



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIA DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CASSIO HERBERT SANTOS DE MELO

**Análises fitoquímica e farmacológica das espécies *Eugenia dysenterica* DC. (Cagaiteira) e *Annona crassiflora* Mart. (Araticunzeiro) direcionadas para doenças neurodegenerativas.**

TERESINA

2017

CASSIO HERBERT SANTOS DE MELO

**Análises fitoquímica e farmacológica das espécies *Eugenia dysenterica* DC. (Cagaiteira) e *Annona crassiflora* Mart. (Araticunzeiro) direcionadas para doenças neurodegenerativas.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-graduação em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa

TERESINA

2017

Dissertação de autoria de Cassio Herbert Santos de Melo, sob o título "**Análises fitoquímica e farmacológica das espécies *Eugenia dysenterica* DC.(cagaiteira) e *Annona crassiflora* Mart.(Araticunzeiro) direcionadas para doenças neurodegenerativas**", apresentada à Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-graduação Química, na área de Química Orgânica, aprovado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ pela comissão julgadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Presidente

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

TERESINA, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

***DEDICATÓRIA***

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo e sinceridade.

A minha linda esposa, minha base e meu impulso para continuar adiante.

Aos meus amigos que estiveram sempre a meu lado em todos os momentos.

Á minha exclusiva orientadora, que desde sempre depositou sua confiança, me incentivou e aconselhou.

## AGRADECIMENTOS

*Estes “2 anos” de pesquisa foram uma árdua jornada de desafio, construção e amadurecimento. Nenhum empreendimento é realizado de forma fácil e sem esforço.*

*De acordo com Daisaku Ikeda:*

*“Ser herói não significa acertar constantemente. É muito mais que isso. O verdadeiro espírito de um herói encontrasse na intensa convicção de enfrentar e vencer as dificuldades em vez de desistir de tudo.”*

*Neste período, aprendi que qualquer outro trabalho é a extensão da vida do autor. Então, para que algo de valor seja produzido, a pessoa deve primeiro criar algo de valor em si. Pessoa e obra são consistentes com o resultado. Por este motivo, agradeço sincera e profundamente a todas as pessoas que muito me encorajaram e me ajudaram a produzir algo de valor em minha vida.*

*Primeiramente, aos meus pais **Jusselina Maria dos Santos e Herbert Pereira de Melo Silva** e aos meus irmãos **Caio Hugbert e Cairo Hilbert**, por conviverem ao meu lado, por ajudarem sempre, mesmo que às vezes de maneira silenciosa e pelo conforto que propiciaram a mim para que pudesse concluir este trabalho*

*Agradeço a minha amada esposa **Katrícia Maria Feitosa Cardoso**, minha mulher e grande amiga, sempre presente na minha vida, pela cumplicidade, companheirismo, apoio e por seu carinho inabalável, marca importante de caráter e determinação e que divide comigo todos os momentos da minha vida, sejam eles alegres ou tristes.*

*Agradeço a minha orientadora Professora **Chistiane Mendes Feitosa** que é uma imensa honra e orgulho tê-la como orientadora por mais de sete anos (desde de a Iniciação Científica) e não esqueço do Professor **Rivelilson Mendes de Freitas** “in memoriam” seus eternos ensinamentos, seus preciosos conselhos e sua inestimável forma de organização de pessoas. Muito obrigado!*

*Agradeço também " aos colegas de laboratório do **LAPNEX e do LPNNEX**, **Felipe, Adenilson, Alyandra, Lidiane, Soane, Oskar, Amanda, Rusbene** por estarem sempre presentes nesta jornada, sem esquecer meus Amigos do **LAGO***

*Manifesto aqui a minha gratidão a todos professores, funcionários, em especial aos Senhores **Francisco e Ari**, e amigos do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF/UFPI) e, ao imprescindível apoio ao **CNPq, FAPEPI e CAPES**, pelo apoio financeiro, onde as pesquisas foram financiadas através de recursos conseguidos por aprovação de projeto.*

*Meus respeitosos agradecimentos pela contribuição da banca do exame de qualificação e pela participação dos membros da banca examinadora da defesa.*

*Meu muito obrigado a quem me encoraja em todos os aspectos da vida. Por fim, agradeço em especial àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim mais do que ninguém e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria.*

*Mais uma etapa foi vencida, na verdade outro começo ...*

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.  
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”*

Antoine de Saint Exupéry

# SUMÁRIO

viii

	LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xi
	LISTA DE TABELAS.....	xiii
	LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	xiv
	RESUMO .....	15
	ABSTRACT .....	16
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
2.1	<i>Objetivos Gerais</i> .....	19
2.2	<i>Objetivos Específicos</i> .....	19
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20
 <b>CAPÍTULO I- Plantas Medicinais e a Doença de Alzheimer</b>		
	<b>RESUMO</b> .....	23
	<b>ABSTRACT</b> .....	24
<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES SOBRE A DOENÇA DE ALZHEIMER</b> .....	25
1.1	<i>O que é a doença de Alzheimer</i> .....	25
1.2	<i>Diagnóstico e sintomas da doença de Alzheimer</i> .....	26
1.3	<i>Inibidores das enzimas acetilcolinesterase e butilcolinesterase</i> .....	31
1.4	<i>Mecanismo de inibição da enzima acetilcolinesterase</i> .....	32
1.5	<i>Inibidores reversíveis e irreversíveis da acetilcolinesterase</i> .....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37
 <b>CAPÍTULO II - Atividades anticolinesterásica e antioxidante do óleo essencial de Eugenia dysenterica</b>		
	<b>RESUMO</b> .....	40
	<b>ABSTRACT</b> .....	41
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	42
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	45
2.1	<i>Família Myrtaceae, gênero Eugenia, família Eugenia dysenterica</i> .....	45
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
3.1	<i>Material botânico</i> .....	48
3.2	<i>Composto puro, solventes e enzimas</i> .....	48
3.3	<i>Extração do óleo essencial</i> .....	48
3.4	<i>Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massas</i> .....	48
3.5	<i>Identificação dos constituintes</i> .....	49
3.6	<i>Ensaio da inibição da atividade da acetilcolinesterase</i> .....	49
3.7	<i>Ensaio antioxidantes</i> .....	51
3.7.1	<i>Ensaio antioxidantes de espécies reativas com o ácido Tiobarbitúrico</i> .....	51
3.7.2	<i>Atividade sequestrante contra o radical hidroxila</i> .....	52
3.7.3	<i>Avaliação do potencial antioxidante do OEC na remoção de óxido nítrico</i> .....	52
3.8	<i>Análise estatística</i> .....	52
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
3.1	<i>Estudo químico</i> .....	53
3.2	<i>Inibição da atividade da acetilcolinesterase</i> .....	55
3.3	<i>Ensaio antioxidantes</i> .....	57
3.3.1	<i>Ensaio antioxidantes de espécies reativas com o ácido Tiobarbitúrico</i> .....	57
4.3.2	<i>Atividade sequestrante contra o radical hidroxila</i> .....	58
4.3.3	<i>Avaliação do potencial antioxidante na remoção de óxido nítrico</i> .....	59
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61
 <b>CAPÍTULO III - Revisão da literatura: Annona crassiflora Mart. (Araticum)</b>		
	<b>RESUMO</b> .....	62
	<b>ABSTRACT</b> .....	63
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	64
<b>2</b>	<b>MATERIAL MÉTODOS</b> .....	67



<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	67
3.1	<i>Atividade antioxidante</i> .....	68
3.2	<i>Atividade Moluscicida</i> .....	69
3.3	<i>Atividades Larvicida e Ninficida</i> .....	69
3.4	<i>Atividade Inseticida</i> .....	70
3.6	<i>Atividade antiprotozoária</i> .....	72
3.7	<i>Atividade Antibacteriana</i> .....	73
3.8	<i>Atividade contra plantas daninhas</i> .....	73
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	73
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74

**CAPÍTULO IV** - Estudo fitoquímico e atividade anticolinesterásica de *Annona crassiflora* Mart. na busca

	<b>RESUMO</b> .....	80
	<b>ABSTRACT</b> .....	81
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	82
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	87
2.1	<i>Suportes para dados cromatográficos, espectroscópicos e atividade enzimática</i> .....	92
2.2	<i>Coleta e identificação botânica</i> .....	94
2.3	<i>Folhas</i> .....	94
2.3.1	Extratos.....	94
2.3.2	Screening fitoquímico das folhas da <i>A. crassiflora</i> na prospecção fitoquímica para identificação de para identificação de metabólitos secundários.....	95
2.3.3	Avaliação da toxicidade sobre a artemia salina nos extratos das folhas de <i>Annona crassiflora</i> .....	96
2.3.4	Extração das bases alcalóides (extratos de hexano e metanol) .....	96
2.3.5	Isolamento e purificação dos extratos das folhas da <i>A. crassiflora</i> .....	97
2.4	<i>Fruto</i> .....	98
2.4.1	Extratos.....	99
2.4.2	Screening fitoquímico dos frutos de <i>A. crassiflora</i> na prospecção fitoquímica para identificação de de metabólitos secundários.....	99
2.4.3	Estudo da citotoxicidade do extrato do fruto da <i>A. crassiflora</i> .....	100
2.4.4	Isolamento e purificação de substâncias do fruto de <i>A. crassiflora</i> .....	100
2.4.5	Isolamento e purificação de compostos dos extratos das folhas da <i>A. crassiflora</i> .....	101
2.5	<i>Isolamento e purificação de substâncias do fruto de A. crassiflora (A. crassiflora)</i> .....	101
2.6	<i>Ensaio para detecção de inibição quantitativa da enzima AChE</i> .....	101
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	102
3.1	<i>Folhas</i> .....	102
3.1.1	Extratos.....	102
3.1.2	Screening fitoquímico das folhas.....	103
3.1.3	Avaliação da toxicidade sobre a Artemia salina nos extratos das folhas da <i>A. crassiflora</i> .....	104
3.1.4	Tentativa de extração de alcalóides.....	105
3.1.4.1	Estudo do Extrato Hexânico (EHA).....	105
3.1.4.1.1	Estudo de F – 7/8.....	106
3.2	<i>Fruto</i> .....	107
3.2.1	Extratos.....	107
3.2.2	Screening fitoquímico do fruto de <i>A. crassiflora</i> .....	107
3.2.3	Estudo da citotoxicidade do extrato do fruto da <i>A. crassiflora</i> .....	107
3.2.4.1	<i>Extrato Acetato de etila - Metanol ( FMA-50%)</i> .....	108
3.2.4.1.1	EAFt – Fração Acetato de Etila / Metanol 50% .....	109
3.2.4.2	<i>Extrato Etanólico dos Frutos</i> .....	109
3.2.4.2.1	EAAFt – Fração Etanólica 40-50%.....	109
3.2.4.2.1	<i>Estudo da Fração 9</i> .....	110
3.2.4.3	<i>Extrato Metanólico dos Frutos (EMFt)</i> .....	111
3.2.4.3.1	<i>EMFt – Fração Extrato Metanólica PA</i> .....	111
3.2.4.3.1	Estudo da fração 9.....	112
3.3	Identificação e determinação estrutural dos compostos isolados de <i>A. crassiflora</i> .....	113
3.3.1	Determinação estrutural de <b>FAH-1</b> .....	114

3.3.2	<b>3.3.2 Determinação estrutural de FAH-2</b> .....	118
3.3.3	3.3.3 Determinação estrutural de A05.....	122
3.4	<i>Ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE</i> .....	130
3.5	Ensaio para detecção de inibição quantitativa da enzima AChE dos extratos das folhas.....	131
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	133
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	135
	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	144
	<b>ANEXOS</b> .....	145
	ANEXO I – Composição do óleo essencial a partir das folhas de <i>E. dysenterica</i> .....	146
	ANEXO II - GC/EM do óleo essencial de <i>E. dysenterica</i> .....	147
	ANEXO III – Lista de espectros substâncias isoladas <i>Annona crassiflora</i> para elucidação .....	148
	Espectro de RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135 de A08-07.....	149
	Espectro de RMN DEPT 135 de A08-07.....	150
	Mapa de contorno gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de A08-07.....	150
	Espectro de RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>13</sup> C .....	151
	Espectro de DEPT 135 de A02 .....	152
	Mapa de contorno gHSQC de A02.....	152
	Mapa de contorno gHMBC e gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de A02.....	153
	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	154

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> - Diferença entre células normais e com Alzheimer.....	26
<b>Figura 2</b> - Cérebro com destaque com áreas referentes a memória, linguagem, inteligência e comportamento.....	26
<b>Figura 3</b> - Áreas cerebrais com destaque com a área principal da memória (hipocampo).....	27
<b>Figura 4</b> - Demonstração em corte de um cérebro saudável e com Alzheimer.....	28
<b>Figura 5</b> - demonstração da hipótese colinérgica (MINETT & BEROLUCCI, 2000) .....	29
<b>Figura 6</b> - Demonstração de inibição da AChE.....	30
<b>Figura 7</b> - Fotografia da espécie <i>Galanthus woronowi</i> (Woronow's snowdrop) .....	31
<b>Figura 8</b> – Estrutura química da enzima carbamilada.....	34
<b>Figura 9</b> - Fotografia da espécie <i>Physostigma venenosum</i> , com detalhes das folhas, flores, frutos e sementes.....	35
<b>Quadro 1</b> - Reação de hidrólise da acetilcolina catalisada pela AChE (FOYE et al., 1995) .....	33
<b>Quadro 2</b> - Estrutura de alguns inibidores reversíveis da AChE.....	35
<b>Quadro 3</b> - Estrutura de alguns inibidores irreversíveis da AChE.....	36

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1</b> - Árvore de cagaíta em florescimento (a). Detalhe da inflorescência (b). Cagaiteira com folhas novas (c). Detalhe do tronco (d). Fruto maduro e folha (e). Fruto verde e semente (f).....	44
<b>Figura 2</b> - GC/EM do óleo essencial de <i>E. dysenterica</i> .....	54
<b>Figura 3</b> - Constituintes químicos da identificação CG/EM do óleo essencial de <i>Eugenia dysenterica</i> .....	55
<b>Figura 4</b> - Placa de inibição qualitativa da <i>Eugenia dysenterica</i> frente à AChE.....	56
<b>Figura 5</b> - Efeitos óleo nos níveis de TBARS.....	58
<b>Figura 6</b> - Efeitos do óleo na remoção de radical hidroxila.....	59
<b>Figura 7</b> - Efeitos do óleo na remoção do metabólito nitrito.....	60
<b>Equação 1</b> - Atividade anticolinesterase (%).....	51

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1</b> - <i>A. crassiflora</i> : (a) árvore, (b) galho com fruto, (c) fruto, (d) flores, (e) fruto aberto.....	71
<b>Figura 2</b> - Alcaloides das folhas de <i>Annona crassiflora</i> .....	72

### CAPÍTULO IV

<b>Figura 1</b> - Árvore (A), folhas e fruto (B), fruto e polpa (C) e flor (D) de <i>Annona crassiflora</i> .....	89
<b>Figura 2</b> - Alcaloides das folhas de <i>Annona crassiflora</i> .....	90
<b>Figura 3</b> - Fruto maduro, Mesocarpo (polpa) e sementes <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	98
<b>Figura 4</b> - Teste reativo de Dragendorff.....	104
<b>Figura 5</b> - Substâncias isoladas das folhas de <i>Annona crassiflora</i> : SFAH-1( $\beta$ -Sitosterol) e EFAH-1(Estigmasterol).....	116
<b>Figura 6</b> -Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>FAH-1</b> .....	116
<b>Figura 7</b> -Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 $^\circ$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>FAH-1</b> .....	117
<b>Figura 8</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>FAH-1</b> .....	117
<b>Figura 9</b> - Estrutura química do $\beta$ -sitosterol (FAH-2).....	118
<b>Figura 10</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de FAH- .....	120
<b>Figura 11</b> - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de FAH- .....	120
<b>Figura 12</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de FAH- .....	121
<b>Figura 13</b> - Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de FAH-2.....	121
<b>Figura 14</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 $^\circ$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de FAH- .....	122
<b>Figura 15</b> - Estrutura da Miricetina-3',5'-dimetoxi-4'-isopropoxi-3-O-raminosídeo (A05) .....	125
<b>Figura 16</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de <b>A05</b> .....	126
<b>Figura 17</b> - Expansão Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de <b>A05</b> .....	126
<b>Figura 18</b> - Expansão Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de <b>A05</b> .....	127
<b>Figura 19</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de <b>A05</b> .....	127
<b>Figura 20</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 $^\circ$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de <b>A05</b> .....	128
<b>Figura 21</b> - Espectro de RMN 2D-HMBC (500 x 125 MHz) de .....	128
<b>Figura 22</b> - Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ - HMBC (500 x 125 MHz) de <b>A05</b> .....	129
<b>Figura 23</b> - Ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE.....	129
<b>Figura 24</b> - Ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima.....	130
<b>Equação 1</b> – Porcetagem de mortalidade de crustáceos. ....	96

<b>Equação 2</b> – Percentual da atividade anticolinesterásica. ....	102
<b>Esquema 1</b> - Fluxograma de obtenção dos extratos.....	95
<b>Esquema 2</b> - Metodologia para extração dos alcalóides presentes nos extratos metanólicos bioativos.....	97
<b>Esquema 3</b> – Fluxograma de obtenção dos extratos dos frutos.....	98
<b>Esquema 4</b> – Dados obtidos do fracionamento cromatográfico de FHA-1 e FHA-2.....	106
<b>Gráfico 1</b> - Taxa de mortalidade (%) <i>versus</i> concentração do extrato ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) na avaliação da toxicidade.....	104
<b>Gráfico 2</b> - Inibição quantitativa para o EM das folhas de <i>A. crassiflora</i> sobre a enzima AChE.....	131

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1</b> - Composição do óleo essencial a partir das folhas de <i>E. dysenterica</i> .....	50
---	----

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1</b> - Propriedades farmacológicas estudadas em <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	67
--	----

### CAPÍTULO IV

<b>Tabela 1</b> - Tratamento cromatográfico do extrato liofilizado da polpa de <i>A. crassiflora</i> .....	92
<b>Tabela 2</b> - Rendimento dos extratos das folhas.....	96
<b>Tabela 3</b> - Screening fitoquímico dos extratos de hexano e metanol das folhas da <i>A. crassiflora</i> .....	96
<b>Tabela 4</b> - Rendimento para extração de alcalóides dos extratos das folhas <i>A. crassiflora</i> .....	98
<b>Tabela 5</b> - Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato hexânico de <i>A. crassiflora</i> (CCHA).....	98
<b>Tabela 6</b> - Screening fitoquímico da polpa de <i>A. crassiflora</i> .....	100
<b>Tabela 7</b> - Percentual de inibição em concentração única do crescimento celular das amostras em três linhagens tumorais e seu intervalo de confiança.....	101
<b>Tabela 8</b> - Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas dos extratos do fruto de <i>A. crassiflora</i> (EAFt).....	101
<b>Tabela 9</b> - Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato metanólico do fruto de <i>Annona crassiflora</i> (EAFt / FMA 50%).....	102
<b>Tabela 10</b> - Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato hidroalcolico do fruto de <i>Annona crassiflora</i> (EEAFt / FDAA 40-50%).....	103
<b>Tabela 11</b> - Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato hidroalcolico do fruto de <i>Annona crassiflora</i> (EEAFt / FDAA 40-50% / F-9) .....	103
<b>Tabela 12</b> - Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato metanólico do fruto de <i>A. crassiflora</i> (EAFt / FMA) .....	105
<b>Tabela 13</b> - Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato metanólico do fruto de <i>Annona crassiflora</i> (EAFt / FMA / F 9), purificação.....	106
<b>Tabela 14</b> - Dados de deslocamento químico ( $\delta$ ) de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de FAH-1 comparados com os dados da literatura.....	115
<b>Tabela 15</b> - Dados do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da Substância <b>FAH-2</b> e valores da literatura (GRECA, <i>et al.</i> , 1990) .....	119
<b>Tabela 16</b> - Dados de deslocamento químico ( $\delta$ ) de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de A05, comparados com os dados da literatura.....	124
<b>Tabela 17</b> - Teste para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE das substâncias do fruto.....	130
<b>Tabela 18</b> - Teste para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE das substâncias do fruto.....	131
<b>Tabela 19</b> - Ensaio para detecção de inibição quantitativa da enzima AChE.....	131

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCI	Iodeto de acetiltiocolina
ANOVA	Análise de Variância
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DA	Doença de Alzheimer
EAFt	Extratos do fruto de <i>A. crassiflora</i>
EEAFt	Extrato Etanólico dos Frutos
EHA	Estudo do Extrato Hexânico
<i>EMFt</i>	<i>Extrato Metanólico dos Frutos</i>
FDAA – 40%	Extrato Diclorometano-Acetato de etila (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcetOH)
FDAA – 50%	Extrato Diclorometano-Acetato de etila (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcetOH)
FMA	(MeOH) Extrato Metanólico
<i>FMA-50%</i>	<i>Extrato Acetato de etila - Metanol</i>
FMA-50%	Extrato Acetato de Etila / Metanol 50% (AcetO/MeOH)
IK	Índice de Kovats
mg	Miligrama
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
°C	Graus Celsius
OE	Óleo essencial
OEC	Óleo Essencial da Cagaita
Ppt	Precipitado
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UV	Espectrometria de Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Micro litro
µm	Micrômetro
δ	Deslocamento químico
µg	Micrograma
µL	Microlitro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
AcOEt	Acetato de etila
CC	Coluna cromatográfica
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CI	Concentração inibitória
COSY	“Correlation Spectroscopy”
HCl	Ácido clorídrico
HSQC	“Heteronuclear Sigle Quantum Coherence”
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
Rfs	Fator de retenção
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio

**OBS.:** as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

MELO, Cassio Herbert Santos de, BARBOSA, Alisson dos Reis, SANTOS, Felipe Pereira Sousa, FEITOSA, Chistiane Mendes, **Análises fitoquímica e farmacológica das espécies *Eugenia dysenterica* DC. (Cagaiteira) e *Annona crassiflora* Mart. (Araticunzeiro) direcionadas para doenças neurodegenerativas.** 2017. 160 f. Defesa (Mestrado em Química) – Centro de Ciência da Natureza, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, 2017.

