wistar. **Métodos:** A toxicidade aguda foi analisada através dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. A análise de citotoxicidade *in vitro* foi feita pelo método do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT). Os tecidos cerebrais e hepáticos foram avaliados histopatologicamente. **Resultados:** O tratamento agudo com TG1(dose de 30 mg kg⁻¹) não produziu alterações hematológicas e histopatológicas nas áreas cerebrais e hepáticas. A redução dos níveis das enzimas transaminase (AST) e fosfatase alcalina (ALKP) pode sugerir proteção hepática. As análises bioquímicas da aspartato aminotransferase, ALKP e do ácido úrico apresentaram seus níveis reduzidos, conferindo preservação dos rins e fígado dos animais (p<0,05). TG1 não revelou potencial citotóxico pelo método MTT. **Conclusão:** O tratamento com TG1 não produz alterações hematológicas, bioquímicas, histopatológicas cerebrais e hepáticas em ratos o que caracteriza uma baixa toxicidade.

Descritores: Bioquímica; Toxicidade aguda; *Platonia insignis*; Fitoterapia.

Editorial


Artigos

Estudos de casos

Revisões de literatura

FIGURA A2: Artigo publicado em 2016 na Revista científica *The Pharma Research*.

The Pharma Research (2016) 14(2) 39-52




Sudarshan
Publication

Available online at S-epub.in/ojs/

THE PHARMA RESEARCH

An International Journal of Pharmacy Research



**ANTICHOLINESTERASE ACTIVITY AND EFFECTS ON MEMORY IN ADULT RATS
OF 1, 3-DISTEAROYL-2-OLEOYLGLYCEROL SUBSTANCE ISOLATED FROM
PLATONIA INSIGNIS MART. (BACURIZEIRO)**

Chistiane Mendes Feitosa^{a,b*}; Soane Kaline Morais Chaves^a; Patricia Régia Pereira dos Santos^a; Antonio do Nascimento Cavalcante^a; Joaquim Soares da Costa Júnior^b; Khaled Rashed^c

^aPost-graduate Programs in Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Ininga, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brazil.

^bDepartment of Chemistry, Federal Institute of Piauí, 64.049-550, Teresina, PI, Brazil.

^c National Research Centre, Pharmacognosy Department, 33 El-Bohouth st.-Dokki, Giza, Egypt- P.O.12622.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Published on: 15-03-2016 ISSN: 0975-8216</p> <hr/> <p>Keywords: <i>Platonia insignis</i>; Bacurizeiro; Cream of bacuri; 1, 3- distearoyl-2-oleoylglycerol; Alzheimer's disease; Antioxidant</p> <hr/> <p>Corresponding author: Dr. Khaled Nabih Zaki Rashed, Pharmacognosy Department, National Research Centre, 33 El-Bohouth st.-Dokki, Giza, Egypt- P.O.12622.</p>	<p><i>Platonia insignis</i> Mart. (bacurizeiro) is traditionally used in Brazil in folk medicine as antiinflammatory. The aim of this study was to investigate the influence of 1, 3-distearoyl-2-oleoylglycerol (TG1) obtained from the seed, on specific memory of the animal and to evaluate <i>in-vitro</i> antioxidant potential (SOD, CAT, TBARS, and determine content of nitrite) and also anticholinesterase activity in the hippocampus of adult rats. Already in the Morris water maze test in the treated group TG1 can be observed a significant decrease of 63.59% and 38.71% in the latency time when compared with the vehicle group and control (neostigmine), respectively. In neurochemical tests can be found in treated groups TG1 a significant reduction of lipid peroxidation 88.49% and 76.89% and the content of nitrite. Furthermore, it can be observed a significant increase in the activity of 51.97% catalase and 45.53% in the activity of superoxide dismutase when compared to vehicle. When determining <i>in vitro</i> inhibition of anticholinesterase activity (IC₅₀ = 4.38 µg/mL) compared to rivastigmine (IC₅₀ = 1.87 µg/mL). The results suggest that TG1 can be a promising molecule for the development of pharmaceuticals.</p>

FIGURA A3: Artigo publicado em 2016 na Revista científica *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*.

Medicinal plants of Brazil and Alzheimer's disease: Evolution in traditional use and pre-clinical studies.