## RESUMO

A biodiversidade brasileira, em especial no Bioma Cerrado é uma fonte promissora de substâncias químicas bioativas para o desenvolvimento de novos fármacos direcionados para as doenças neurodegenerativas com aspectos fitoquímicos, farmacológicos e terapêuticos desconhecidos. Neste contexto, selecionou-se as espécies *Eugenia dysenterica* DC. e a *Annona crassiflora* Mart. para isolamento e identificação de inibidores da acetilcolinesterase (AChE), enzima relacionada a doença de Alzheimer (DA). Os estudos com a espécie *E. dysenterica* consistiu em análises da atividade antioxidante e detecção de inibidores da AChE a partir da obtenção dos seus óleos essenciais (OE). O óleo essencial da cagaiteira (OEC) foi obtido utilizando-se o sistema de hidrodestilação, tipo Clevenger e posterior identificação e caracterização do OEC por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Realizou-se ensaios antioxidantes com o OEC, baseados na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e produção de óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ). Para a espécie *A. crassiflora* elaborou-se extratos hexânico (EH) e metanólico (EM) da folhas, sendo estes submetidos à extração ácido-base objetivando-se a extração de alcaloide e elaboração do extrato da polpa dos Frutos (EAFt). Utilizou-se técnicas de cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada (CCD), RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , na tentativa de isolamento e elucidação estrutural de substâncias isoladas de *A. crassiflora*. A avaliação do potencial anticolinesterásico foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Ellman (1961) e adaptado por Rhee (2001) que detecta inibidores da AChE para ambos os materiais vegetais. Observou-se a partir do ensaio de Ellman que OEC foi capaz de inibir a AChE com um valor de  $\text{CI}_{50} = 0,916 \text{ ug.mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ) sendo um valor promissor comparando-se com o medicamento neostigmina ( $\text{CI}_{50} = 1,87 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), um medicamento amplamente utilizado na terapia da DA. Nas concentrações testadas foi observado que OEC preveniu a peroxidação lipídica, inibindo a quantidade de TBARS formado, de maneira semelhante ao ácido ascórbico. Além disso, houve uma redução na produção de  $\cdot\text{OH}$ , assim como a produção de  $\text{NO}\cdot$ . A extração de alcaloides, por maceração, das folhas e a elaboração de EAFt de *A. crassiflora* apresentou os seguintes rendimentos: EH= 1,74%, EM= 32,47% e EAFt= 0,54%. Observou-se a presença de alcaloides nos extratos quando utilizado o reagente de Dragendorff. Os extratos das folhas e frutos apresentaram resultados positivos para os testes de inibição qualitativos e quantitativos da AChE. Das folhas e frutos de *A. crassiflora* foram isolados três compostos puros e misturas, que após caracterização por espectroscopia de RMN foram identificados como: A05, FAH-1, FAH-2, um flavonol (Miricetina-3',5'-dimetoxi-4'-isopropoxi-3-O-raminosídeo), uma mistura de sesquiterpenos ( $\beta$ -Sitosterol, estigmasterol e 24-metilenocicloartanol) e o  $\beta$ -Sitosterol puro, respectivamente. Nenhum dos compostos isolados da *A. crassiflora* apresentaram inibição significativa da enzima AChE. A análise do OEC por CG/EM permitiu identificar seis constituintes, sendo o óxido de cariofileno o majoritário com (66,37%). Conclui-se que as espécies *E. dysenterica* e *A. crassiflora* apresentaram promissores resultados *in vitro* o que é motivador para ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: *Annona crassiflora*, *Eugenia dysenterica*, Anticolinesterásico, Antioxidante.

MELO, Cassio Herbert Santos de, BARBOSA, Alisson dos Reis, SANTOS, Felipe Pereira Sousa, FEITOSA, Chistiane Mendes. **Phytochemical and pharmacological study of the species *Eugenia dysenterica* DC. and *Annona crassiflora* Mart. directed to neurodegenerative diseases.** 2017. 160 f. Defense (Master in Chemistry) - Nature Science Center, Federal University of Piauí, Teresina, PI, 2016.

### ABSTRACT

The Brazilian biodiversity, in particular Cerrado is a promising source of bioactive chemical substances for the development of new drugs targeted for neurodegenerative diseases with phytochemicals, pharmacological and therapeutic unknown aspects. In this context, the species *Eugenia dysenterica* DC. (Cagaiteira) and *Annona crassiflora* Mart.(Araticum) were selected for identification and isolation of inhibitors for the acetylcholinesterase (AChE), enzyme related with the Alzheimer disease (AD). Studies with *E. dysenterica* specie consisted of analyzes of the antioxidant activity and detection of AChE inhibitors from their essential oils (OE). The OEC was obtained by using a hydrodistillation Clevenger system type and subsequent identification and characterization by gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GC-MS). Antioxidant assay was performed with OEC based on the formation of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS), hydroxyl radical ( $\bullet$ OH) and nitric oxide production (NO). For the *A. crassiflora* specie was prepared hexane (HE) and methanol (ME) extracts from its leaves, being subjected to acid-base extraction aiming to the alkaloid extraction and the elaboration of the fruit pulp extract (EAFt). Column chromatography (CC), thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC),  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR was used in an attempt to isolate and structural elucidation of the isolated substances from *A. crassiflora*. The evaluation of anticholinesterase potential was realized following the methodology described by Ellman (1961) adapted by Rhee (2001) which detect AChE inhibitors for both plant materials. It was observed from the Ellman test that OEC was able to inhibit the AChE with a value of  $\text{CI}_{50} = 0.916 \text{ ug.mL}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ) being a promising value comparing with the drug neostigmine ( $\text{CI}_{50} = 1.87 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), an enlargement drug used in AD therapy. At the concentrations tested the OEC prevented the lipid peroxidation, inhibiting the amount of TBARS formed, similarly to ascorbic acid. In addition, there was a reduction in the production of  $\bullet$ OH, just like the production of NO. The extraction of alkaloids by maceration of leaves of *A. crassiflora* presented the following income: HE= 1.74%, ME=32.47% and EAFt= 0.54%. It was observed the presence of alkaloids in the extracts when used the Dragendorff reagent. The extract of the leaves and fruits presented positive results for the qualitative and quantitative inhibition tests of AChE inhibition. From the leaves and fruits of *A. crassiflora*, three pure compounds and mixtures were isolated, which after characterization by NMR spectroscopy were identified as: A05, FAH-1, FAH-2, (Miricetin-3', 5'-dimethoxy- 4'-isopropoxy-3-O-raminoside) flavonol, a mixture of sesquiterpenes ( $\beta$ -Sitosterol, stigmasterol and 24-methylenecycloartanol) and pure  $\beta$ -Sitosterol, respectively. None of the compounds this *A. crassiflora* showed inhibition of the enzyme AChE. The analysis of the OEC by GC / MS allowed to identify six constituents, with caryophyllene oxide being the majority with (66.37%). It is concluded that the species *E. dysenterica* and *A. crassiflora* presented promising results *in vitro* which is motivating for *in vivo* assays

Keywords: *Annona crassiflora*, *Eugenia dysenterica*, Antioxidant, Anticolineterásica.



## 1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento da promissora contribuição que o reino vegetal pode levar ao desenvolvimento de novos fármacos foi descrito por instituições importantes, como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e através de relatos da literatura por vários pesquisadores (ELIZABETSKI, 1987; CALIXTO, 2000; HOSTETTMANN, 1995). No Brasil, observa-se um crescente interesse nos estudos de plantas medicinais, em alguns Estados brasileiros, projetos governamentais têm introduzido o uso de fitoterapia no sistema público de saúde devido, principalmente, à necessidade de oferecer assistência social farmacêutica às comunidades carentes ou distantes dos centros urbanos e suprir as deficiências dos sistemas de saúde oficiais (BRITO & BRITO, 1993; SANTOS *et al.*, 2011).

Entretanto, as pesquisas ainda são poucas e existem lacunas referentes ao conhecimento científico de compostos bioativos produzidos por espécies de determinados biomas, uma realidade brasileira que embora se tenha a maior diversidade vegetal do mundo e muitas plantas medicinais sejam de amplo conhecimento popular, o número de informações sobre essas plantas tem crescido apenas 8% anualmente (Guarin-Neto & Moraes, 2003; Silva *et al.*, 2010; Corrêa & Salgado, 2011). O interesse acadêmico a respeito do conhecimento dessas populações acerca das plantas e seus usos têm crescido após a constatação de que a base empírica desenvolvida por elas pode, em muitos casos, ter uma comprovação científica. Este fato habilitaria a extensão de seus usos à sociedade industrializada, bem como à própria população uma vez comprovada a ação farmacológica das plantas (MACIEL *et al.*, 2002).

O crescente interesse de países desenvolvidos em fitoterápicos é uma conjuntura propícia para o estímulo à pesquisa de plantas medicinais. O Cerrado, dentro da biodiversidade brasileira, é fonte de muitas espécies vegetais que desempenham importante papel na medicina popular (RODRIGUES & CARVALHO, 2001), ocupa cerca de dois milhões de quilômetros quadrados no interior do país, o que representa 25% do território nacional e abrange 13 Estados e Distrito Federal, sendo dentre os biomas sul-americanos, o mais característico e próprio do Brasil (NETO & MORAIS, 2003). Nele, encontra-se a segunda maior biodiversidade da América do Sul, superada apenas pela Amazônia. Há cerca de 6.500 espécies de plantas, das quais mais de 200 pertencentes a pelo menos 504 famílias que têm identificado algum uso econômico: forrageiro, madeireiro, alimentar, ornamental, medicinal e veterinária. Porém, a forma da utilização das plantas pela população não é conhecida completamente e nem mesmo validado, sendo que os aspectos fitoquímicos, farmacológicos e terapêuticos são desconhecidos (MARQUES, 2013).

Neste contexto, a espécie *Eugenia dysenterica* DC., popularmente conhecida como cagaiteira, fora selecionada para o desenvolvimento desta pesquisa dentre os muitos exemplos das plantas medicinais do Cerrado, referidas pela população, em virtude de sua pluralidade de usos e de poucos trabalhos científicos sobre ela encontrados (GUARIM NETO & MORAIS, 2003). *E. dysenterica* apresenta-se como uma planta melífera, ornamental, que produz frutos comestíveis detentores de propriedades laxantes (RIZZINI, 1970).

A segunda espécie selecionada para este estudo, *Annona crassiflora* Mart, apresenta-se como uma árvore que dá uma fruta típica conhecido como araticum do cerrado, seus frutos são altamente consumidos "in natura", por pessoas nativas ou usado para preparar o suco, sorvete ou gelatina. Os frutos são vendidos em mercados regionais e não têm valor comercial no Brasil. O óleo das sementes são utilizadas contra infecções no couro cabeludo e na medicina popular, infusão de folhas e sementes são usadas contra a diarreia e como antitumoral (ALMEIDA *et al.*, 1998).

Pesquisas apontam que drogas provenientes de produtos naturais como sendo eficazes no tratamento da doença de Alzheimer (DA), uma afecção neurodegenerativa irreversível e progressiva que atinge principalmente no indivíduo a memória e a capacidade de raciocínio (RANG *et al.*, 2001, EASTWOOD & REISBERG, 1996).

Embora intenso e recente esforços no avanço para o entendimento a cerca dos mecanismos de neurodegeneração envolvidos na patologia da DA um tratamento que tem sido bastante eficaz em diminuir os sintomas desta doença, através do uso de fármacos inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) para evitar a degradação da Acetilcolina.

Há uma progressiva busca por inibidores da AChE a partir de produtos naturais que apresente menos efeitos prejudiciais a saúde do ser humano que outros medicamentos já existentes e assim possam ser utilizados futuramente como fitoterápicos. (FEITOSA *et al.*, 2011), logo as estratégias atuais para o desenvolvimento de novos agentes concentram-se em compostos com potencial anticolinesterásico e as plantas são uma fonte principal destes compostos (KONRATH *et al.*, 2012).

Neste contexto, visando contribuir com o conhecimento de metabólitos secundários das espécies e na busca da obtenção de substâncias com princípios ativos extraídos a partir de óleos essenciais de *E. dysenterica* e extratos de *A. crassiflora*, com potencial farmacológico e com potencial de inibição da AChE para o tratamento da DA. Pretende-se com estes resultados corroborar com uma fonte promissora de informações e substâncias que serão utilizadas na elaboração futura de produtos fitoterápicos para a utilização para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Realizar estudo fitoquímico e farmacológico para identificar substâncias bioativas das espécies *Eugenia dysenterica* DC. e *Annona crassiflora* Mart

### 2.2 Específicos

- Identificar em óleos essenciais da espécie *E. dysenterica* substâncias que inibam a enzima acetilcolinesterase (AChE);
- Investigar o potencial do óleo essencial de *Eugenia dysenterica* na atividade antioxidante;
- Avaliar as alterações sobre os sistemas antioxidantes
- Realizar uma revisão sobre as atividade farmacológicas da *Annona crassiflora*;
- Isolar, purificar e identificar a estrutura dos constituintes químicos em extratos das folhas e frutos da espécie *A. crassiflora*;
- Analisar a inibição qualitativa e quantitativa da enzima acetilcolinesterase pela espécies *Eugenia dysenterica* e *Annona crassiflora*
- Avaliar a toxicidade dos extratos a partir dos teste do MTT, Toxicidade em *Artemia salina*.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S.P.; Frutas nativas do cerrado: caracterização físicoquímica e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC. p. 247-285, 1998
- BRITO, A.R.M.S.; A.A.S. BRITO. Forty years of Brazilian medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology** 39: 53-67, 1993.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 33 (2), 179–190, 2000.
- CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.500-506, 2011.
- ELISABETSKY, E. Pesquisas em Plantas medicinais. **Ciência e Cultura** 39 (8), 697–702, 1987.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, D.K.; ANDRES, V.Jr. *et al.*, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology** 7, p. 88-95, 1961.
- EASTWOOD, R., REISBERG, B. Mood and behaviour, In: Gauthier S. editor. **Clinical diagnosis and management of Alzheimer's disease**. London: Martin Dunitz. p. 90-175, 1996.
- FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M.; LUZ, N.N. N.; Bezerra, M.Z.B; TREVISAN, M.T.S. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Biology**, 71, p.783-789, 2011.
- HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; AND J.L. Wolfender. In *Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine* (K. Hostettmann, A. Marston, M. Maillard and M. Hamburger, eds.), pp. 17-45. Clare
- KONRATH E.L.; NEVES B.M.; LUNARDI P.S.; PASSOS C.S.; SIMÕES- F.; ORTEGA M.G.; GONÇALVES C.A.; CABRERA J.L.; MOREIRA J.C.F.; HENRIQUES A.T. Investigation of the *in vitro* and *ex vivo* acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used Lycopodium species from South America on alkaloid extracts. **J. Ethnopharmacol.** 2012; 139(1): 58-67.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA J.R.; GRYNBERG N.F.; ECHEVARRIA, V.F. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MARQUES, J.J. Solos do Cerrado. Departamento de Ciências do Solo, Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG, 2004. Disponível em: <www.dcs.ufla.br> Acesso em: ‘ 24 junho 2013.
- NETO, G.; MORAIS, R.G. 2003. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um estudo Bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica** 17(4): 561-584.

RANG, H.P.; Dale, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. 4<sup>a</sup> edição: Editora Guanabara.

RHEE, I. K., VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K. *et al.*, Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, 915, p.217-223, 2001.

RIZZINI, C. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 30, n. 3, p. 381-402, 1970.

RODRIGUES, V.E. G.; CARVALHO, D.A. Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras: UFLA, 2001.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.486-491, 2011.

SILVA, N.L.A. et al. Triagem fitoquímica de Plantas do Cerrado da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, n.2, p.1-17, 2010.

# CAPÍTULO I

## Plantas Mediciniais e a Doença de Alzheimer

Capítulo de livro “Considerações sobre a Doença de Alzheimer” publicado in: Plantas medicinais e a doença de Alzheimer. Editora Átomo, 2015.

Chistiane Mendes Feitosa e Diane Mendes Feitosa, Soane Kaline Morais Chaves e Cassio

Herbert Santos de Melo

## *CONSIDERAÇÕES SOBRE A DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)*

### RESUMO

A doença de Alzheimer é uma patologia degenerativa que atinge principalmente a memória e a capacidade de raciocínio, sendo um dos grandes problemas de demência conhecido, essa doença afeta em maioria idosos na qual é a terceira causa de morte nos Países desenvolvidos. É uma afecção neurodegenerativa irreversível e progressiva, que proporciona muitos distúrbios cognitivos como perda de memória, dificuldades ou perda da linguagem, razão e habilidade de cuidar-se. Esta doença pode ser dividida em quatro estágios: inicial, moderado, grave e terminal. Os sintomas sofrem variações que vão desde alterações de memória, personalidade, habilidades visuais e comprometimento em realizar tarefas simples do cotidiano, até um estágio terminal no qual o paciente possui incapacidade de locomoção, diálogo e fica restrito a um leito. Estudos têm mostrado que DA pode ter predisposição genética e/ou toxidades decorrentes do alumínio, espécies reativas do oxigênio e de aminoácidos neurotóxicos. Geralmente, a DA dura cerca de 8 a 10 anos, desde os primeiros sintomas até a morte. As regiões do cérebro como hipocampo e córtex cerebral, que estão associadas às funções mentais como reconhecimento de estímulos sensoriais, memória e pensamento abstrato, são as mais afetadas pelas alterações bioquímicas causadas pela DA. Uma das maiores evidências da ocorrência da doença é a deposição do peptídeo  $\beta$ -amilóide em placas que causam destruição de neurônios por criar um processo inflamatório crônico nas regiões afetadas, alterar a regulação de cálcio, essencial para a condução dos estímulos nervosos, e aumentar a produção de radicais livres, tóxicos para as células nervosas. Na DA ocorre a deficiência de neurotransmissores que são responsáveis pela transmissão dos estímulos nervosos transmitidos de um neurônio a outro. O principal neurotransmissor é a acetilcolina (ACh) que está envolvida diretamente nos processos motores, cognitivos e de memória. A DA gera a degradação de neurônios diminuindo a atuação da ACh, a qual é degradada pela ação de enzimas.

**Palavras-chave:** Alzheimer, Plantas Medicinais e Acetilcolinesterase.

Chistiane Mendes Feitosa e Diane Mendes Feitosa, Soane Kaline Morais Chaves e Cassio  
Herbert Santos de Melo

## CONSIDERATIONS ON ALZHEIMER'S DISEASE (AD)

### ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is degenerative pathology that primarily affects the individual memory and reasoning ability is one of the great known dementia problems, this disease affects mostly elderly in which is the third cause of death in developed countries. It is an irreversible, progressive neurodegenerative disorder, which provides many cognitive disorders such as memory loss, difficulties or loss of language, reason and ability to care for themselves. This disease can be divided into four stages: initial, moderate, severe and terminal. Symptoms undergo variations ranging from memory impairment, personality, and impairment in visual abilities to perform simple daily tasks, to a terminal stage in which the patient has locomotor disability, dialogue and is restricted to a bed. Studies have shown that AD may have a genetic predisposition and / or toxicities resulting from aluminum, reactive oxygen species and neurotoxic amino acids. Generally, the DA takes about 8 to 10 years, from the first symptoms to death. The regions of the brain such as the hippocampus and cerebral cortex, which are associated with mental functions such as recognition of sensory stimuli, memory and abstract thinking, are the most affected by the biochemical changes caused by AD. One of the biggest evidence of the occurrence of the disease is the deposition of  $\beta$ -amyloid peptide in plaques that cause destruction of neurons to create a chronic inflammatory process in the affected areas, change the setting of calcium, essential for the conduction of nerve stimuli, and increase production of free, radical toxic to nerve cells. In AD occurs neurotransmitter deficiency that are responsible for the transmission of nerve signals transmitted from one neuron to another. The main neurotransmitter is acetylcholine (ACh) which is directly involved in motor processes, cognitive and memory. The DA generates degradation of neurons by decreasing the activity of ACh, which is degraded by the action of enzymes.

Keywords: *Alzheimeir, medicinal plants, acetylcholinesterase.*



## 1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A DOENÇA DE ALZHEIMER

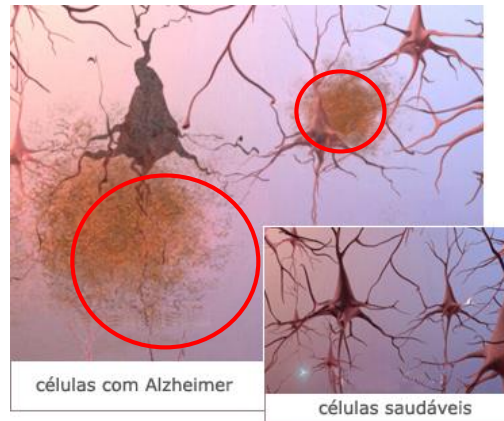
De acordo com a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAz) estima-se que existam no mundo cerca de 35,6 milhões de pessoas com a Doença de Alzheimer. No Brasil, há cerca de 1,2 milhão de casos, a maior parte deles ainda sem diagnóstico. A ABRAz reúne familiares, familiares-cuidadores e cuidadores profissionais em seu quadro associativo, para, a partir de suas vivências e conhecimentos, desenvolver ações em favor das pessoas acometidas pela Doença de Alzheimer (DA) e oferecer apoio ao familiar-cuidador. É uma entidade privada de natureza civil, sem fins lucrativos, que tem como missão ser o núcleo central, em todo o País, das pessoas envolvidas com a DA e outras demências.

### 1.1 O que é a doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer foi descrita inicialmente pelo médico Alemão Alois Alzheimer, em 1907. Ao realizar uma autópsia em um cérebro *post mortem*, ele descobriu lesões nas células cerebrais (neurônios), as quais ficaram conhecidas como placas senis. Na figura 1 observamos a diferença de células saudáveis e células com a doença e com a presença de placas senis. Estas placas é 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).

Porém, pesquisas já indicaram a relação do aparecimento da DA em fumantes e ex-fumantes e com o consumo de bebidas alcoólicas (GRAVES *et al.*, 1991; CATALDO *et al.*, 2010). Algumas pesquisas indicaram que o consumo de cigarros podem potencializar as chances de pessoas aumentarem o risco do desenvolvimento da DA e ainda outros estudos indicaram que há maior incidência da doença em ex-fumantes (CATALDO *et al.*, 2010).

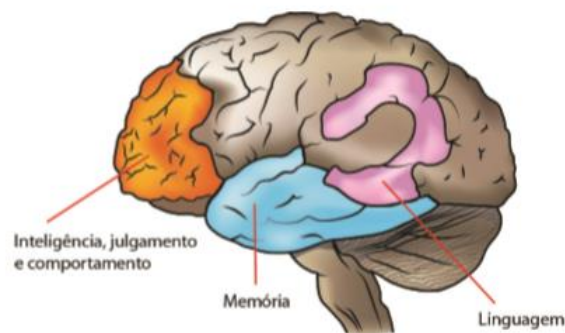
Em estudos pré-clínicos com fumantes foi verificado que o estresse oxidativo cerebral relacionada ao tabagismo é um mecanismo potencial na promoção da DA e o aumento do risco do seu desenvolvimento (DURAZZO *et al.*, 2014).



**Figura 1-**Diferença entre células normais e com Alzheimer

(Fonte: <http://www.alz.org/brain>)

A Doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa, que atinge inicialmente a memória e a capacidade de raciocínio. Na figura 2 observamos as áreas principalmente acometidas no cérebro pela doença de Alzheimer que atingem principalmente a memória, a linguagem e o comportamento.



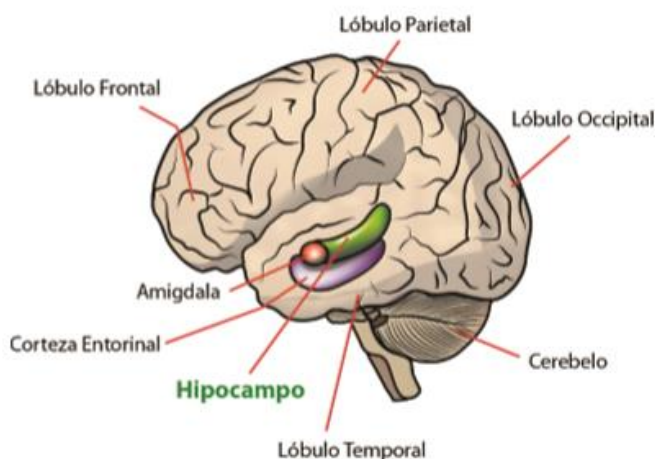
**Figura 2-** Cérebro com destaque com áreas referentes a memória, linguagem, inteligência e comportamento (Fonte <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/mal-de-alzheimer>).

### *1.2 Diagnóstico e sintomas da doença de Alzheimer*

A doença de Alzheimer está associada a déficits de neurotransmissores cerebrais, como acetilcolina, noradrenalina e a serotonina. O seu tratamento é sintomático e consiste na restauração da função colinérgica. Nesse processo de restauração, a elevação no nível da acetilcolina poderia ser útil para melhorar um dos sinais da doença: a deficiência de aprendizagem (PERRY, 1986).

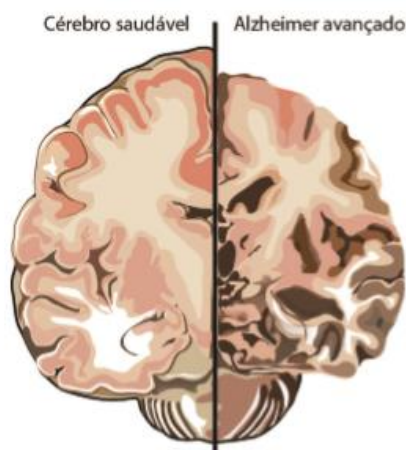
Algumas ocorrências, como desorientação para tempo e lugar, guardar coisas em lugares inadequados, não reconhecer parentes próximos, alterações de humor e comportamento, incontinência urinária ou fecal, agitações e psicoses alucinatórias, e fases de depressão podem estar associadas à doença (BALLONE, 2004). O diagnóstico da DA é muitas vezes difícil e, em alguns casos, somente é possível afirmar a ocorrência da doença por meio de medições no tecido cerebral *post mortem*. Em vida, pode ser realizada a avaliação do quadro clínico, incluindo-se testes de memória, exames de sangue, tomografias e ressonância magnética.

O Mal de Alzheimer tem o seu início no hipocampo quando proteínas anormais se agregam, formando placas senis e degenerescência fibrilar, as quais se acumulam no cérebro e matam as células cerebrais. Na figura 3 observamos as áreas cerebrais com o detalhe do hipocampo, área responsável pela memória, formação de novas lembranças e mais atingida pela doença de Alzheimer.



**Figura 3**-Áreas cerebrais com destaque com a área principal da memória (hipocampo)  
(Fonte: <http://maldeallzheimer.wordpress.com/>)

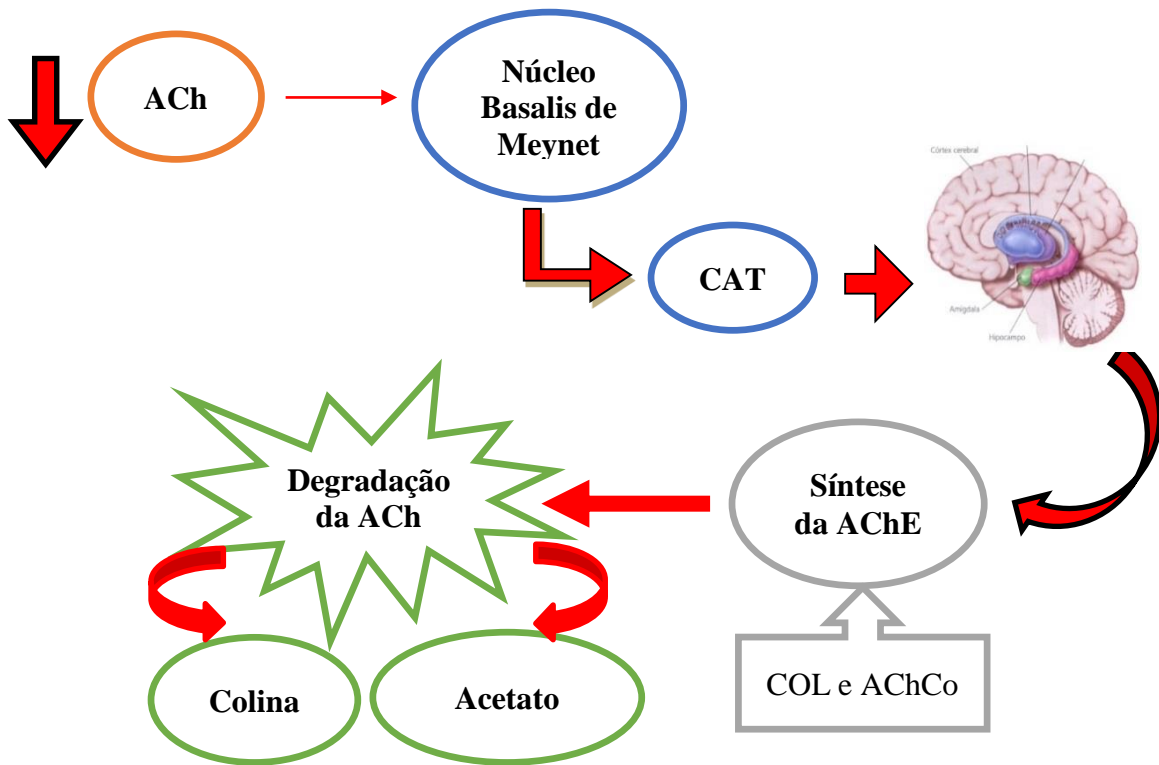
Na figura 4 observamos duas imagens justapostas: a esquerda representa o cérebro de uma pessoa normal e a direita, o cérebro de um portador da DA. É possível observar a perda de tecido cerebral nas regiões que controlam as principais funções cognitivas responsáveis pelos processos de memória. No cérebro 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 4** - Demonstração em corte de um cérebro saudável e com Alzheimer

(Fonte: [http://www.alz.org/brain\\_portuguese/09.asp](http://www.alz.org/brain_portuguese/09.asp))

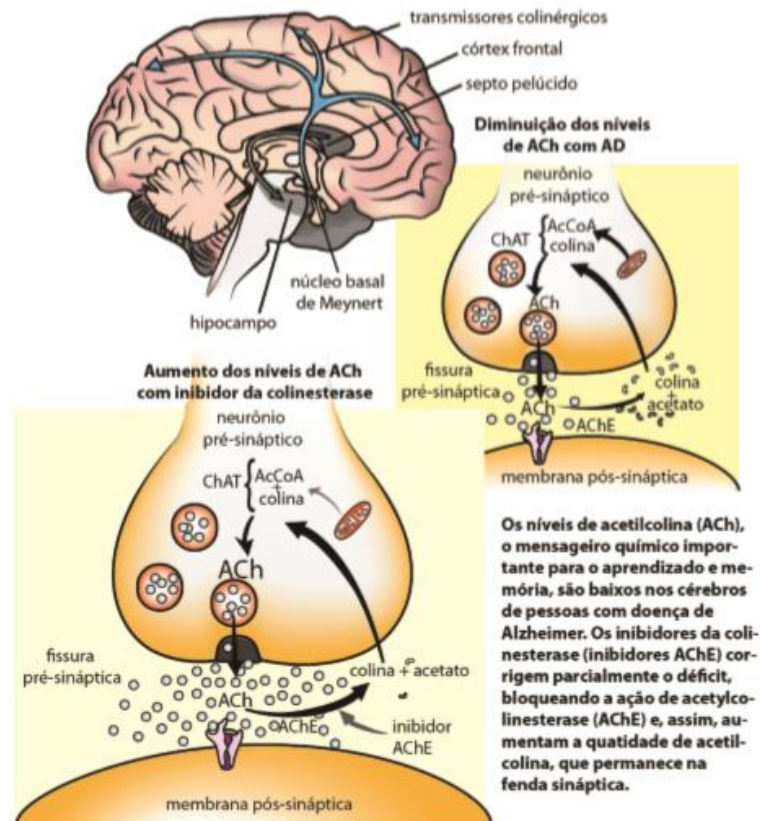
A doença de Alzheimer é uma doença progressiva, de causa desconhecida, e que acomete em sua maioria, as pessoas idosas. Acredita-se que a inibição de uma enzima, a acetilcolinesterase (AChE), aumente a concentração de acetilcolina na sinapse, região de comunicação entre os neurônios no cérebro, o que diminuiria ou retardaria a progressão dos sintomas no tratamento desta doença (Figuras 5 e 6). A DA relacionada ao déficit cognitivo e a retenção de memória, devido a disfunções da neurotransmissão colinérgica, um outro tratamento eficaz para a doença baseia-se no aumento dos níveis de acetilcolina a partir da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), ou seja a hipótese colinérgica. Nesta hipótese a deficiência de acetilcolina ocorre devido a uma atrofia do núcleo basalis de Meynert que é fonte da enzima colina transferase, está por sua vez é transportada para áreas cerebrais tais como, hipocampo, córtex cerebral e amígdala, onde catalisa a reação de síntese da acetilcolina a partir da colina e da acetilcoenzima, por fim a acetilcolina restante é degradada pela acetilcolinesterase na fenda sináptica em colina e acetato (Figura 5) (SÁ *et al.*, 2012; MINETT e BERTOLUCCI, 2000). Entender a hipótese colinérgica é importante para entender o desencadear da doença e sugerir possíveis tratamentos.



**Figura 5 - Demonstração da hipótese colinérgica (MINETT & BEROLUCCI, 2000). Legenda:** ACh: acetilcolina; AChE: acetilcolinesterase; CAT: enzima colina transferase; COL: Colina; AChCO: acetilcoenzima

Os inibidores desta enzima comercializados, geralmente, têm efeitos prejudiciais: a tacrina (Cognex<sup>®</sup>) é hepatotóxica; a rivastigmina (Exelon<sup>®</sup>) apresenta também efeitos colaterais indesejáveis, e a fisostigmina (Synapton<sup>®</sup>) é moderadamente eficaz, em seres humanos.

A galantamina (Reminyl<sup>®</sup>) - alcalóide isolado primeiramente da espécie *Galanthus woronowi* (Woronow's snowdrop) (Figura 7), uma Amaralidaceae - é um inibidor competitivo da AChE de longa atuação e é bastante seletivo. Devido a essas propriedades, a galantamina é considerada a droga mais efetiva no tratamento da DA, com poucas limitações (INGKANINAN *et al.*, 2003). *G. woronowi* é uma espécie nativa da Rússia, Turquia e Geórgia.



**Figura 6** - Demonstração de inibição da AChE

(Fonte: <http://alzheimer-unb.blogspot.com.br/2013/12/ola-leitores-todos-que-ja-estudaram.html>)

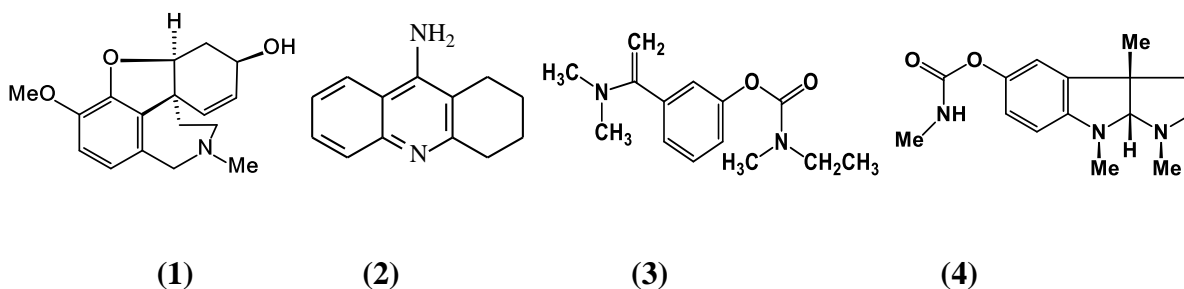
Neste contexto, é crescente a busca de novos inibidores da AChE presentes em produtos naturais que possam apresentar menos efeitos colaterais para serem utilizados futuramente como fitoterápicos. Em alguns Países como China e Índia algumas plantas medicinais como *Centella asiática* e *Ginkgo biloba* L. que são utilizadas na medicina tradicional, demonstraram em estudos de atividades farmacológicas, resultados relevantes no tratamento de distúrbios cognitivos a saber: ações anticolinesterásica, anti-inflamatória e antioxidante. Em função desses resultados, essas plantas têm sido indicadas para o uso terapêutico no tratamento da Doença de Alzheimer e a busca de inibidores a partir de plantas é crescente (FEITOSA *et al.*, 2011; FEITOSA, 2005).



**Figura 7**-Fotografia da espécie *Galanthus woronowi* (Woronow's snowdrop)  
(fonte: <http://www.kew.org/science-conservation>)

### 1.3 Inibidores das enzimas acetilcolinesterase e butilcolinesterase

Acredita-se que a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) aumente a concentração de acetilcolina na sinapse, o que diminuiria ou retardaria a progressão dos sintomas da doença de Alzheimer. Os inibidores comercializados, geralmente, têm efeitos prejudiciais: a tacrina (**2**) (Cognex<sup>®</sup>) é hepatotóxica; a rivastigmina (**3**) (Exelon<sup>®</sup>) apresenta também efeitos colaterais indesejáveis, e a fisostigmina (**4**) (Synapton<sup>®</sup>) é moderadamente eficaz, em seres humanos. A galantamina (**1**) (Reminyl<sup>®</sup>) - alcalóide isolado primeiramente da espécie *Galanthus woronowi*, uma Amaralidaceae - é um inibidor competitivo da AChE de longa atuação e é bastante seletivo. Devido a essas propriedades, a galantamina é considerada a droga mais efetiva no tratamento da DA, com poucas limitações (INGKANINAN, 2000). É de grande importância, portanto, a busca de novos inibidores presentes em produtos naturais que possam apresentar menos efeitos colaterais.





As causas do desenvolvimento da DA ainda não são totalmente conhecidas, mas as informações acerca de algumas alterações no tecido cerebral são características da doença. Dentre essas alterações, podem ser apontadas: formação de placas amilóides extracelulares, que são depósitos extracelulares amorfos da proteína  $\beta$ -amilóide, e formação de microtúbulos e emaranhados neurofibrilares intraneuronais. Em um cérebro normal, essas formações apresentam-se em menores quantidades (RANG, 2001).

As enzimas butirilcolinesterase (BuChE) e acetilcolinesterase (AChE) estão presentes no cérebro e são detectadas em emaranhados neurofibrilares e placas neuríticas. Na medida em que a inibição da colinesterase é modificada pela deposição de proteínas  $\beta$ -amilóides, este processo é considerado um componente chave para a compreensão da patofisiologia da DA (HEINRICH *et al.*, 2004).

Amplamente são realizados ensaios com extratos de plantas para testar a atividade inibitória das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (BuChE). A acetilcolina é um neurotransmissor inibido primeiramente pela AChE e, posteriormente, pela BuChE. A medida da atividade da AChE pode ser obtida por meio de um ensaio fácil e rápido, baseado no método de Ellman (1961), modificado por Rhee *et al* (2001). Utilizam-se os reagentes 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) e iodeto de acetiltiocolina (ATCI) e apresentamos em capítulos posteriores os ensaios para detecção de inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

As espécies *Ginkgo biloba* L. e *Centella asiática* L., utilizadas na medicina tradicional indiana e chinesa, demonstram efeitos favoráveis em relação a desordens cognitivas. Entre as propriedades dessas plantas, incluem-se as ações anticolinesterásica, anti-inflamatória e antioxidante. Vários estudos têm demonstrado que o uso de compostos anti-inflamatórios tem diminuído a progressão da DA e a degeneração neuronal. Além dessas ações, o uso desses compostos reduz o risco de desenvolvimento da DA (FEITOSA *et al.*, 2011; HOUGHTON & HOWES, 2003).