Chistiane M. Feitosa^{*,}, Antônio do Nascimento Cavalcante, Soane Kaline Morais Chaves [‡], Lidiane S. Araújo[‡]

[‡]Department of Chemistry, Federal University of Piauí, 64049-550 Teresina – PI, Brazil

Review Article

Article Info:

Received on:16/06/2016
Published on:27/07/2016



QR Code for mobile



ABSTRACT :


In the literature, there is a growing search for new inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) enzyme in extracts and essential oils of plants. Inhibition of AChE increases the acetylcholine concentration in the synapse, region of communication between neurons in the brain, which would decrease and retard the progression of symptoms in the treatment of Alzheimer's disease (AD). This article brings several screenings with extract and constituents isolated of Brazilian plants, as well as essential oils and their constituents as acetylcholinesterase inhibitors (AChEI), being suggested as promising for elaboration of new herbal medicines. Promising pre-clinical studies were conducted with compounds isolated from some of these Brazilian species namely *Platonia insignis* (bacurizeiro), *Citrus limon* (lemon), *Citrus sinensis* (orange), *Mangifera indica* (mango) and *Kalanchoe brasiliensis* (courma branca), for the prevention or progression of AD.

Keywords: Medicinal plants; Alzheimer's disease; Acetylcholinesterase inhibitors; pre-clinical studies.

FIGURA A4: Artigo publicado em 2017 na Revista científica *Energies*.*energies*

Article

Biodiesel Production from *Bombacopsis glabra* Oil by Methyl Transesterification Method

Francisca Diana da Silva Araújo ¹, Antonio do Nascimento Cavalcante ² ,
Maria das Dores B. Sousa ¹, Carla Verônica Rodarte de Moura ¹, Mariana Helena Chaves ^{1,*},
Sabria Aued-Pimentel ³, Miriam Solange Fernandes Caruso ³, Luimar José Tozetto ⁴
and Soane Kaline Moraes Chaves ⁵

¹ Department of Chemistry, Federal University of Piauí, 64049-550 Teresina, PI, Brazil; drysana@yahoo.com.br (F.D.d.S.A.); dorbarreto@hotmail.com (M.d.D.B.S.); carla@ufpi.edu.br (C.V.R.d.M.)

² Institute of Education, Science and Technology of Maranhão, 65760-000 Presidente Dutra, MA, Brazil; ant_cavalcante@yahoo.com.br

³ Instituto Adolfo Lutz, Division of Food Science and Chemistry, CP 1783, 01059-970 São Paulo, SP, Brazil; sabria_aued@yahoo.com (S.A.-P.); micaruso@ial.sp.gov.br (M.S.F.C.)

⁴ Development Company of the Valleys of the São Francisco and Parnaíba, Codevasf, 70830-901 Brasília, DF, Brazil; luijoto@yahoo.com.br

⁵ Department of Pharmacy, Federal University of Piauí, 64049-550 Teresina, PI, Brazil; soanek@hotmail.com

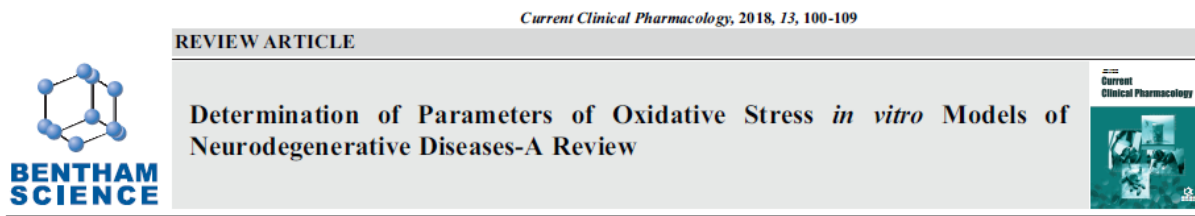
* Correspondence: mariana@ufpi.edu.br; Tel: +55-86-9986-6925

Received: 9 July 2017; Accepted: 25 August 2017; Published: 8 September 2017

Abstract: The objective of this work was to produce methyl biodiesel from *Bombacopsis glabra* (*B. glabra*) oil degummed with H₃PO₄. The methyl biodiesel was prepared in an alkaline medium, and characterized by physico-chemical parameters, thin-layer chromatography (TLC), gas chromatograph (GC), (Nuclear magnetic resonance of hydrogen (H-NMR), thermogravimetry and infrared analysis. The physico-chemical parameters of biodiesel were in accordance with the limits established by National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP) Resolution 45/2014, except oxidation stability, where it was corrected with the addition of antioxidants such as TBHQ and BHT.