#### 1.4 Mecanismo de inibição da enzima acetilcolinesterase

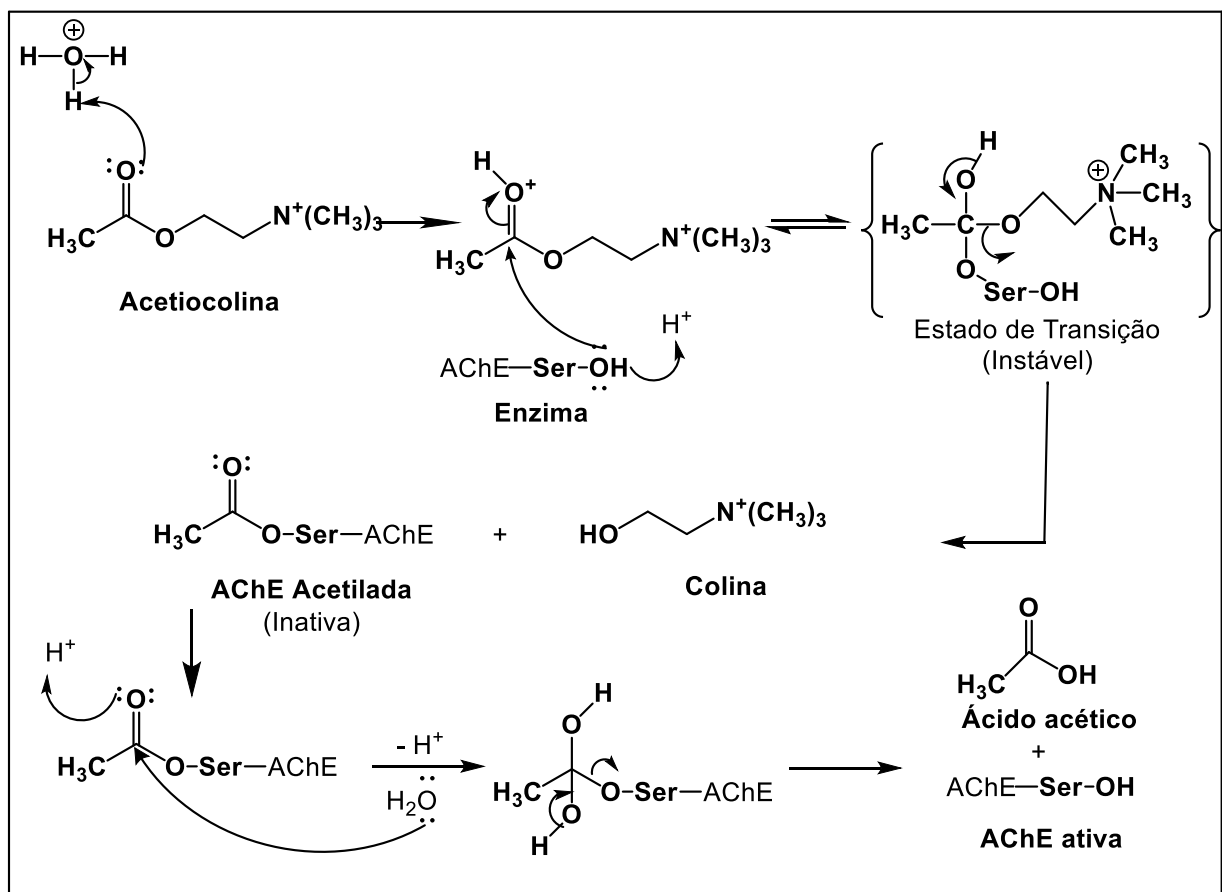
Os estudos obtidos para uma melhor compreensão do mecanismo de hidrólise da acetilcolina, catalisado pela AChE, foram realizados através da purificação e do sequenciamento dos aminoácidos da enzima, e da descrição da estrutura quaternária por cristalografia de raios-x e de modelagem molecular. Dois mecanismos químicos ocorrem paralelamente à catálise enzimática: as hidrólises ácida e básica de éster.



O nitrogênio quaternário do substrato liga-se ao sítio aniônico da enzima, cuja carga negativa é atribuída a um grupo carboxilato livre de um resíduo glutamato. Ocorre uma protonação concertada do oxigênio carbonílico do éster por um próton imidazólico, de um resíduo histidina, seguido de um ataque nucleofílico a um carbono parcialmente positivo, do grupo carbonila, pelo grupo hidroxila de um resíduo serina.

No Quadro 01, descreve-se a reação de hidrólise da acetilcolina catalisada pela AChE. Nota-se que o estado de transição é instável, convertendo-se rapidamente em colina e AChE acetilada. Desta forma, a AChE acetilada não pode se ligar a outra molécula de acetilcolina, o que a torna inativa. A enzima acetilada é submetida à hidrólise, resultando uma molécula de AChE ativa e uma molécula de ácido acético.

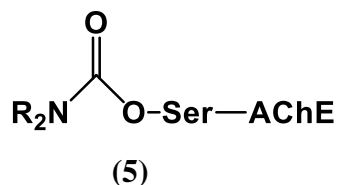
**Quadro 01-** Reação de hidrólise da acetilcolina catalisada pela AChE (FOYE *et al.*, 1995)



No último passo do mecanismo mostrado, se a enzima for acetilada por um grupo carbamato ou fosfato, torna-se mais resistente à hidrólise. Porém, se for acetilada por um éster carboxilato, ficará inativa por um longo período de tempo. Este passo é de importância

fundamental, principalmente para a descoberta e o desenvolvimento dos inibidores da acetilcolinesterase (AChEIs). Quando AChEIs e aril carbamatos se ligam ao sítio ativo da enzima, ocorre a hidrólise do carbamato, que transesterifica o resíduo serina com ácido carbâmico, resultando na enzima carbamilada (Figura 8).

**Figura 8** – Estrutura química da enzima carbamilada



As aminoacridinas, as piperidinas, os carbamatos, os organofosforatos e os alcalóides terciários são classes de inibidores da acetilcolinesterase (AChEIs). Os inibidores podem ser reversíveis ou irreversíveis. Os inibidores reversíveis geralmente pertencem ao grupo dos carbamatos, que inibem a enzima acetilcolinesterase ao servir como seu substrato, carbamitando a mesma.

### 1.5 Inibidores reversíveis e irreversíveis da acetilcolinesterase

Com os inibidores considerados reversíveis, a regeneração hidrolítica da enzima carbamilada é mais lenta que a da AChE acetilada. A razão de regeneração da enzima carbamilada é medida em minutos: a meia vida para metil carbamatos é cerca de 15 minutos, enquanto a meia-vida para a AChE acetilada é cerca de 0,2 milisegundos. Embora o período de regeneração hidrolítica da enzima carbamilada seja maior, a forma ativa da enzima é sempre regenerada.

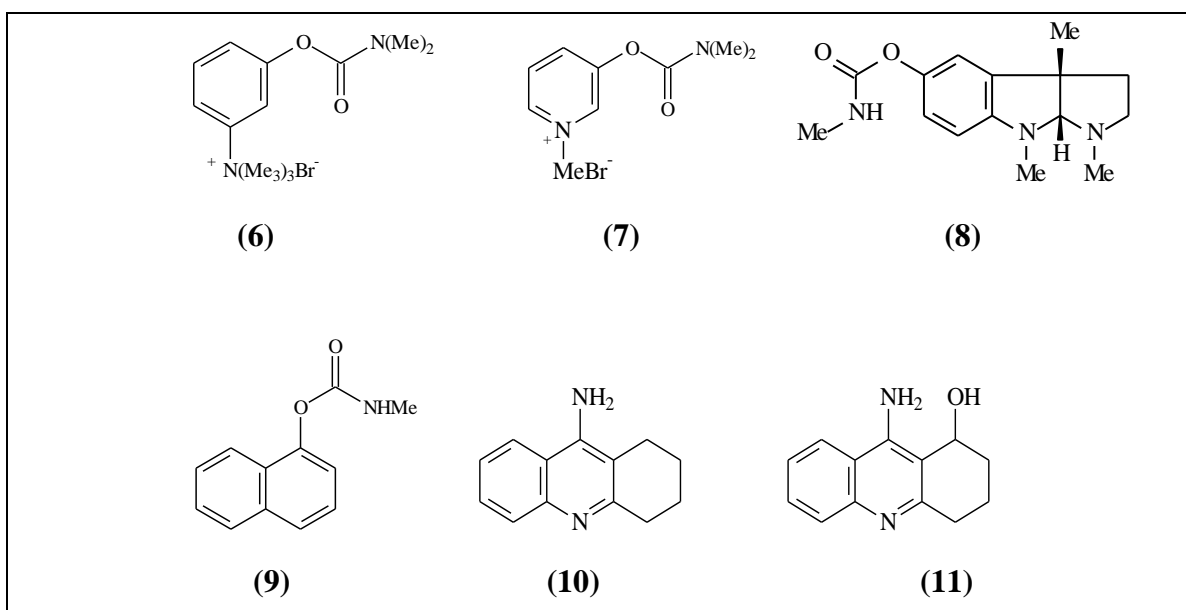
O alcalóide isolado das sementes da espécie *Physostigma venenosum* (Fisostigma), (Figura 9), denominado fisostigmina (6) e pertencente à classe dos aril carbamatos, é um inibidor reversível. O composto é bastante lipofílico, podendo difundir-se facilmente pela barreira do cérebro para dentro do sistema nervoso central (SNC), inibindo a AChE no cérebro e revertendo os efeitos dos compostos anticolinérgicos (ROBINSON & ROBINSON, 1968). Outro composto da classe dos carbamatos é o carbaril (9), que apresentou grande impacto econômico como inseticida, no controle de pulgas e sarnas em animais domésticos e no controle de pragas de plantas domésticas e legumes.



**Figura 9-** Fotografia da espécie *Physostigma venenosum*, com detalhes das folhas, flores, frutos e sementes (Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Physostigma>)

A neostigmina (7) e a piridostigmina (8), pertencentes à mesma classe da fisostigmina (6), são reversíveis pelo mesmo mecanismo que a fisostigmina. Porém, apresentam-se quimicamente mais estáveis e com longo tempo de atuação. A tacrina (10) - uma aminoacridina comercialmente conhecida como Cognex® e já utilizada no tratamento da DA - e a velacrina (11) são inibidores reversíveis não clássicos sob investigação para o tratamento de distúrbios cognitivos. As estruturas desses compostos estão representadas no Quadro 02.

**Quadro 02 -** Estrutura de alguns inibidores reversíveis da AChE



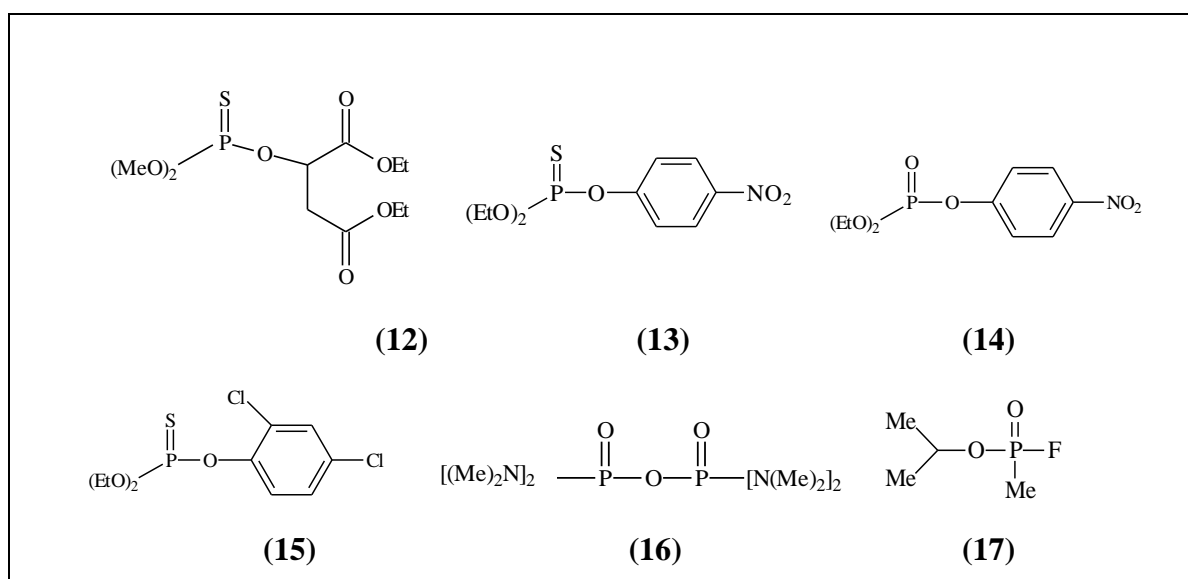
Legenda: Me= CH<sub>3</sub>

A síntese de compostos que possam servir de substrato para a AChE resultaria na formação de uma enzima esterificada mais estável e mais resistente à hidrólise que o éster carboxilato. Essa possibilidade constitui a lógica química envolvida no desenvolvimento de AChEIs efetivos.

Alguns derivados fosfoésteres (Quadro 03) são utilizados como inseticidas, como: malation (12), paration (13), paraoxona (14), diclorfentiona (15), escradana (16) e sarina (17) (Quadro 3). Estes grupos de inseticidas, AChEIs irreversíveis, são benéficos para a produção agrícola em todo o mundo. No entanto, como são extremamente lipofílicos e possuem alta pressão de vapor, a inalação de seus vapores e/ou sua absorção pela pele podem ser fatais. A alta toxicidade e sua utilização como armas químicas de guerra ocasionam um sério problema que estimula a pesquisa tanto para o desenvolvimento de antídotos como para a investigação de inibidores da AChE e a descoberta de inseticidas menos nocivos (FOYE *et al.*, 1995).

Uma classe de inibidores da AChE reversíveis (cianoguanidinas) fora sintetizada por Finkelstein *et al.* (2002), estes resultados foram semelhantes a huperzina A, um anticolinesterásico utilizado para melhora de memória, isolado da planta *Hyperzia serrata*.

**Quadro 03** - Estrutura de alguns inibidores irreversíveis da AChE



**Legenda:** Me= CH<sub>3</sub>

A busca por inibidores da AChE estão aumentando atualmente, principalmente em estudos a partir de produtos naturais que apresente menos efeitos prejudiciais a saúde do ser humano que outros medicamentos já existentes e assim que possam ser utilizados futuramente e obter substâncias contendo princípios ativos extraídos a partir de plantas, com potencial farmacológico e inibidores da AChE no tratamento da DA.

## REFERÊNCIAS

- BALLONE, G.J. Doença de Alzheimer, 2002. Disponível em: <http://www.psiqweb.med.br/geriat/alzh.hmna>. Acesso em 16 de Outubro de 2014.
- CATALDO, J.K.; PROCHASKA, J. J.; GLANTZ, S.A. “Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation,” **Journal of Alzheimer's Disease**, vol. 19, no. 2, p. 465–480, 2010.
- DURAZZO, T. C.; MATTSSON, N.; WEINER, M.W. Smoling and increased Alzheimer’s disease risk: A review of potential mechanisms. *Alzheimer’s & Dementia*, vol 10, 3,p. S122-S145, 2014.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, D.K.; ANDRES, VJr; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity **Biochemical Pharmacology**, 7, p.88-95, 1961.
- FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M.; LUZ, N.N. N.; Bezerra, M.Z.B; TREVISAN, M.T.S. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Biology**, 71, p.783-789, 2011.
- FEITOSA, C. M. Contribuição estudo químico de Plantas do Nordeste do Brasil. Estudo monitorado da enzima acetilcolinesterase das plantas: *Kalanchoe brasiliensis* Camb. *Senna siamea* e *Anacardium Occidentale* (Tese de doutorado), Universidade Federal do Ceará Fortaleza- CE, 385p, 2005.
- FINKELSTEIN, B.L.; BENNER, E. A.; HENDRIXSON, M. C.; KRANIS, K.T.; RAUH, J.J.; SETHURAMAN, M.R., McCANN, S.F. Tricyclic Cyanoguanidinas: Synthesis, Site of Action and Insecticidal Activity of a Novel Class of Reversible Aceylcholinesterase Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, 599, p. 613, 2002.
- FOYE, W. O.; LEMKE, T.L; WILLIANS, D.A. **Cholinergic agonists, acetylcholinesterase inhibitors, and cholinergic antagonists. Principles of Medicinal Chemistry**, 4<sup>a</sup> ed., Ed. Willians & Wilkins, cap. 17, p 321, USA, 1995.
- HEINRICH, M.; TEOH, H.L. Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer’s disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, 92, p 147-162, 2004.
- HOUGHTON, P. J.; HOWES, M.J.R. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 513-527, 2003.
- GRAVES, A. B.; VAN DUIJN, C.M.; CHANDRA, V. *et al.*, “Alcohol and tobacco consumption as risk factors for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies,” **International Journal of Epidemiology**, vol. 20, supplement 2, p. S48–S57, 1991.

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

INGKANINAN, K.; TEMKITTHAMWON, P.; CHUENCHOM, K., YUYAEM, T.; THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, 89, p 261-264, 2003.

MINETT, T.S.C.; BERTOLUCCI, P.H.F. Terapia Colinérgica na Doença de Alzheimer. **Revista Neurociências**, v. 1, n. 8, p. 11-14, 2000.

PERRY, E.K.; **British Medicinal Bulletin**. Behavioral and cognitive neuroscience reviews, Vol.1 n.1, 42, p 63, 1986.

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

RHEE, K.I.; VAN R.I.J.N.; MR. and VERPOORTE, R. Qualitative Determination of false-positive effects in acetylcholinesterase assay using thin-layer chromatography. **Phytochemical Analysis**, vol. 14, p. 127-131, 2001.

ROBINSON, B.; ROBINSON, J. B. The anti-acetylcholinesterase activities of the alkaloids of *Physostigma venenosum* seeds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 20, p. 213S–217S, 1968.

SÁ, C.G. **Extração e testes de atividades farmacológicas do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck direcionados para a doença de Alzheimer**. Teresina-PI, (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas), UFPI, 2012.

## CAPÍTULO II

Atividades anticolinesterásica e antioxidante do óleo essencial de  
*Eugênia dysenterica*

Artigo aceito para publicação: [African Journal of Pharmacy and Pharmacology](#)

.

Chistiane Mendes Feitosa, Alisson dos Reis Barbosa, Cassio Herbert Santos de Melo, Rivelilson Mendes Freitas\*, José Eraldo do Nascimento Fontes, Soane Kaline Moraes Chaves, Emmanoel Vilaça Costa, Khaled Rashed

**Atividades anticolinesterásica e antioxidante do óleo essencial de *Eugenia dysenterica* DC.**

**RESUMO**

No presente trabalho avaliamos o potencial anticolinesterásico e antioxidante do óleo essencial de *Eugenia dysenterica*. Para a obtenção do OEC fora utilizando o sistema de hidrodestilação, tipo Clevenger e caracterização por CG-EM, submetidos a ensaios antioxidantes baseados na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, radical hidroxila e produção de óxido nítrico. O testes anticolinesterásico foi baseado no ensaio de Ellman(1960). A análise por CG/EM, identificou no OEC seis constituintes, sendo o óxido de cariofileno o majoritário com (66,37%). Foi observado a partir do ensaio de Ellman que OEC foi capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE) com um valor de  $CI_{50} = 0,916 \text{ ug.mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ) sendo um valor promissor comparando-se com o medicamento neostigmina ( $CI_{50} = 1.87 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), um inibidor da AChE utilizado no tratamento da doença de Alzheimer. Nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi observado que óleo essencial de *Eugenia dysenterica* preveniu a peroxidação lipídica, inibindo a quantidade de TBARS formado, de maneira semelhante ao ácido ascórbico. Além disso, houve uma redução na produção do radical hidroxila, assim como a produção de óxido nítrico.

Palavras-chaves: *Eugenia dysenterica*, óleo essencial, antioxidante, anticolineterásica,



Chistiane Mendes Feitosa, Alisson dos Reis Barbosa, Cassio Herbert Santos de Melo, Rivelilson Mendes Freitas, José Eraldo do Nascimento Fontes, Soane Kaline Moraes Chaves, Emmanoel Vilaça Costa, Khaled Rashed

**Antioxidant and anticholinesterase activities of the essential oil of *Eugenia dysenterica***

**ABSTRACT**

This paper describe the anticholinesterase and antioxidante activities of *Eugenia dysenterica* DC. Essentia oil (EOC). EOC were obtained by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus and the products were analyzed by GC-MS and CG-DIC. The antioxidant assay were performed based on the formation of TBARS, hydroxyl radical and nitric oxide production. Identified the six constituent EOC, and caryophyllene oxide the majority (66.37 %). Was starting the Ellman assay observed that EOC was able to inhibit the acetylcholinesterase (AChE) enzyme with an  $CI_{50} = 0.916 \text{ ug.mL}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ) with a promising value comparing with drug neostigmine ( $CI_{50} = 1.87 \text{ ug.mL}^{-1}$ ), AChE inhibitor used in the treatment of Alzheimer's disease. At concentrations of 0.9, 1.8, 3.6, 5.4 and  $7.2 \text{ mg.mL}^{-1}$  was found that EOC prevented lipid peroxidation inhibiting amount of TBARS formed in a similar manner to acid ascorbic. In addition, a reduction in the production of hydroxyl radical as well as the production of nitric oxide.

Keywords : *Eugenia dysenterica*; Essential oil; Antioxidant; anticholinesterase activities

## 1 INTRODUÇÃO

Uma variedade de óleos essenciais de plantas demonstraram atividade inibidora da AChE e podem ser relevantes para o tratamento de desordens neurodegenerativas tais como a doença de Alzheimer (DA). Os óleos essenciais de espécies *Citrus* por exemplo têm propriedades funcionais na prevenção de desordens neurodegenerativas (LOIZZO *et al.*, 2013). O óleo essencial da espécie *Centella asiática* e vários outros por exemplo: *Cistus salvifoli* e *Ocimum canum*, demonstraram atividades farmacológicas relevantes para o tratamento de distúrbios cognitivos, que indica potencial para utilização terapêutica dentro distúrbios tal como DA (HOUGHTON *et al.*, 2003).

Embora intenso e recente esforços no avanço para o entendimento a cerca dos mecanismos de neurodegeneração envolvidos na patologia da DA e também para descobrir novos medicamentos que combatem os sintomas, ainda o existe um déficit no número de agentes terapêuticos eficazes e seguros para tratar esta doença. Não há registro de novas drogas aprovadas pelo “Food and Drug Administration” (FDA) desde 2003, provavelmente porque os depósitos cerebrais anormais de A $\beta$  e  $\tau$ -proteínas ainda terem sido elucidadas a respeito de serem causas ou subprodutos da DA (BUCKHOLTZ, 2011). Desde a aprovação da galantamina para o tratamento de pacientes com DA, a busca por novos alcalóides anticolinesterásicas tem aumentado, levando a candidatos promissores como huperzine A (KONRATH *et al.*, 2013).

Muitos monoterpenos e sesquiterpenos presentes em óleos essenciais, por exemplo, 1,8-cineol, pineno  $\alpha$ -linalol foram citados na pesquisa como sendo bastante promissores, devido à sua atividade anticolinesterásica potente (KIENDREBEOGO, 2011). No entanto, há poucos relatos na literatura à respeito de inibição da AChE por óleos essenciais de plantas (CHAIYANA *et al.*, 2012).

Os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) têm aplicações terapêuticas em DA e na adição do sistema colinérgico central, sendo considerado um dos mais importantes sistemas de neurotransmissores envolvidos na regulação das funções cognitivas, perda neuronal colinérgica na área do hipocampo é a principal característica da DA o aumento da atividade colinérgica central (ENZ *et al.*, 1993, SIDDIQUI *et al.*, 1999).

Atividades farmacológicas de plantas e os seus componentes podem ser relevantes para o tratamento de distúrbios cognitivos, incluindo o aumento da função colinérgica no SNC, as atividades anti-inflamatórias e antioxidantes (HOUGHTON *et al.*, 2003). Uma variedade de plantas foram relatadas demonstrando a atividade inibidora de AChE e assim podem ser

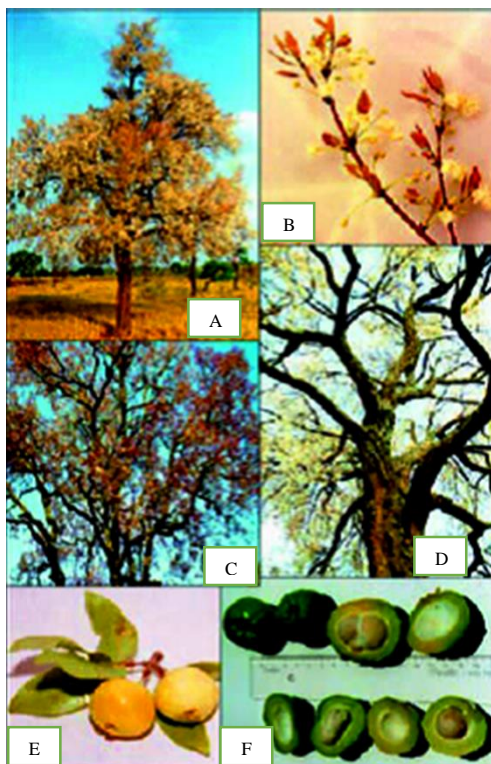
relevantes para o tratamento de doenças neurodegenerativas tais como DA (MUKHERJEE *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais são importantes ingredientes aromatizantes nos produtos alimentares e bebidas, são misturas complexas de compostos químicos e classificam-se em três grupos principais: monoterpenos, sesquiterpenos e oxigenados e bastante utilizados na indústria farmacêutica ou cosmética e possuem várias atividades comprovadas: antibacteriano, antisséptico, anti-inflamatório (SIMÕES *et al.*, 2000) e pesquisa com a utilização de OE na busca por inibidores da AChE estão aumentando atualmente, principalmente em estudos pré-clínicos com animais, estudo preliminar com o OE de *Citrus sinensise e Citrus limon*, voltado para memória de ratos sugeriu que o óleo inibe consideravelmente a enzima acetilcolinesterase melhorando a memória (CAMPELO *et al.*, 2012, SÁ *et al.*, 2012).

A diversidade estrutural dos terpenóides que exercem atividade inibitória da AChE dificulta a predição do potencial de relação estrutura-atividade. Mas sabe-se que algumas características, como a presença de um ligante hidrofóbico pode estar associadas a uma maior efetividade na inibição, já que o sitio ativo da AChE é conhecido por ser susceptível à interações hidrofóbicas. Os monoterpenos consistem de um esqueleto hidrocarboneto que podem ser cíclicos ( $\alpha$ -pineno) ou acíclicos (linalol), uma característica que também pode influenciar em sua atividade inibidora da AChE. Para os monoterpenóides bicíclicos com um esqueleto careno ou pinano, o potencial de inibição da AChE foi associado com a posição da dupla ligação (CONFORTI *et al.*, 2007). A presença de olefinas terminais resultou em diminuição da inibição de AChE, assim como a presença de um grupo funcional oxigenado (MIYAZAWA e YAMAFUJI, 2005).

A espécie *Eugenia dysenterica* DC. O. Berg, é utilizada na medicina popular como anti-inflamatória, antidiarreica e diuréticas. No Brasil, essa espécie é popularmente conhecido como "cagaiteira". Suas folhas opostas, simples, ovaladas ou limbo elíptica e suas flores brancas são comestíveis (Figura 1) (RIZZINI, 1970) e detentoras de propriedades laxantes. Seus frutos são consumidos crus ou na forma de sucos, ou processado para sorvetes e licores e quando fermentado pode produzir álcool e vinagre. Avaliação sensorial de vinho de fruta de cagaita mostrou mais de 70% de aceitabilidade para a cor, aroma e sabor para todas as bebidas formuladas nestes ensaios a partir da cagaita (OLIVEIRA *et al.*, 2011, OGA *et al.*, 2014). O chá das folhas da cagaiteira é usada para combater diarreia e como agente anti-inflamatório. O consumo diário da polpa dos frutos da Cagaita (100,0 g), pode contribuir significativamente para o fornecimento das necessidades diárias de vitamina C (em média, 71,0%), vitamina A (em média de 7,5%) e folatos (em média de 7,9%). A "cagaiteira" apresenta alto teor de polpa

e baixo teor calórico, considerado como uma fonte de vitamina C, o que pode sugerir que esta espécie tenha importante papel na saúde humana (CARDOSO *et al.*, 2011)



(Silva, RSM *et al.*, 2001)

**Figura 1** - Árvore de cagaita em florescimento (a). Detalhe da inflorescência (b). Cagaiteira com folhas novas (c). Detalhe do tronco (d). Fruto maduro e folha (e). Fruto verde e semente (f).

Neste contexto, realizamos identificação dos constituintes, análise antioxidante e anticolinesterásica do óleo essencial das folhas da espécie cagaita (*E. dysenterica*). Estas atividades estão sendo relatadas para o OE desta espécie na literatura, pela primeira vez através deste trabalho.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Família Myrtaceae, gênero *Eugenia*, família *Eugenia dysenterica*.

O cerrado, dentro da biodiversidade brasileira, é uma potencial fonte de espécies vegetais que desempenha importante papel na produção de compostos bioativos (RODRIGUES & CARVALHO, 2007). Estes compostos são originados do metabolismo secundário e estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação da planta ao seu meio, além de apresentarem diversas atividades biológicas (MIRANDA, 2010).

Neste bioma, destaca-se a família Myrtaceae, a qual é uma das mais complexas famílias do ponto de vista taxonômico, inclui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies com distribuição pantropical e subtropical, predominantemente, concentrada na região neotropical e na Austrália, incluindo espécies frutíferas e de interesse medicinal. Na flora brasileira esta representada por 22 gêneros e aproximadamente 1000 espécies, com destaque na Mata Atlântica e Floresta de Restinga (ROMAGNOLO & SOUZA, 2006; SOUZA & LORENZI, 2012), com cerca de 1000 espécies distribuídas principalmente nas Américas Central e do Sul (MERWE et al., 2005), o gênero *Eugenia* é, ao lado de *Myrcia*, um dos mais representativos da família Myrtaceae, inclusive no Brasil, onde são encontradas aproximadamente 350 espécies nativas de *Eugenia* (LANDRUM & KAWASAKI, 1997). Além da importância ecológica, as espécies do gênero prestam-se a diversos usos, com destaque para a produção de frutos, madeira e paisagismo (RECORD & HESS, 1949; MARCHIORI & SOBRAL, 1997; OLIVEIRA, 2007). A circunscrição de *Eugenia*, assim como da família Myrtaceae como um todo, tem experimentado importantes modificações nos últimos anos.

Myrtaceae é uma das mais complexas famílias do ponto de vista taxonômico, inclui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies com distribuição pantropical e subtropical, predominantemente, concentrada na região neotropical e na Austrália, incluindo espécies frutíferas e de interesse medicinal. Na flora brasileira esta representada por 22 gêneros e aproximadamente 1000 espécies, com destaque na Mata Atlântica e Floresta de Restinga (SOUZA & LORENZI, 2012).

As espécies da família Myrtaceae apresentam habito lenhoso, raramente são arbustos, folhas com presença de glândulas translúcidas produtoras de terpenos e outras substâncias aromáticas (SIQUEIRA et al, 2013). Os metabólitos secundários das plantas presentes em óleos essenciais e extratos de plantas são indiscutíveis fontes para a descoberta de princípios ativos inovadores para o tratamento de diversas doenças. Constituintes da família

Myrtaceae, plantas do gênero *Eugenia* tem apresentado larga atividade antimicrobiana abrangendo dermatófitos, bactérias e fungos (DUARTE et al, 2010).

Uma das características marcantes da família Myrtaceae é a presença de constituintes voláteis em suas folhas que são associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu 133 ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra microorganismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes polinizadores (SIANI et al., 2000), outra características marcantes desta família, presença em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais (METCALFE & CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981; BARROSO et al., 1984). Os óleos essenciais são citados por diversos autores como sendo responsáveis por determinadas propriedades medicinais encontradas nesses vegetais, segundo Cruz & Kaplan (2004), cerca de 70% das espécies pertencentes à família Myrtaceae são empregadas para fins medicinais, sendo as folhas, as cascas e os frutos, as partes mais utilizadas destas espécies. Complementarmente, diversos trabalhos científicos contemporâneos têm respaldado o uso popular de espécimes dos diversos gêneros de Myrtaceae, com foco no gênero *Eugenia*, por meio de diferentes investigações farmacognósticas, relacionadas aos aspectos botânicos, fitoquímicos e de atividades biológicas (CRUZ & KAPLAN, 2004; MALINOWSKI ET AL., 2009; BOSCARDIN ET AL., 2010). O principal gênero pertencente a esta família, cujos óleos essenciais são amplamente utilizados, é o *Eucalyptus* (*Eugenia racemulosa* O. Berg.) da mesma família e gênero da *Eugenia dysenterica*, SENNA et al. (2011).

Nativa do Cerrado a *Eugenia dysenterica* DC, popularmente conhecida como cagaiteira, é largamente utilizada pelo potencial laxativo da fruta, enquanto as folhas atuam como antidiarreicas (PRADO et al., 2014). Podendo atingir 30 metros de altura, a cagaiteira, é uma árvore de porte médio, tronco cilíndrico e torcido, variando de 20 a 40 centímetros de diâmetro (RIBEIRO et al., 2013). É uma planta perene, de folha caduca, seletivamente heliófita e xerófila (RIBEIRO et al., 2013; VILELA et al., 2012). A floração ocorre no meio da estação seca, a partir de meados de julho ao início de agosto, com o surgimento simultâneo de novas folhas (RIBEIRO et al., 2013).

Os óleos essenciais podem ser extraídos de diferentes partes da mesma planta e, apesar de apresentarem cor e aspecto semelhantes, podem apresentar diferente composição química, características físico-químicas e odores (ROBBERS et al., 1997). Embora extraído do mesmo órgão e da mesma espécie vegetal, a composição química do óleo essencial pode variar significativamente em função de épocas específicas, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano (REIS et al., 2003), e estar relacionado ao estágio

de desenvolvimento, às condições climáticas e de solo (SIMÕES & SPITZER, 2003). A composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos (CORRÊA JÚNIOR et al., 1994; SIMÕES & SPITZER, 1999). No entanto, fatores ambientais, como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação, nutrientes, altitudes, entre outros, podem causar variações na composição química dos óleos essenciais (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

O óleo essencial de *E. dysenterica* é caracterizada pela presença de componentes bioativos como  $\alpha$ - Pineno,  $\beta$ -Pineno,  $\beta$ -ocimeno,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -humuleno, limoneno, cariofileno, monoterpênos e outros (VILELA, 2012; DUARTE, 2010). Sesquiterpenos foram descritos como os componentes mais prevalentes tanto no óleo de *E. dysenterica* como no óleo de *E. uniflora*, em ambos os óleos também são encontrados  $\beta$ -cariofileno,  $\delta$ -cadineno,  $\beta$ -ocimeno,  $\beta$ -pineno (SANTOS, et al. 2015; VICTORIA, 2012; VILELA, 2012; LAGO et al., 2011; DUARTE, 2010).

A espécie *E. dysenterica* apresenta significativa diferença qualitativa e quantitativa dos constituintes do OE das folhas entre espécimes que pode ser atribuída às mudanças climáticas, composição do solo, época de coleta, altitude, métodos de extração e a diferentes biótipos da espécie (SANTOS, et al. 2015).

A composição do óleo essencial de ambas as plantas tem sido descrito como variável de região para região, por fatores bióticos e abióticos como: sazonalidade, presença de herbívoros, patógenos, presença de outras espécies de planta, polinização e outros (SANTOS, et al. 2015; VICTORIA et al., 2012; VILELA et al., 2013; DUARTE et al., 2010).

Esta espécie é descrita como potencial produtora de compostos secundários ativos, incluindo as substâncias fenólicas (PEREIRA et al., 2012), que têm recebido bastante atenção, sobretudo por apresentarem comprovado potencial antioxidante e alelopático (SOUZA et al., 2007). As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais são diversas, e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes, quando comparadas a outros medicamentos, como, por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideais para uso em nebulizações, banhos de imersão ou, simplesmente, em inalações. A volatilidade e o baixo peso molecular de seus componentes possibilitam que eles sejam rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas (BANDONI & CZEPACK, 2008).

*Eugenia dysenterica* vem sendo estudada para doenças como constipação crônica e síndrome do intestino irritado (OLIVEIRA et al., 2012). O valor de uso tradicional e social, bem como as propriedades comprovadas da *E. dysenterica*, chama atenção para o desenvolvimento de estudos na descoberta de moléculas bioativas para novas terapias.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material botânico

Coletou-se (1,0 Kg) de folhas de *Eugenia dysenterica* no campus do IFPI na cidade de Uruçuí-PI, coordenadas [07 ° 14'02 "S e 44 ° 33'14" W], nos meses de janeiro e fevereiro de 2013. As amostras vegetais foram transportadas para Teresina-PI para a devida identificação da espécie por depósito da exsicata que foi confirmada pela botânica Dr. Roseli Farias Melo de Barros, do Departamento de Biologia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Brasil. A espécie recebeu como número de depósito n. 28824 no herbário Graziela Barroso herbário localizado na UFPI.

#### 3.2 Composto puro, solventes e enzimas

A enzima acetilcolinesterase, Óxido de cariofileno (95% de pureza), ácido ascórbico e o ácido tiobarbitúrico foram adquiridos a partir de Sigma-Aldrich.

#### 3.3 Extração do óleo essencial

O óleo essencial de *E. dysenterica* foi obtido, partindo-se de 1.000 g de folhas frescas trituradas e utilizando-se o sistema de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger durante o período de três horas, sendo esta extração do OE realizada em duplicata. O óleo coletado foi subsequentemente seco com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e o teor percentual foi calculado com base no peso seco de material de planta. Os óleos essenciais foram armazenadas no freezer sob temperatura aproximadamente de - 20 °C até sua devida análise.

#### 3.4 Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massas

A composição química do óleo essencial de *E. dysenterica* foi determinada em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa CG/EM (Shimadzu, modelo QP5050A) pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, Campus São Cristóvão. As condições de análise para o CG foram: coluna capilar de sílica fundida DB-5MS de 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm de filme, He como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, a temperatura foi programada iniciando em 40°C por 3 min, seguindo de um aumento de



4°C/min até atingir 240°C, depois um aumento de 10°C/min até atingir 300°C, mantendo-se constante esta temperatura por 3 min, totalizando 59,00 minutos; temperatura do injetor de 250°C e temperatura do detector (ou interface) de 280°C; o volume de amostra injetada foi de 0,5 µL em diclorometano; taxa de partição do volume injetado de 1:50. As condições de análise do EM foram: detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da.

A identificação dos constituintes do óleo essencial de cagaita foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Para o cálculo do índice de retenção foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL *et al.*, 1963) em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>). Também foram utilizadas duas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21 que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes nas bibliotecas.

### 3.5 Identificação dos constituintes

Os componentes de óleo essencial foram identificados: i) por comparação de seus tempos de retenção (tR) com os dos mesmos compostos convencionais (óxido de cariofileno) analisados em condições idênticas, ii) os seus índices de retenção (RIS), determinadas em uma coluna relativa DB-5MS para a tR de uma série de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>), de acordo com Van Den Dool Kratz e (VAN DEN DOOL *et al.*, 1963) com os publicados na literatura (Van Den Dool e Kratz, 1963) e seus espectros de massa com aqueles listados no NIST (05, 05s, 21 e 107) e Wiley 8 bibliotecas do espectro de massa, e os publicados na literatura (ADAM, 2007).

### 3.6 Ensaio da inibição da atividade da acetilcolinesterase

O efeito inibitório qualitativo da atividade da AChE do OEC foi avaliado pelo o método espectrofotométrico de Ellman (ELLMAN, 1961). O OEC e o óxido de cariofileno (composto majoritário do OEC) foram dissolvidos em metanol para preparar soluções de 10mg.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, 1,5 µL do OEC/metanol foi aplicada sobre placa de CCD e eluída com os solventes clorofórmio:metanol (9:1), após a eluição a atividade da enzima foi detectada com a utilização do método de Ellman "*in situ*" sobre a placa (ELLMAN, 1961, RHEE *et al.*, 2001, AHMAD *et al.*, 2015). As placas desenvolvidas foram pulverizadas com DTNB a 1 mmol.L<sup>-1</sup>

e  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  em ATCI em tampão tris A. A placa foi seca por 3-5 minutos e, em seguida, uma solução de enzima de AChE (tipo VI-s liofilizada,  $261 \text{ U.mg}^{-1}$  sólido, Proteína  $386 \text{ U.mg}^{-1}$ ) foi borrifada na placa de CCD dissolvido em tampão A ( $500 \text{ U.mL}^{-1}$  solução estoque foi diluída com tampão A para se obter  $5 \text{ U.mL}^{-1}$  enzima), posteriormente então pulverizou-se esta mistura reacional sobre a placa. Um fundo amarelo com o halos brancos são visualizados e vistos como resultados positivos para inibir a AChE em um tempo de no máximo 5 minutos após a borrifação da ACHE.