Keywords: oil degummed; methyl biodiesel; natural antioxidants.

FIGURA A5: Artigo publicado em 2018 na Revista científica *Current Clinical Pharmacology*.



Chistiane Mendes Feitosa^{a,b,*}, George Laylson da Silva Oliveira^b, Antonio do Nascimento Cavalcante^a, Soane Kaline Morais Chaves^b and Mahendra Rai^c

^aDepartment of Chemistry, University Federal of Piauí, Teresina, Brazil; ^bDepartment of Pharmacy, University Federal of Piauí, Teresina, Brazil; ^cDepartment of Biotechnology, Sant Gadge Baba Amravati University Amravati- 444 602, Maharashtra, India

Abstract: Oxidative stress is a major mechanism underlying the development of various neurodegenerative diseases (Alzheimer, Parkinson, Huntington and amyotrophic lateral sclerosis). Excessive formation of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNSs) can overburden the ability of the enzymatic antioxidant defense mechanisms (superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase) and non-enzymatic (uric acid, ascorbic acid, α -tocopherol and reduced glutathione), causing the development of oxidative stress, and consequently, impairing the neuronal system cells by means of oxidative damage to a variety of important biological molecules such as lipids, DNA and proteins. Considering the importance of oxidative stress in neurodegenerative diseases, the present review aims to address the main parameters evaluated *in vitro* studies on oxidative stress in different models of neurodegenerative diseases. The literary review was conducted through PubMed, Science Direct, LILACS, Scielo and Google using following keywords: oxidative stress, neurodegenerative diseases and parameters of oxidative stress. We selected articles published between 2002 and 2017. The *in vitro* evaluation of the oxidative stress related parameters has provided a preliminary view about the pathogenesis of many neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's and Amyotrophic lateral sclerosis). In this way, it has demonstrated the mechanism of action of ROS/RNSs in these diseases by direct or indirect detection through several experimental procedures *in vitro*.

ARTICLE HISTORY

Received: September 25, 2017
Revised: February 20, 2018
Accepted: February 26, 2018

DOI:
10.2174/1574884713666180301091612

Keywords: Alzheimer's disease, parkinson, huntington, amyotrophic lateral sclerosis, neurodegenerative diseases, oxidative stress.






FIGURA A6: Artigo publicado em 2018 na Revista científica *BioMed Research International*.

Hindawi
BioMed Research International
Volume 2018, Article ID 4785089, 8 pages
<https://doi.org/10.1155/2018/4785089>



Review Article

A Brief Review on the Neuroprotective Mechanisms of Vitexin

Layana Karine F. Lima ¹, Suyanne Kássia S. Pereira ¹, Ronaldo dos Santos S. Junior ²,
Felipe Pereira da S. Santos,² Alyandra de Sousa Nascimento,² Chistiane Mendes Feitosa,²
Juliana de Sousa Figuerêdo,² Antonio do Nascimento Cavalcante ²,
Edigênia Cavalcante da C. Araújo,³ and Mahendra Rai ⁴

¹Post-Graduate Programs in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Ininga, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brazil

²Post-Graduate Programs in Chemistry, Federal University of Piauí, Ininga, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brazil

³Univasf, Collegiate of Pharmaceutical Sciences, Avenue José de Sá Maniçoba, s/no, Center, CEP 56304-205 Petrolina, PE, Brazil

⁴Department of Biotechnology SGB Amravati University, Amravati PIN-444602, Maharashtra, India

Correspondence should be addressed to Layana Karine F. Lima; layana_farias@hotmail.com

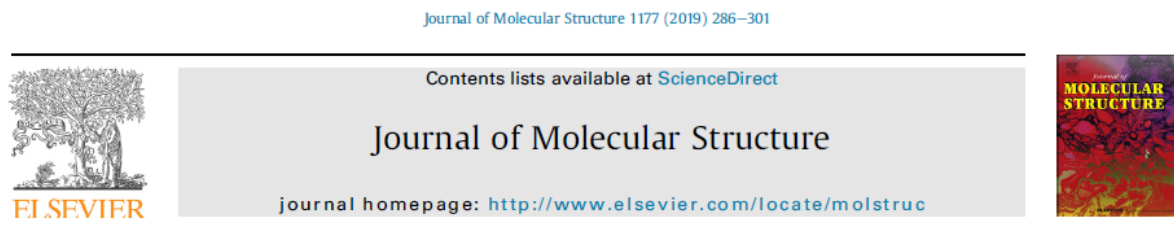
Received 30 June 2018; Revised 17 September 2018; Accepted 16 October 2018; Published 5 December 2018