Na triagem de inibição da AChE o teste falso-positivo fora realizado para observar se os resultados falso positivos do OEC e o composto majoritário no ensaio de microplacas são devidos à inibição enzimática ou para a inibição da reação química entre o DTNB e tiocolina (o produto da reação enzimática). Neste ensaio cerca de  $5 \text{ units.mL}^{-1}$  da AChE é pré-misturado com ATCi  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  em tampão a e incubados durante 15 minutos a  $37^\circ \text{ C}$ . A mistura de enzima-substrato foi usado como tiocolina pulverização. O extrato foi colocado na placa de CCD de gel de sílica desenvolvido como descrito acima e pulverizado com uma solução de DTNB  $\text{mmol.L}^{-1}$  seguido pela pulverização tiocolina, mancha branca sobre um fundo amarelo é observado para composto ou mistura falso positivo.

O efeito inibitório do OEC quantitativo da atividade de acetilcolinesterase foi avaliado utilizando e adaptação do método espectrofotométrico de Ellman modificado por Rhee (ELLMAN, 1961, RHEE *et al.*, 2001). Seis concentrações diferentes foram elaboradas em triplicata, partindo do OEC e óxido de cariofileno ( $0.9, 1.8, 2.7, 3.6, 5.4$  e  $7.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A reação é monitorizada durante 5 minutos a  $412 \text{ nm}$  em espectrofotómetro.

Em um tubo de ensaio adicionou-se  $100 \text{ uL}$  do OEC (concentração da solução a  $0,1\%$  em Tris-HCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 8, e metanol a  $10\%$ ) foi misturado com  $100 \text{ mL}$  de AChE  $0,22 \text{ U.mL}^{-1}$  ( $22 \text{ L}$  de enzima diluída em  $100 \text{ mL}$  de pH 8,  $0,1\%$  de BSA  $\text{mmol.L}^{-1}$  de Tris-HCl a 50) e  $200 \text{ uL}$  de tampão (Tris-HCl a 50, pH 8,  $0,1\%$  de BSA) e em seguida incubou-se a mistura durante 5 min em  $30^\circ \text{ C}$ . Subsequentemente adicionar,  $500 \text{ uL}$  do ácido 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) - DTNB (concentração de  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  em tampão Tris-HCl a pH 8,  $0,1 \text{ M}$  de NaCl,  $0,02 \text{ M}$  de  $\text{MgCl}_2$ ) e  $100 \text{ mL}$  de iodeto de acetiltiocolina - ATCI ( $4 \text{ mmol.L}^{-1}$  em água).

A Atividade anticolinesterase (%) foi calculada usando a equação 1, A amostra  $V_0$  e  $V$  representa 0 em branco as velocidades iniciais de amostras em branco e a concentração inibidora  $50\%$  ( $\text{CI}_{50}$ ), são obtidos utilizando Log-Probit. Rivastigmina (inibidor da acetilcolinesterase comercial) é utilizado como controle positivo, para a mesma concentração do óleo essencial.

**Equação 1** - Atividade anticolinesterase (%)

$$I (\%) = \left(1 - \frac{V_{o \text{ amostra}}}{V_{o \text{ branco}}}\right) \times 100$$

Onde  $V_{o \text{ amostra}}$  e  $V_{o \text{ branco}}$  representam as velocidades iniciais de amostras e branco. Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidas por intermédio de plotagem Log-Probit.

*3.7 Ensaio Antioxidantes**3.7.1 Ensaio Antioxidantes de espécies reativas com o ácido Tiobarbitúrico*

A determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foi realizada para quantificar o nível de peroxidação lipídica (ESTERBAUER *et al.*, 1990). Este método foi utilizado para determinar o potencial antioxidante do OEC, utilizando gema de ovo homogeneizada como um substrato lípido rico (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Resumidamente, a gema de ovo foi homogeneizada (1% w / v) em 20 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão de fosfato (pH 7,4). Um volume de 1 mL desta homogenato foi homogeneizado com 0,1 mL de OEC, em concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg.mL<sup>-1</sup>. A peroxidação lipídica foi induzida por adição de 0,1 mL de AAPH (2,2-azobis-2-midinopropane, 0,12 mol.L<sup>-1</sup>). O controle foi realizado apenas com a solução (0,05% de Tween 80 dissolvido em solução salina a 0,9%) usado para emulsionar a substância que foi avaliada. Realizou-se as reações durante 30 min a 37 °C. Após resfriar as amostras (0,5 mL), centrifugou-se com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 g durante 10 min. Misturou-se uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aqueceu-se a 95 °C durante 30 min. Após resfriar, a absorvância das amostras foi medida num espectrofotómetro a 532 nm. Expressou-se os resultados como a percentagem de TBARS formado por AAPH sozinho (controle induzido). O ácido ascórbico é usado como controle positivo neste ensaio (AHMAD *et al.*, 2015).

*3.7.2 Atividade sequestrante contra o radical hidroxila*

A produção de radicais hidroxila foi quantificada pela reação de Fenton. Durante esta reação, o efeito *in vitro* de OEC contra a produção de •OH, produzido pela degradação oxidativa de 2-desoxirribose, foi determinada (LOPES *et al.*, 1999). O princípio do teste é o de quantificar o produto de degradação de 2- desoxirribose, malonaldeído (MDA), por sua condensação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, as reações foram iniciadas pela

adição de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4$ ) com concentração final de  $6 \text{ mmol.L}^{-1}$  para soluções contendo 2- desoxirribose  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  e tampão fosfato  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 7,2). As concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4, e  $7,2 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  de EOED foram adicionados ao sistema antes da adição de  $\text{Fe}^{2+}$  a fim de determinar a atividade *in vitro* OEC antioxidante contra a formação de radicais hidroxilo. As reações foram realizadas durante 15 min à temperatura ambiente, sendo interrompidas pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v), seguindo da adição de TBA (1% v/v em NaOH a  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). As soluções obtidas foram aquecidas em banho maria com água para 15 min em  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ . A absorvância foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos em equivalentes de MDA formado de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.7.3 Avaliação do potencial antioxidante do OEC na remoção de óxido nítrico

Neste ensaio, o óxido nítrico é gerado a partir da decomposição espontânea de tampão de fosfato de nitroprussiato de sódio  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 7,4). Uma vez gerado, o  $\text{NO}\cdot$  interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidos usando a reação de Griess (TSIKAS, 2007). A mistura reacional (1 ml) contendo  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  de nitroprussiato de sódio (SNP) em tampão de fosfato e concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e  $7,2 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  do OEC, foram incubados a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1h.

Uma alíquota de 0,5 mL do OEC foi homogeneizada com 0,5 mL de reagente Griess. A absorvância do cromóforo formado foi registrado em 540nm. A medida em que é detectado a inibição do óxido nítrico gerado, realiza-se a comparação dos valores de absorvância dos controles negativos (só  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  prusside nitro sódio e preparações de ensaio). Os resultados foram expressos como percentagens de nitrito formado por SNP sozinho.

### 3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. dos valores de inibição e foram comparados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguido do Teste *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste ( $p < 0,05$ ) (Programa Graphpad Intuitive, Software for Science, San Diego, CA). O ácido ascórbico ( $140 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Utilizou-se como antioxidante padrão ácido ascórbico ( $140 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ )  $p < 0,05$  vs controle  $p < 0,05$  versus a AAPH (redução dos níveis de TBARS).

Utilizou-se ácido ascórbico ( $140 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como antioxidante padrão  $p < 0,05$  vs. controle (0,05% de Tween 80 dissolvido em 0,9% de solução salina)  $p < 0,05$  vs

atividade sequestrante contra o radical hidroxila (100% de radicais hidroxilo).

Utilizou-se ácido ascórbico ( $140\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como controle padrão  $p < 0,05$  versus controle (0,05% de Tween 80 dissolvido em 0,9% de solução salina) no ensaio de eliminação de óxido nítrico.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo químico

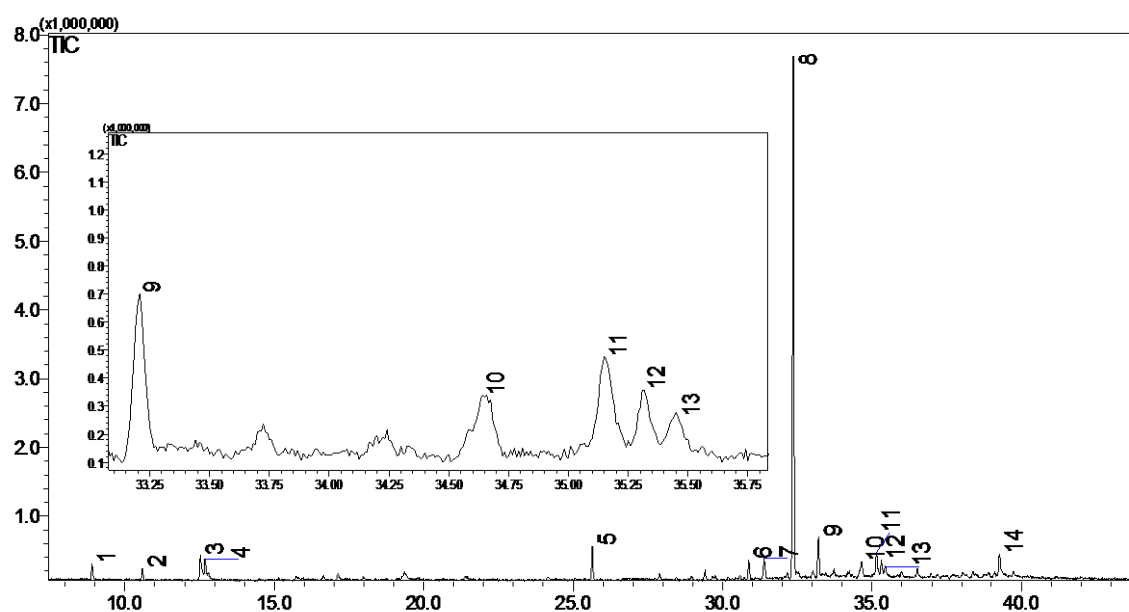
A partir da hidrodestilação das folhas de *E. dysenterica* obteve-se um óleo essencial amarelado (*in natura*), com um rendimento de  $1,45 \pm 1,48$  % (w/w), em relação ao peso seco do material de planta. Como mostrado na Tabela 1, foi possível identificar seis compostos (80,67% do total da composição) a saber: os sesquiterpenos (75,4%) foram a maioria (Figura 2, Tabela 1). O constituinte majoritário do OEC fora o óxido de cariofileno, com percentual de 66,4%. Os demais constituintes obtidos foram: isoledene (3,9%), 1,3,8- *p*-menthatriene (3,5%), mustakone (3,5%),  $\beta$ -felandreno (1,7%) e Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol (1,7%) (Figura 2 e 3).

Os índices de Kovats (IK= padrão de identificação de substância em cromatografia) (I.K) foram calculados com base nos tempos de retenção das substâncias e dos padrões de hidrocarbonetos que foram co-injetados juntamente com a amostra e serviram para confirmação das substâncias após análise dos espectros de massas verificando-se diferenças toleráveis entre a literatura e o valor calculado.

**Tabela 1.** Composição do óleo essencial a partir das folhas de *E. dysenterica*.

	Composto	RI <sup>um</sup>	RI <sup>b</sup>	Pico (%)
1	$\beta$ -felandreno	1030	1025	1,73 $\pm$ 0,10
3	1,3,8- <i>p</i> -Menthatriene	1112	1108	3,51 $\pm$ 0,11
5	Isoledene	1374	1374	3,91 $\pm$ 0,10
8	Óxido de cariofileno	1583	1582	66,37 $\pm$ 2,10
10	Selin-11-en-4-ol- $\alpha$	1659	1658	1,69 $\pm$ 0,07
11	Mustakone	1677	1676	3,46 $\pm$ 0,04
	Monoterpene			5,24
	Sesquiterpenos			75,43
	Total			80.67

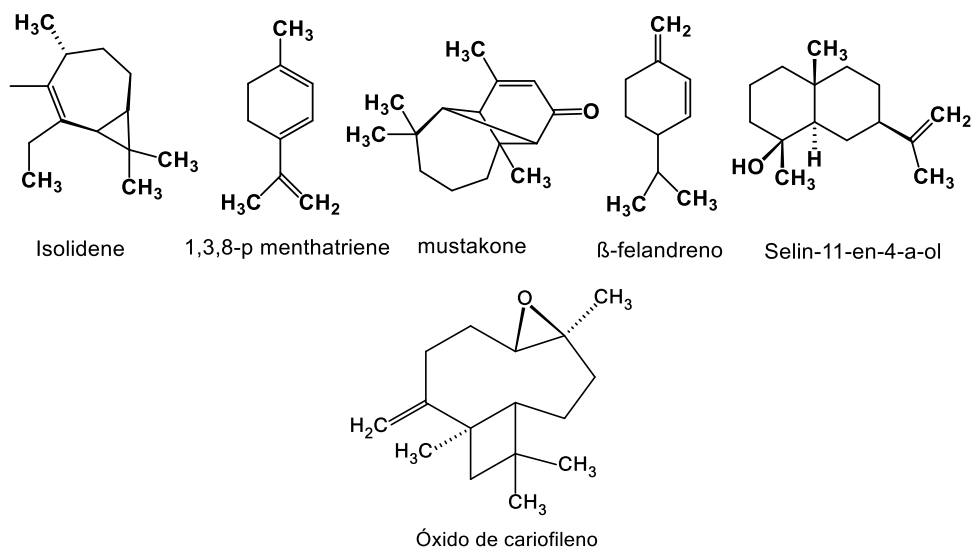
Os dados são expressos como média  $\pm$  DP de três determinações. RI<sup>um</sup> (cale.), Índices de retenção na coluna DB-5MS calculado de acordo com Van den dool e Kratz. RI retenção<sup>b</sup> índices de acordo com Adams.

**Figura 2 -** GC/EM do óleo essencial de *E. dysenterica*.

**Notação:** 1)  $\beta$ -felandreno, 3) 1,3,8-*p*-menthatriene 5) Isoledene, 8) Óxido de cariofileno, 10) Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol, 11) Mustakone, 2,4,6,7,9,12,13,14) Não indentificado.

Há registros na literatura de novos componentes diferentes do que foram encontrados em outras espécies de *E. dysenterica* coletadas em uma outra região do Brasil como relatado por Costa *et al.*, 2000 a saber:  $\beta$ -cariofileno (14,8%),  $\alpha$ -humuleno (10,9%)  $\alpha$ -terpineol (6,1%),

limoneno (5,5%),  $\alpha$ -tujene (5,6%), Além do principal constituinte óxido de cariofileno (66,37%),  $\beta$ -cariofileno foram relatados nos óleos essenciais de muitas outras espécies de *Eugenia* (superior a 20%), indicando que esta espécie é um membro típico da família Myrtaceae (Costa *et al.*, 2000). As substâncias isolidene (3,91%), 1,3,8-*p*-menthatriene (3,51%), mustakone (3,46%)  $\beta$ -felandreno (1,73%) e Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol (1,69%) foram identificados pela primeira vez como constituintes químicos de óleo essencial a partir de folhas de *E.dysenterica*.



**Figura 3** - Constituintes químicos da identificação CG/EM do óleo essencial de *Eugenia dysenterica*.

#### 4.2 Inibição da atividade da acetilcolinesterase

Os resultados qualitativos da inibição da enzima em cromatografia em camada delgada (CCD) sugeriu que o óxido de cariofileno e OEC inibiram a enzima, constatado que compostos a AChE apresentam hallos brancos visíveis no intervalo de 5 minutos na placa CCD (Figura 4), comparado com um padrão positivo (caféina)



Figura 4 – Placa de inibição qualitativa da *Eugenia dysenterica* frente à AChE  
P = cafeína; OE = Óleo essencial de Cagaita; OC = Óxido de Cariofileno

A atividade qualitativa anticolinesterásica do óleo essencial de folhas de *Eugenia dysenterica* foi avaliada pelo método descrito anteriormente sendo capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase com um valor de  $CI_{50} = 0,916 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (meios de experimentos independentes foram então expressos como médias com  $\pm$  SD. Para as análises estatísticas,  $p < 0,001$ , foi considerado como estatisticamente significativo), quando comparado com as espécies *Eucalyptus camaldulensis* ( $CI_{50} = 18,98 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), *Ocimum canum* ( $CI_{50} = 36,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e *Cistus salvifolius* ( $CI_{50} = 58,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com um valor promissora em comparação com o fármaco rivastigmina ( $CI_{50} = 1,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), inibidor convencional da AChE.

Em outro estudo, o óleo essencial de outra espécie de *Eugenia*, *Eugenia Sulcata*, apresentou monoterpenos conhecidos por sua atividade anticolinesterásica e como constituinte majoritário o  $\beta$ -cariofileno (24,6%), e obteve uma capacidade inibitória para a enzima AChE um valor de  $CI_{50}$  de  $4,66 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$  (LIMA, et al., 2012).

A diversidade estrutural dos terpenóides que exercem atividade inibitória da AChE dificulta a predição do potencial de relação estrutura-atividade. Mas sabe-se que algumas características, como a presença de um ligante hidrofóbico pode estar associadas a uma maior efetividade na inibição, já que o sítio ativo da AChE é conhecido por ser susceptível à interações hidrofóbicas. Os monoterpenos consistem de um esqueleto hidrocarboneto que podem ser cíclicos ( $\alpha$ -pineno) ou acíclicos (linalol), uma característica que também pode influenciar em sua atividade inibidora da AChE. Para os monoterpenóides bicíclicos com um esqueleto careno ou pinano, o potencial de inibição da AChE foi associado com a posição da dupla ligação (CONFORTI et al, 2007). A presença de olefinas terminais resultou em diminuição da inibição de AChE, assim como a presença de um grupo funcional oxigenado (MIYAZAWA e



YAMAFUJI, 2005). Além dos terpenóides, outros compostos, como as cumarinas, também mostraram exercer ação inibitória sobre a enzima AChE. (CONFORTI et al., 2007).

A atividade inibitória do óxido de cariofileno foi comparado com monoterpenos a saber: cubebene  $\alpha$ - e  $\beta$ -copaeno), com uma capacidade inibitória da enzima AChE um valor de  $CI_{50}= 4,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (LIMA et al., 2012), enquanto que o óxido de cariofileno apresentou um valor de  $CI_{50}= 0,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Promissores estudos demonstram as atividades analgésicas e anti-inflamatórias para o óxido de cariofileno, componente de óleo essencial de *E. dysenterica* (CHAVAN et al., 2010), estas atividades corroboram com ações importantes na doença de Alzheimer.

### 4.3 Ensaio antioxidantes

#### 4.3.1 Ensaio antioxidantes de espécies reativas com o ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

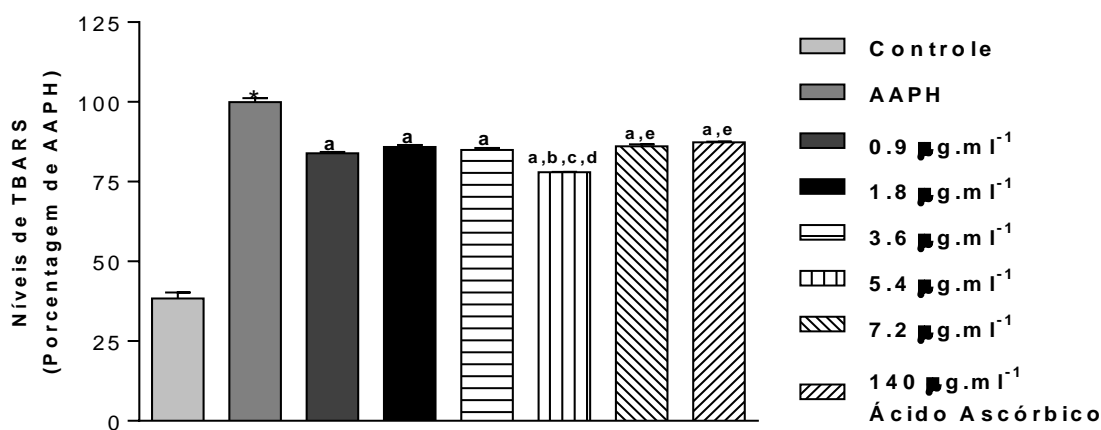
Para avaliar a atividade antioxidante do OEC, dois outros métodos utilizados são baseados na capacidade de uma substância de eliminar os radicais livres através de interação direta com uma substância de moléculas reativas, convertendo as espécies de radicais livres menos reativos e, portanto, mais estáveis (HOELZL et al., 2005). A gema de ovo homogeneizada como um substrato rico lipídico foi usada para determinar a atividade antioxidante do OEC (GUIMARÃES et al., 2010). O TBARS é um complexo formado por APPH (água-azo solúvel composto é usado como gerador de radicais livres) e ácido tiobarbitúrico reativa. Nestes ensaios, a partir dos métodos utilizados *in vitro*, demonstrou-se que OEC foi capaz de prevenir a produção de radicais livres e a peroxidação lipídica em todas as concentrações testadas 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , inibindo a quantidade de TBARS respectivamente em 16,07; 14,11; 15,02; 22,07 e 13,95%, respectivamente (Figura 5).