Academic Editor: Pablo Mir

Copyright © 2018 Layana Karine F. Lima et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The neural dysfunction is triggered by cellular and molecular events that provoke neurotoxicity and neural death. Currently, neurodegenerative diseases are increasingly common, and available treatments are focused on relieving symptoms. Based on the above, in this review we describe the participation of vitexin in the main events involved in the neurotoxicity and cell death process, as well as the use of vitexin as a therapeutic approach to suppress or attenuate neurodegenerative progress. Vitexin contributes to increasing neuroprotective factors and pathways and counteract the targets that induce neurodegeneration, such as redox imbalance, neuroinflammation, abnormal protein aggregation, and reduction of cognitive and/or motor impairment. The results obtained provide substantial evidence to support the scientific exploration of vitexin in these pathologies, since their effects are still little explored for this direction.

FIGURA A7: Artigo publicado em 2019 na Revista científica *Journal of Molecular Structure*.



Elaboration and characterization of the inclusion complex between β -cyclodextrin and the anticholinesterase 2-oleyl-1,3-dipalmitoyl-glycerol extracted from the seeds of *Platonia insignis* MART



Antonio do Nascimento Cavalcante ^{a, b, *}, Chistiane Mendes Feitosa ^b,
Felipe Pereira da Silva Santos ^b, Ana Paula Rodrigues de Sousa ^b,
Ronaldo dos Santos Sousa Júnior ^b, Alexandre Araújo de Souza ^b, Bernardo Ferreira Pinto ^b,
Cristiany Marinho Araújo ^c, Khaled Rashed ^d

^a Institute of Education, Science and Technology of Maranhão, Campus Presidente Dutra, 65760-000, Presidente Dutra, MA, Brazil

^b Department of Chemistry, Federal University of Piauí, 64049-550, Teresina, PI, Brazil

^c Institute of Education, Science and Technology of Piauí, Teresina Campus South Zone, 64018-000, Teresina, PI, Brazil

^d National Research Centre, Pharmacognosy Department, 33 El-Bohouth st.-Dokki, P.O.12622, Giza, Egypt

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2018

Received in revised form

20 September 2018

Accepted 22 September 2018

Available online 24 September 2018

Keywords:

Acetylcholinesterase

Bacurizeiro

Solubility

Inhibition

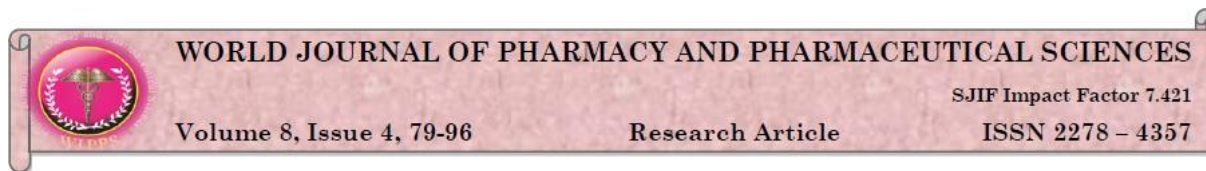
Internal cavity

ABSTRACT

2-oleyl-1,3-dipalmitoylglycerol (ODG) obtained from the bacuri seeds. *In vitro* tests showed inhibition of the enzyme acetylcholinesterase. However, ODG has low solubility in water. In order to increase its solubility, the inclusion complex between ODG and β -cyclodextrin (β -CD) was obtained by solubilization followed by lyophilization. The objective of this study was to prepare, characterize and evaluate the solubility of the complex that was characterized by infrared spectroscopy (IR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), hydrogen magnetic resonance (¹H NMR) and phase solubility. All results confirmed the formation of the inclusion complex between ODG and β -CD. By ¹H NMR data, it was possible to predict that the ODG was encapsulated by the wider side of the β -CD cavity. The solubility isotherm allowed to determine the apparent stability constant ($K = 339.38 \text{ L mol}^{-1}$) and the inclusion efficiency ($IE = 57.82\%$), as well as the 1:1 stoichiometry between ODG and β -CD. The rate of dissolution and solubility of the inclusion complex were significantly improved as compared to the pure drug. Therefore, the use of ODG- β -CD can effectively improve the solubility and dissolution rate of free ODG, being a promising approach to promote its clinical application.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

FIGURA A8: Artigo publicado em 2019 na Revista científica *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.



**DESIGN OF A PHARMACEUTICAL FORMULATION:
DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF
GUATTERIOPSISCINE INCLUSION COMPLEX WITH β -
CYCLODEXTRIN**

Valéria Lima Silva Veras^{1*}, Mônica Regina Silva de Araújo², Felipe Pereira da Silva Santos², Antonio do Nascimento Cavalcante³, Emmanoel Vilaça Costa⁴ and Chistiane Mendes Feitosa²

¹Department of Pharmacy, Federal University of Piauí.

²Department of Chemistry, Federal University of Piauí.

³Institute of Education, Science and Technology of Maranhão.

⁴Department of Chemistry, Federal University of Amazonas.

FIGURA A9: Capítulo 6 publicado em 2015 do livro da Editora Átomo *Plantas Mediciniais e a Doença de Alzheimer*.

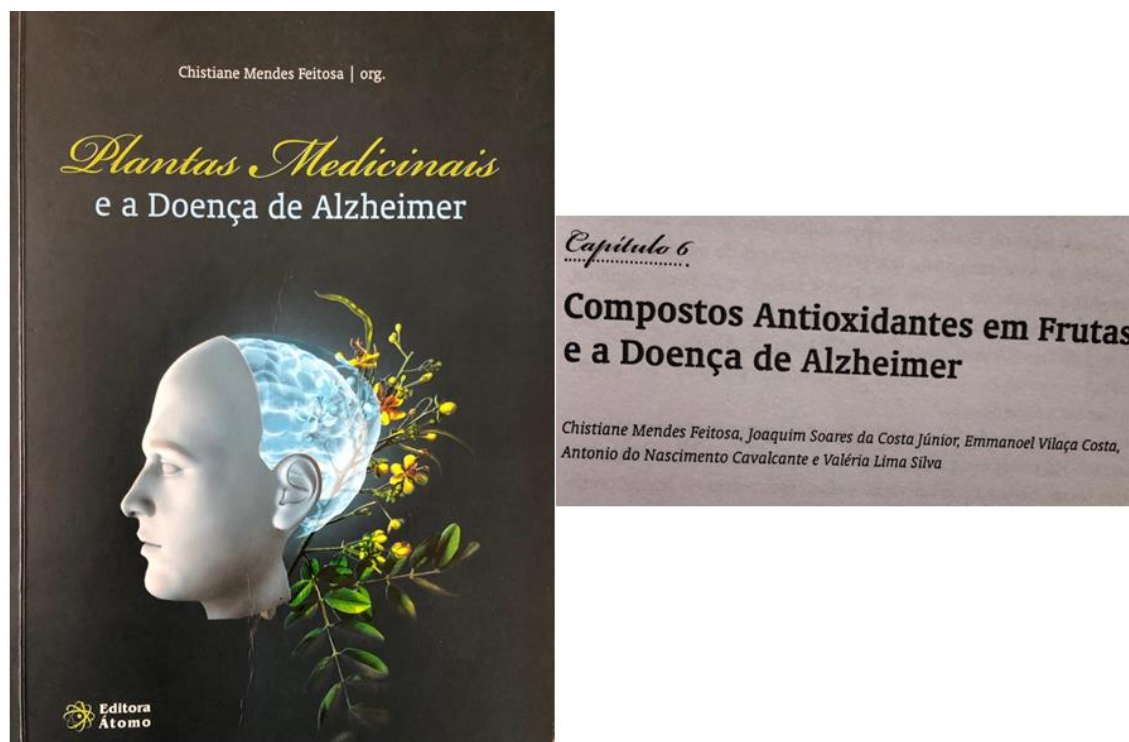


FIGURA A10: Capítulo 9 publicado em 2017 no livro da Editora Átomo *ANTIOXIDANTES aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos*.