Resultados semelhantes foram obtidos com ácido ascórbico como antioxidante padrão obtendo-se 12,67% de inibição do TBARS formado. Nos nossos ensaios a concentração inibidora 50% ( $CI_{50}$ ) do óleo é de 1,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) com margem de variação na concentração de 0,3 eficaz para 5,8  $\text{mg.mL}^{-1}$  (com intervalo de confiança de 95%). Estes dados corroboram com resultados que obtemos diante da enzima AChE visto que sugerem que os radicais livres causam danos oxidativos a lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (UTTARA et al., 2009), aumentando a evidência do potencial neuroprotetor deste óleo essencial.

A doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência, caracterizado por uma progressiva neurodegeneração, mecanismos patogênicos, desencadeadas por acumulação do peptídeo  $\beta$ -amilóide e provoca o stress oxidativo, decorrente da desregulação da homeostase energética e envolvendo mitocôndrias e peroxissomos. Em fases patológicas graves, quando placas senis perturbar citoarquitetura cortical, capacidade antioxidante é gradualmente perdida (PORCELLOTTI *et al.* 2015). Desde danos oxidativos pode ser observada antes da formação de sinais patológicos específicos de  $\beta$ -amilóide (BEHL *et al.*, 1992).

Estudos sugerem que pequenas quantidades de antioxidantes ingeridas diariamente podem ter grande potencial terapêutico para algumas condições causadas por radicais livres, tais como artrite, doença de Alzheimer, doença cardíaca, envelhecimento, cancro, entre outros (HALLIWELL *et al.*, 1995).

Os antioxidantes podem ser utilizados como agentes neuroprotetores, por exemplo: aminas arilo e indoles-caroteno, licopeno polyenes- caroteno, licopeno, selênio retinol, flavonoides polifenóis, estilbenos, monofenóis hidroquinona: tocoferóis (vitamina E), 17-estradiol (estrogênio) e 5- hidroxitriptamina (Serotonina). A utilização de antioxidantes tem sido explorado na tentativa de retardar a progressão da degeneração neural da AD.



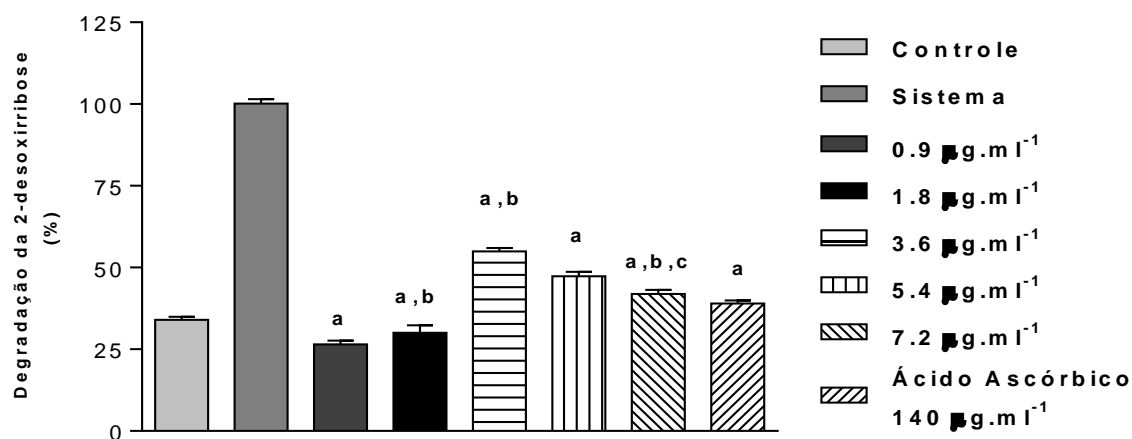
**Figura 5** - Capacidade antioxidante de óleo essencial *E. dysenterica* em diferentes concentrações pela redução dos níveis de TBARS.

#### 4.3.2 Atividade sequestrante contra o radical hidroxila

O radical  $\bullet\text{OH}$ , é o radical mais tóxico conhecido, uma vez que pode oxidar de forma não específica de todas as classes de macromoléculas biológicas incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos com taxas praticamente limitada de difusão (IMLAY *et al.*, 1988). Portanto, O  $\bullet\text{OH}$  pode resultar em danos oxidativos que dá origem a várias doenças, incluindo a artrite,

aterosclerose, cirrose, diabetes, câncer, doença de Alzheimer, enfisema e envelhecimento (OZYUREK *et al.*, 2008).

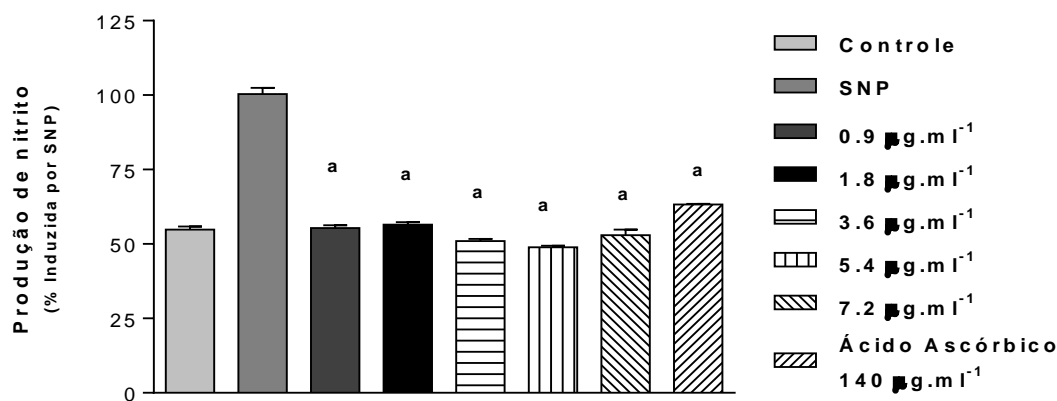
Após os testes antioxidantes, *in vitro*, com o OEC foi possível observar em todas as concentrações testadas 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a capacidade de remoção do radical hidroxila respectivamente em 73,46; 69,9; 45,09; 52,65 e 58,1% como mostra a figura 6, resultados semelhantes ao do ácido ascórbico que removeu 60,96% do radical hidroxila produzido. Foi estabelecido a  $\text{CI}_{50}$  de 5,814  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  contra a formação do radical hidroxila com uma margem de variação de 253 a 10,39 com um intervalo de confiança de 95%.



**Figura 6** - Capacidade antioxidante do OE de *Eugenia dysenterica* em diferentes concentrações na remoção de radicais hidroxila.

#### 4.3.3 Avaliação do potencial antioxidante na remoção de óxido nítrico

Nos estudos, *in vitro*, também foi possível determinar a concentração inibitória 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) da amostra de 0,1684  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  contra a formação do radical nitrito, com margem de variação na concentração efetiva de 0,06630 a 0,4276  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com 95% de intervalo de confiança, foi observado em todas as concentrações testadas 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a capacidade de remoção de nitrito em 44,62, 43,45, 48,97, 51,09 e 47,05% como mostra a figura 7, resultados semelhantes ao do ácido ascórbico que removeu 36,73%.



**Figura 7 -** A capacidade antioxidante de óleo essencial *E. dysenterica* em diferentes concentrações contra a formação do íon de nitrato.

Os antioxidantes compreendem uma família grande e heterogêneo de compostos que partilham a tarefa comum de interferir com (parar, retardar ou prevenir) a oxidação (ou a auto oxidação) de um substrato oxidável (SAVELEV *et al.*, 2003). Numerosos processos fisiológicos e bioquímicos no corpo humano, podem produzir oxigênio contendo radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio, como por produtos (CHAVAN *et al.*, 2010). A produção excessiva de tais radicais pode provocar danos oxidativo em biomoléculas, o que levou a muitas doenças, tais como a aterosclerose, cancro, diabetes, processos inflamatórios ou condições de dor (JEON *et al.*, 2011).

#### 4 CONCLUSÃO

Os principais constituintes do óleo essencial de *Eugenia dysenterica* DC. (Cagaiteira) foram: óxido de cariofileno (66,37%), isodene (3,91%), 1,3,8-*p*- menthatriene (3,51%), mustakone (3,46%) felandreno β- (1,73%) e Selin-11-en-4-α-ol (1,69%). O óxido de cariofileno puro (o composto majoritário) foi testado para avaliar seu potencial contra a inibição da AChE apresentando uma concentração inibitória de  $CI_{50} = 0,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sugerindo este composto como inibidor da AChE. Os efeitos de impedimento da lipoperoxidação através dos ensaios antioxidantes e os ensaios anticolinesterásicos do OEC estão sendo relatados pela primeira vez neste trabalho. O resultados obtidos são promissores, evidenciando necessidade de posterior de ensaios pré-clínicos *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, RP. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography Mass Spectrometry**. 4th ed. Carol Stream, Illinois - USA: Allured Publishing Corporation 2007.
- AHMAD, S.; ULLAH F.; AYAZ, M.; SADIQ, A.; IMRAN, M. Antioxidant and anticholinesterase investigations of *Rumex hastatus* D. Don: potential effectiveness in oxidative stress and neurological disorders. **Biological research**. 48: 20. 2015.
- BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Vitória: Edufes, 624 p., 2008.
- BARROSO, G. M.; GUMARÃES, E. F.; TICHASO, C. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L.; LIMA, H. C. **Sistema de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 377 p., 1984.
- BEHL, C.; DAVIE, J.; COLE, G.M.; SCHUBERT, D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid protein toxicity. *Biochem. Biophysical Research Commun.*; 186:944-950, 1992.
- BOSCARDIN, P. M. D.; FARAGO, P. V.; NAKASHIMA, T.; SANTOS, P. E. T.; PAULA, J. F. P. Estudo Anatômico e Prospecção Fitoquímica de Folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 94- 101, 2010.
- BUCKHOLTZ, N.S. (2011). Perspective: In search of biomarkers. **Nature**. 2011; 475: S8.
- CAMPELO, L.M.L.; A.A.C.; M.; SOUZA, G.F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M.; FREITAS, R. M. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-8, 2012.
- CAMPELO, L.M.L.; DE ALMEIDA, A.A.; FREITAS R.M.; CERQUEIRA G.S.; DE SOUSA G.F.; SALDANHA G.B.; FEITOSA C.M.; DE FREITAS R.M. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice". **J. Biomedicine Biotechnology** 2012: 1-8.
- CARDOSO L.M.; MARTINO H.S.D.; MOREIRA A.V.B.; RIBEIRO, S.M.R.; PINHEIRO-SANT'ANA H.M. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Res. Int.** 2011; 44(7): 2151-2154.
- CHAIYANA W.; OKONOGI S. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. **Phytomedicine**. 2012; 19(8–9):836–839.
- CHAVAN M.J.; WAKTE P.S.; SHINDE D.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine.**; 17 (2):149-151, 2010.

- CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F. *In vitro* Activities of *Citrus medica* L. vc. Diamante (Diamante citron) relevant to treatment of diabetes and Alzheimer's disease. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 427-433, 2007.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, codimentares e aromáticas**. 2 ed. Jaboticabal: FUNE, 162 p., 1994.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1262 p., 1981.
- CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Revista Floresta e Ambiente*, 11(1), p. 47-52, 2004
- DUARTE, Alessandra R. et al. Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia dysenterica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 21, n. 8, p.1459-1467, 2010.
- DUARTE, Alessandra R. et al. Genetic and environmental influence on essential oil 27 composition of *Eugenia dysenterica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 21, n. 8, p.1459-1467, 2010.
- ELLMAN. G.L.; COURTNEY D.K; ANDRES V.J.R.; FEATHERSTONE R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemistry Pharmacology**. 7 (2): 88-90, 1961;
- ENZ A.; AMSTUTZ R.; BODDEKE H.; GMELIN G.; MALANOWSKI J. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. **Prog Brain Res**. 98:431-438, 1993.
- ESTERBAUER H; CHEESEMAN K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**. 186:407-421. 1990.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólicos secundários. **Química Nova**, São Paulo, 30(2), p. 374-381, 2007.
- GUIMARÃES A.G.; OLIVEIRA G.F.; MELO M.S.; CAVALCANTI S.C.; ANTONIOLLI A.R.; BONJARDIM LR.; SILVA FA.; SANTOS JP.; ROCHA RF.; MOREIRA J.C.; ARAÚJO A.A.; GELAIN D.P.; QUINTANS-JÚNIOR L.J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 107(6):949-957, 2010.
- HALLIWELL B; AESCHBACH R; LÖLINGER J; ARUOMA OI. The characterization of antioxidants. **Food Chemical Toxicology**. Oxford. 33(7):601-617. 1995.
- HOELZL C; BICHLER J; FERK F; SIMIC T.; NERSESYAN A.; ELBLING L.; EHRLICH V.; CHAKRABORTY A.; KNASMÜLLER S. Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies. **J Physiology Pharmacology**. 2005; 56(2):.49-64.

HOUGHTON P.J.; HOWES M.J.R. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. **Pharmacology Biochemistry Behavioural**. 2003; 75:513-527.

IMLAY J.; LINN S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**. 1988; 240:1302-1309.

JEON S.; BOSE S.; HUR J.; JUN K.; KIM Y.K.; CHO K.S.; KOO B.S. A modified formulation of Chinese traditional medicine improves memory impairment and reduces Abeta level in the Tg- APP<sup>sw</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. **J. Ethnopharmacology**. 2011; 91:783-789.

KIENDREBEOGO M.; COULIBALY A.Y.; NEBIE R.C.H.; ZEBE B.; LAMIEN CE.; LAMIEN-MEDA A.; NACOULMAO.G. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from six medicinal plants from Burkina Faso. **Braz. J. Pharmacognosy**. 2011; 21(1): 2011- 2021.

KONRATH E.L.; PASSOS C.S.; KLEIN-JÚNIOR L.C.; HENRIQUES A.T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease **J. Pharm. Pharmacology**. 2013; 65:1701-1725

LAGO, João Henrique G. et al. Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) **Kausel. Molecules**, Brasil, v. 16, n. 12, p.9827-9837, 25 nov. 2011.

LIMA B.G.; TIETBOHL L.A.C.; FERNANDES C.P.; CRUZ R.A.S.; BOTAS G.S.; SANTOS M.G.; SILVA- FILHO MV.; ROCHA L. Chemical Composition of Essential oils and Anticholinesterasic Acticity of *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. **Latin American Journal of Pharmacy** (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense) 2012; 31 (1): 152-155.

LOIZZO M.R.; JEMIA M.B.; SENATORE F.; BRUNO M.; MENICHINI F.; TUNDIS R. Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *cistus* species essential oils. **Food chem toxicology**. 2013; 59: 586- 594.

LOPES G.K.B; SCHULMAN H.M.; LIMA M.H. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochim. Biophys. Acta - General Subjects**. 1999; 1472 (1-2):.142-152.

MALINOWSKI, L. R. L.; NAKASHIMA, T.; ALQUINI, Y. Caracterização morfoanatômica das folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *bicostata* (Maiden et al.) J.B. Kirkpat. (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, 28(5), p. 756- 761, 2009.

MARCHIORI, J. N. C.; SOBRAL, M. Dendrologia das Angiospermas. Myrtales. Santa Maria: Ed. da UFSM, 304 p. 1997.

MERWE, M. M. van der; WYK, A. E. van; BOTHA, A. M. Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern African taxa. **Plant Systematics and Evolution**, 251, p. 21–34, 2005.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1500 p., 1950.

MIRANDA, C.A.S.F. Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de diversas plantas. Dissertação [Mestrado em Agroquímica]. Lavras: Universidade Federal de Lavras/UFLA; 151 p. 2010.

MIRANDA, Cíntia Alvarenga Santos Fraga de. Atividade antioxidante de óleos essenciais de diversas plantas. 2010. 152 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de 29 Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 2010.

MIYAZAWA, M.; YAMAFUJI, C. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1765-1765, 2005.

MUKHERJEE P.K.; KUMAR V.; MAL M., HOUGHTON P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine** 2007; 14: 289–300.

OGA M; FONSECA C.E.L. A fast method to estimate leaf area in cagaiteira seedlings (*Eugenia dysenterica* D.C.). **Braz. Agri. Rese. Brasília**. 1994; 29(4):571-577.

OLIVEIRA M.E.S.; PANTOJA L.; DUARTE W.F.; COLLELA C.F.; VALARELLI LT.; SCHWAN R.; DIAS DR. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. **Food Research International**. 2011; 44(7): 2391–2400.

OLIVEIRA, F. Aspectos da vegetação arbórea encontrada na orla da Praia da Alegria no município de Guaíba, RS, Brasil. **Caderno de Pesquisa, série Biológica**, 19, p. 6-17, 2007.

OLIVEIRA, Verena B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**. Brasil, p. 170-179. 2012

OZYUREK M.; BEKTASOGLU B; GUCLU K; APAK R Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and avonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. **Anal. Chim. Acta**, Istanbul, Turkey 2008; 16(2):196–206.

PEREIRA, M.C., STEFFENS, R.S., JABLONSKI, A., HERTZ, P.F., RIOS, O., VIZZOTTO, M., et al. Characterization and antioxidant potential of brazilian fruits from the *Myrtaceae* family. **Joural Agriculture Food Chemistry**. 60(12):3061-3067, 2012.

PORCELLOTTI, S.; FANELLI, F.; FRACASSI, A., SEPE, S.; CECCONI, F.; BERNARDI, C.; CIMINI, A.M.; PAOLA, M.C.; MORENO, S. Oxidative Stress during the Progression of  $\beta$ -Amyloid Pathology in the Neocortex of the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2015 (2015), Article ID 967203, p. 18

PRADO, Ligia Carolina da Silva et al. The Gastroprotective Effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) Leaf Extract: The Possible Role of Condensed Tannins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Brasil, 37(5), p.722-730, 2014.



RECORD, S. J.; HESS, R.W. Timbers of the New World. **New Haven: Yale University Press**, 640 p., 1949.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS / Editora UFSC, p. 43-74, 2003

RHEE IK.; VAN DE MEENT M.; INGKANINAN K.; VERPOORTE R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal Chromatography**. A. 2001; 915(1-2):217-223.

RIBEIRO, Ediane Maria Gomes et al. An Overview on Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) Macro and Micro Components and a Technological Approach. **Food Industry, Brasil**, p.3-22, 2013.

RIZZINI C. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). **Braz. J.Biol.** 1970; 30(3): 381-402.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 327 p., 1997.

RODRIGUES, V.E.G., CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região de Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 2007;9(2):17-35.

ROMAGNOLO, M. B.; Sousa, M. C. O. Gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, 20(3), 2006.

ROMAGNOLO, M.B., SOUZA, M.C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 20(3):529-548, 2006.

SÁ, C. G.; CARDOSO, K. M. F.; FREITAS, R. M.; FEITOSA, C. M. Efeito do tratamento agudo do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck na aquisição da memória espacial de ratos avaliada no labirinto aquático de Morris. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 2, n. 33, p. 211-215, 2012.

SAVELEV S.; OKELLO E.; PERRY N.S.L.; WILKIN RM.; PERRY E.K. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacology Biochemistry Behavior**. 2003; 75(3):661-668.

SENNA, L. M.; SOUZA, G. R.; BIZZO, H. R.; MOREIRA, D. D. L. Composição volátil das folhas de *Eugenia racemulosa* O. Berg. (Myrtaceae). **Revista Brasileira Farmácia**., 92(2), p 51-54, 2011.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, p. 38-43, 2000.

SIDDIQUI M.F.; LEVEY A.I. Cholinergic Therapies in Alzheimer's disease. **Drugs Future**. 1999; 24 (4):417-444.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao remédio**. Porto Alegre/Florianópolis: EDUFSC, p. 1102, 2003.

SIMÕES, M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da Universidade UFSC. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis, 2000.

SIQUEIRA, H. F. ; SOUZA, L. F. ; AMARAL, E. V. E. J. ; SOUZA JUNIOR, V. Q. . A família Myrtaceae no Brasil. In: 64o Congresso Nacional de Botânica, 2013, Belo Horizonte. Anais 64o Congresso Nacional de Botânica, 2013.

SOUZA, J. A. DE; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. DA; FERRI, J.; SOARES, G. C. Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação in vitro de pitangueira (*Eugenia uniflora L.*). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, 2007

SOUZA, T.M., SEVERI, J.A., SILVA, V.Y.A., SANTOS, E., PIETRO, R.C.L.R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica e Apl.**;28(2):221-226, 2007.

TSIKAS D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research **Journal Chromatographic** 2007; B. 851 (1-2): 51-70.

UTTARA B. SINGH A.V.; ZAMBONI P.; MAHAJAN R.T. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Curr Neuropharmacology** 2009; 7:65-74

VAN DEN DOOL H; KRATZ PD. A Generalization of the Retention Index System including Linear Temperature Programmed Gas—Liquid Partition Chromatography. **J. Chromatogra** 1963; 11 :463-471.