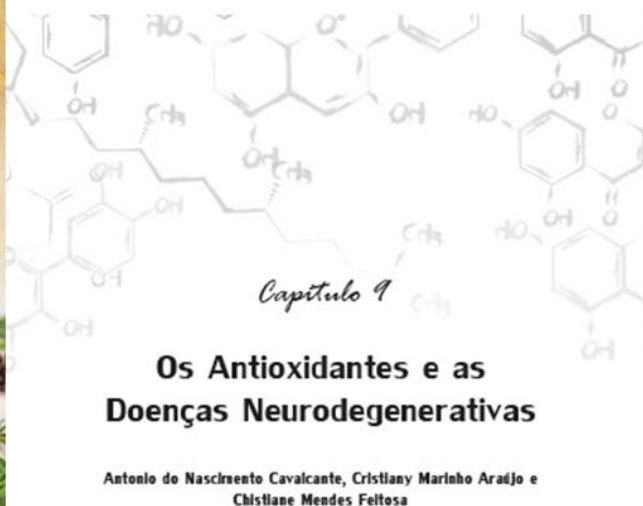
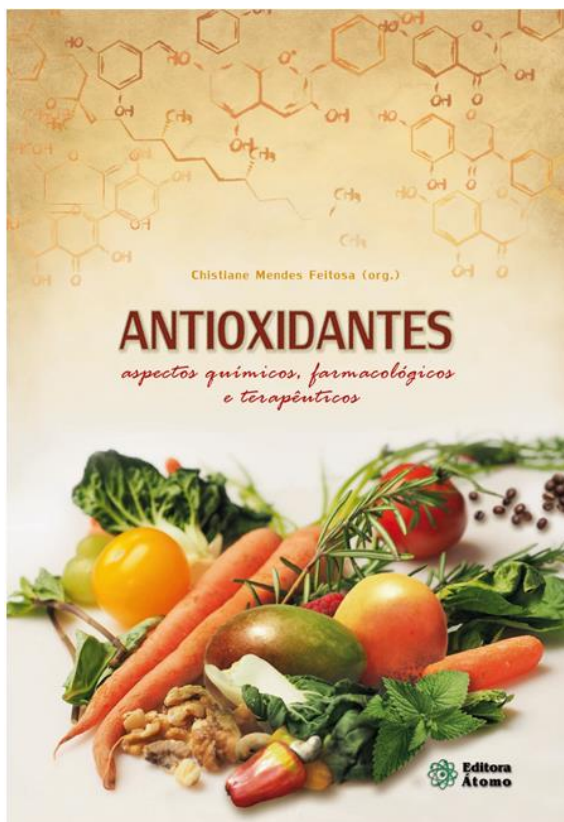
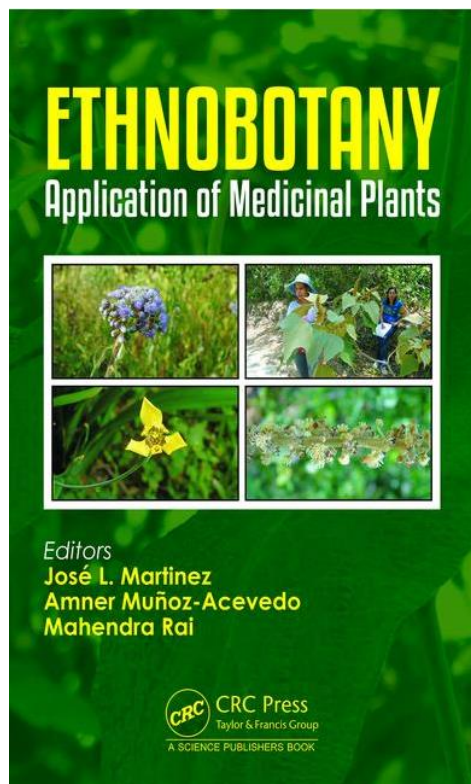


FIGURA A11: Capítulo 16 publicado em 2018 no livro da Editora CRC Press Taylor & Francis Group *ETHNOBOTANY Application of Medicinal Plants*.



Pharmacological Properties of Extracts and Compounds Isolated from Platonía insignis Mart. 273

16

Pharmacological Properties of Extracts and Compounds Isolated from *Platonía insignis* Mart.—A Perspective for Developing Phytomedicines

Antonio do Nascimento Cavalcante,^{1,2} Chistiane Mendes Feitosa,^{1,3,*}
Layana Karine Farias Lima,³ Ronaldo dos Santos Sousa Júnior¹ and
Ana Gabriela Sousa Alencar¹