VICTORIA, Francine Novack et al. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora L.* leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience Letters**, Brasil, v. 544, p.105-109, jun. 2013.

VILELA, Eliane C. et al. Spatial structure of *Eugenia dysenterica* based on essential oil chemovariations and implications for conservation and management of the genetic diversity of its populations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, 23(10), p.1776-1782, 2012.

# CAPÍTULO III

**Revisão da literatura: *Annona crassiflora* Mart. (Araticum)**

Artigo submetido na revista [Revista brasileira de plantas medicinais](#)

Valéria Lima Silva, Cassio Herbert Santos de Melo, Felipe Pereira Sousa e Chistiane Mendes  
Feitosa

***Annona crassiflora* Mart. (Araticum) – revisão da literatura**

**RESUMO**

O objetivo deste estudo foi realizar o “estudo do estado da arte” sobre a espécie *Annona crassiflora* Mart., com ênfase nas pesquisas sobre as propriedades farmacológicas desta planta. Foi realizada uma revisão literária com a expressão *Annona crassiflora* nas bases de dados Science Direct, Pubmed e no portal de periódicos da CAPES. Na literatura pesquisada foram encontrados estudos com as atividades para *A. crassiflora*, a saber: antioxidante, moluscicida, larvicida e ninficida, inseticida, citotóxica, genotóxica e carcinogênica, antiprotozoária, antibacteriana e contra plantas daninhas. As atividades de *A. crassiflora* apresentadas neste estudo sugerem pesquisas para a aplicação de extratos e produtos isolados desta espécie nos setores farmacêutico, agrícola e nutricional.

Palavras-chave: Annonaceae, *Annona crassiflora*, Plantas medicinais, Atividades farmacológicas

Valéria Lima Silva, Cassio Herbert Santos de Melo, Felipe Pereira Sousa e Chistiane Mendes  
Feitosa

***Annona crassiflora* Mart. (Araticum) – literature review**

**ABSTRACT**

The aim of this “sState of the art” study on the species *Annona crassiflora* Mart. with an emphasis on research into the pharmacological properties. A search was made with the expression *Annona crassiflora* in databases, Pubmed, Science Direct and portal of periodicos CAPES. In literature found studies with the activities for *A. crassiflora*, namely: antioxidant, molluscicidal, larvicidal and ninficidal, insecticide, cytotoxic, genotoxic and carcinogenic, antiprotozoal, antibacterial and against weeds. The activities of *A. crassiflora* presented in this study suggest searches for applying extracts and isolated products of this species in the pharmaceutical, agricultural and nutritional industry.

Keywords: Annonaceae, *Annona crassiflora*, Medicinal plants, Pharmacological activities

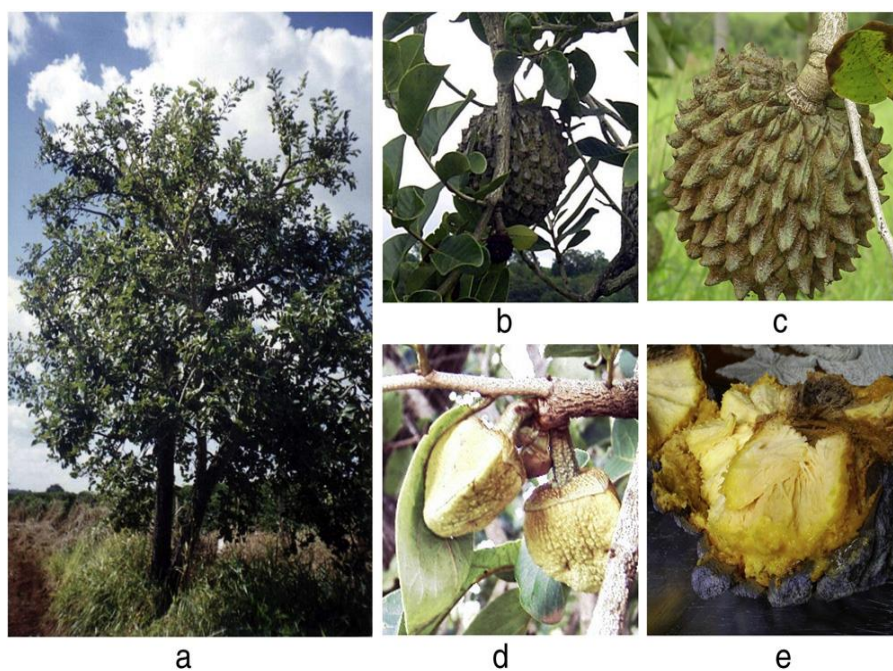
## 1 INTRODUÇÃO

*Annonaceae* é uma das famílias mais predominantes em áreas de cerrado do território brasileiro, esta família é formada por cerca de 120 gêneros e 2300 espécies, que são distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (EGYDIO *et al.*, 2013; EGYDIO, VALVASSOURA & SANTOS, 2013). *Annona* é o maior gênero com, aproximadamente, 120 espécies (EGYDIO *et al.*, 2013). No Brasil existem 33 gêneros e cerca de 250 espécies, incluindo selvagens e cultivadas, muitas das quais têm frutos de alta qualidade, especialmente aquelas pertencentes ao gênero *Annona* (PIMENTA *et al.*, 2013).

*Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) (Figura 1) é uma árvore nativa do cerrado brasileiro, amplamente difundida em todo o bioma e produz frutos que são conhecidos como 'araticum', 'marolo' ou 'pinha-do-cerrado'. Esta espécie é encontrada nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Tocantins (DAMIANIL *et al.*, 2013; CORREA *et al.*, 2013; VILLELA, BATISTA & VILLELA, 2013; LOPES *et al.*, 2012). É uma planta arbórea, que pode atingir até 8 m de altura (PIMENTA *et al.*, 2013; BRAGA FILHO *et al.*, 2009); o tronco sinuoso, de 20 a 30 cm de diâmetro, é coberto com uma casca muito espessa e áspera, que proporciona resistência à ação do fogo (PIMENTA *et al.*, 2013). As folhas são alternadas e sem estípulas e as flores são isoladas, axilares, com três sépalas, seis pétalas e numerosos estames e carpelos (PIMENTA *et al.*, 2013); os ramos jovens com flores e folhas apresentam densa pilosidade marrom-avermelhada e órgãos reprodutivos glabrescentes com a idade (BRAGA FILHO *et al.*, 2009). As sementes de *A. crassiflora* exibem dormência prolongada, apresentando demorada germinação (RIBEIRO *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2007).

Os frutos de *A. crassiflora* são desuniformes, com grandes variações de massa, forma e volume. A massa média é cerca de um quilo podendo variar de 0,5 a 5 kg; possuem grande número de sementes, por volta de 100, o que representa cerca de 15% da massa total do fruto. A casca do fruto, antes da maturação, é verde e, quando maduro, tende a uma cor marrom; o fruto é sincárpico e, em condições naturais, a frutificação ocorre entre os meses de fevereiro e março. Em relação à qualidade da polpa, existem dois tipos de fruto: a polpa cor de rosa, mais suave e mais doce e a polpa amarelada, mais áspera e mais ácida (Filho *et al.*, 2014; Damianil *et al.*, 2013; Silva, Boas & Andreia, 2013; Villela, Batista & Villela, 2013). A polpa é consumida fresca ou processada em preparações como sucos, sorvetes, geléias, compotas, licores e doces (Pimenta *et al.*, 2013; Corrêa *et al.*, 2011; Braga Filho *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2007). Os nutrientes encontrados nos frutos de *A. crassiflora* incluem vitaminas do complexo B, como tiamina e riboflavina, ácido ascórbico e carotenóides (Corrêa *et al.*, 2011); são

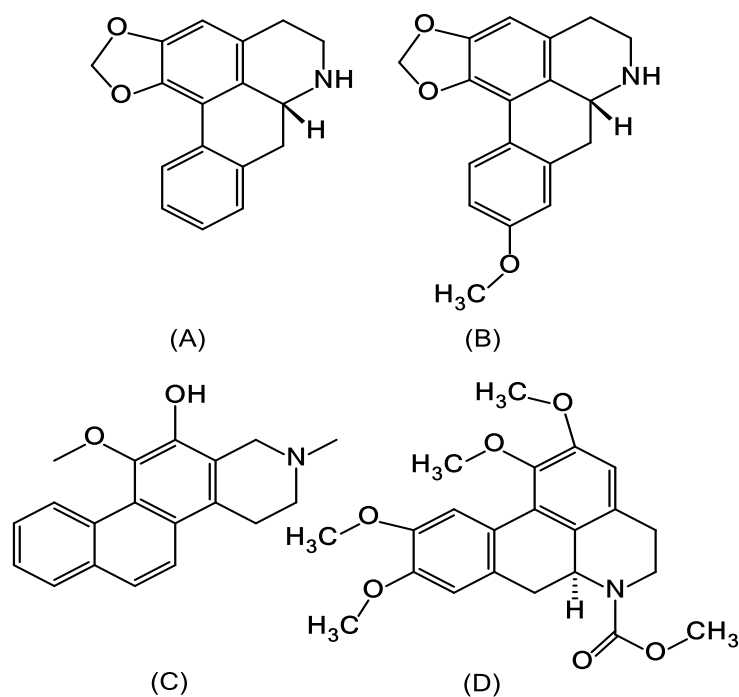
considerados uma boa fonte de vitaminas A e E, fibras, compostos antioxidantes (Silva, Boas & Andreia, 2013), hidratos de carbono, proteínas, lipídios, cálcio, fósforo, ferro e magnésio. Os ácidos orgânicos predominantes são o ácido málico e o ácido cítrico (Damianil *et al.*, 2013). Arginina, histidina, lisina e ornitina são, também, compostos importantes presentes em *A. crassiflora* (Egydio *et al.*, 2013).



Fonte: Corrêa *et al* (2011).

**Figura 1** - *Annona crassiflora*: (a) árvore, (b) galho com fruto, (c) fruto, (d) flores, (e) fruto aberto.

Na medicina popular, as sementes de *A. crassiflora* são tradicionalmente usadas contra picadas de cobra. Também há relatos de usos de *A. crassiflora* como antidiarreico, contra reumatismo e sífilis (Villela, Batista & Villela, 2013; Silva *et al.*, 2007; Pimenta *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 1996). Essas propriedades levaram a pesquisas fitoquímicas sobre a espécie, que apresenta como principais ingredientes químicos e bioativos os alcalóides anonaine (Figura 2A), xilopina (Figura 2B), anoretina (Figura 2C) e romucosina (Figura 2D), presentes nas folhas; além do policetídeo bis-tetra-hidro-furano, acetogeninas e flavonoides (Lage *et al*, 2014). Essas substâncias possuem várias propriedades biológicas, o que justifica os estudos feitos com extratos, óleo essencial e compostos isolados de várias partes de araticunzeiro e, nessas pesquisas, encontraram-se efeitos citotóxicos, pesticidas, antimicrobianos, antiparasitários (Pimenta *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 1996), inseticida (Pimenta *et al.*, 2013), sobre a atividade das enzimas hepáticas em modelos animais (Roesler, 2011) e atividades antifúngica e antioxidante (Silva *et al.*, 2007).



Fonte: Egydio *et al* (2012).

**Figura 2.** Alcaloides das folhas de *Annona crassiflora*.

Pesquisas apontam que devido ao desmatamento na savana brasileira, *A. crassiflora* corre risco de extinção (Damianil *et al.*, 2013). Em áreas naturais do cerrado, o araticunzeiro vem sofrendo intensa ação antrópica (Braga Filho *et al.*, 2009), assim a ocupação agrícola do cerrado está impedindo a regeneração natural da espécie; dessa forma, ações precisam ser tomadas, para impedir que esta espécie se torne extinta (Silva *et al.*, 2007; Durigan *et al.*, 2002).

O objetivo deste estudo foi revisar a literatura sobre a espécie *A. crassiflora* com ênfase nas pesquisas sobre as suas propriedades farmacológicas e perspectivas no uso em futuras formulações farmacêuticas

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A revisão científica foi desenvolvida de forma sistemática sobre as propriedades farmacológicas da espécie *A. crassiflora* com ênfase nas pesquisas sobre as propriedades farmacológicas desta planta.

A revisão científica foi desenvolvida pela busca nos bancos de dados eletrônicos acerca de publicações em inglês e português no intervalo de 2005- 2016 sobre a utilização as suas propriedades farmacológicas e perspectivas no uso em futuras formulações farmacêuticas.



O levantamento bibliográfico foi realizado nas bases de dados: Pubmed; ScienceDirect, Scielo, e no portal de periódicos da CAPES utilizando como descritores os termos: *A. crassiflora* no mês de Fevereiro de 2016. Obteve-se um total de 304 artigos, foram excluídos estudos que não se encaixavam no tema e com data de publicação fora do período estipulado, restaram então, 55 artigos para a revisão.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na literatura pesquisada foram encontrados, para a espécie *A. crassiflora*, estudos sobre as atividades antioxidantes, moluscicida, larvicida e ninficida, inseticida, citotóxica, genotóxica e carcinogênica, antiprotozoária, antibacteriana e contra plantas daninhas (Tabela 1).

**Tabela 1** - Propriedades farmacológicas estudadas em *Annona crassiflora* Mart.

Propriedades avaliadas	Referências
Antioxidante	Debora & Jorge, 2013 Souza <i>et al</i> , 2012 Roesler <i>et al</i> , 2007 Roesler <i>et al</i> , 2006
Moluscicida	Bezerra <i>et al</i> , 2002 Santos & Sant'Ana, 2001
Larvicida	Machado <i>et al.</i> , (2015) Omena <i>et al</i> , 2007 Rodrigues <i>et al</i> , 2006
Ninficida	Krinski & Massaroli, 2014
Inseticida Inseticida	Zoubiri & Baaliouamer, 2011 Silva <i>et al</i> , 2009
Citotóxica, genotóxica e carcinogênica	Formagio <i>et al.</i> , (2015) Rocha <i>et al.</i> , 2015 Venâncio <i>et al</i> , 2013 Vilar, Ferri & Chen-Chen, 2011 Dragano <i>et al</i> , 2010 Roesler, Lorencini & Pastore, 2010 Mesquita <i>et al</i> , 2009 Vilar <i>et al</i> , 2008
Propriedades avaliadas	Referências
Antiprotozoária	Pimenta <i>et al</i> , 2014 Tiuman <i>et al</i> , 2011 Mesquita <i>et al</i> , 2007 Mesquita <i>et al</i> , 2005

	Tempone <i>et al</i> , 2005
Antiviral	Cecílio <i>et al</i> , 2012
Antibacteriana	Takahashi <i>et al</i> , 2006
Contra plantas daninhas	Inoue <i>et al</i> , 2010 Inoue <i>et al</i> , 2010

### 3.1 Atividade antioxidante

Em estudos realizados por Debora & Jorge (2013), foi comprovada a atividade antioxidante da fração lipídica das sementes de *A. crassiflora* composta por fitosteróis, tais como campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol; tocoferóis alfa, beta, gama e delta; além de ácidos graxos. A atividade antioxidante da fração lipídica foi significativa, porém quando testadas separadamente as frações de fitosteróis, tocoferóis e ácidos graxos, apenas os fitosteróis apresentaram correlação positiva com 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e estabilidade oxidativa, sugerindo que são os fitosteróis os componentes químicos com maior atividade antioxidante da fração lipídica das sementes de *A. crassiflora*.

Souza *et al* (2012) estudaram as quantidades de proteínas, lipídios, carboidratos, fibras, polifenóis, ácido ascórbico e de minerais (P, K, Ca, Mg e Fe) além do potencial antioxidante 2,2'-azinobis (3-ethylbenzotiazoline-6-ácido sulfônico) (ABTS) da polpa do marolo e de outras frutas do cerrado brasileiro. Esses autores constataram que o marolo apresentou os mais altos níveis de fenóis entre as frutas estudadas, quantidade de vitamina C equivalente a laranjas da Austrália e licopenos compatíveis a quantidades encontradas em tomates. O potencial antioxidante do marolo também foi o mais alto em comparação com as outras frutas, tal achado pode ser atribuído às maiores taxas de fenóis e de ácido ascórbico, uma vez que as frutas que apresentaram maiores quantidades desses constituintes foram, também, as que apresentaram maiores atividades antioxidantes.

Roesler *et al* (2007) caracterizaram os principais componentes do extrato liofilizado da polpa, casca e sementes de araticum por espectrometria de massas de ionização por eletrospray (ESIMS) e avaliaram a atividade antioxidante DPPH e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de cada um dos extratos; os resultados mostraram a presença de compostos com excelente atividade antioxidante nos extratos da casca e da semente, sendo que este apresentou a maior atividade antioxidante em comparação com os extratos da casca e da polpa. Em outros estudos, Roesler *et al* (2006) e Roesler *et al* (2007) avaliaram o potencial em sequestrar radicais

livres (DPPH) e quantificaram o total de compostos fenólicos em extratos aquosos e etanólicos da polpa, semente e casca de araticum e encontraram que o extrato etanólico da semente e da casca apresentaram os melhores potenciais antioxidantes, corroborando com o estudo dos mesmos autores, citado anteriormente.

### 3.2 Atividade Moluscicida

Estudos realizados por Santos & Sant'Ana (2001) testaram a atividade de extratos etanólicos da raiz, caule, casca do fruto, polpa e sementes de *A. crassiflora* contra os ovos ou moluscos adultos da espécie *Biomphalaria glabrata*; os resultados apontaram que os extratos possuem atividade letal contra o molusco e ovos do molusco. Outro estudo sobre atividade moluscicida, também contra *Biomphalaria glabrata*, foi feito por Bezerra *et al* (2002), os pesquisadores usaram o extrato etanólico das folhas de araticunzeiro o qual não apresentou letalidade para os moluscos; o extrato era composto por flavonóides e taninos condensados, isso leva a crer que esses constituintes não possuem propriedade moluscicida e, reportando ao estudo de Santos & Sant'Ana (2001), provavelmente, o índice de mortalidade causado pelos extratos testados deveu-se à presença de outros compostos químicos.

### 3.3 Atividades Larvicida e Ninficida

Rodrigues *et al* (2006) verificaram a atividade dos extratos hexânico e etanólico das folhas, caule, casca do caule, raiz e casca da raiz de *A. crassiflora* contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*; os resultados apontaram que todos os extratos apresentaram atividade larvicida significativa. Omena *et al* (2007) também testaram a atividade contra larvas do mosquito da dengue e verificaram que os extratos etanólicos das raízes, cascas das raízes, caule, cascas dos frutos, polpa e sementes de *A. crassiflora* possuem atividade larvicida para larvas de *Aedes aegypti* e que o extrato da casca da raiz é o que possui a melhor atividade com uma concentração letal capaz de matar 50% da população de larvas de 0,71  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Machado *et al* (2015) avaliaram a atividade *in vitro* dos extratos de *A. crassiflora* em nematóide *Caenorhabditis elegans* no tempo de paralisia após a exposição aos extratos hidroalcoólicos, para identificar e metabolitos de *A. crassiflora* com propriedades nematicidas. Os resultados apontaram os extratos hidroalcoólico apresentaram atividade no teste de mobilidade, a partir deste resultado, o extrato foi sujeito particionar-se com aquoso, etanólico, metanólico, diclorometano e água, que foram submetidos à avaliação biológica e perfil

metabólico com o isolamento de substâncias que pode ser de grande valor para o desenvolvimento de novos produtos para controle de nematoides.

Além dos efeitos contra larvas de certos organismos, também há relatos de estudos sobre o efeito de extratos de *A. crassiflora* sobre as ninfas de certos artrópodes; Krinski & Massaroli (2014) estudaram esse efeito em *Tibraca limbativentris*, um percevejo que ataca plantações de arroz. Nesse estudo foi usado o extrato clorofórmio-metanólico das sementes de *A. crassiflora* em diferentes concentrações e verificou-se toxicidade intermediária na mortalidade de ninfas do percevejo-do-colmo do arroz.

### 3.4 Atividade Inseticida

Silva *et al* (2009) estudaram a atividade dos extratos hexânico e etanólico das folhas, cascas do caule e caule e dos extratos etanólicos das cascas das raízes e das raízes de *A. crassiflora* contra a enzima  $\alpha$ -amilase dos insetos *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus* e constataram que os extratos das folhas apresentaram inibição superior a 60% sobre a enzima  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus*; ainda sobre o efeito inseticida, Zoubiri & Baaliouamer (2011) revisaram a literatura sobre a atividade inseticida do óleo essencial de 230 espécies vegetais e encontraram no estudo de Mendonça *et al* (2005) que o óleo essencial de *A. crassiflora* possui efeito inseticida.

### 3.5 Atividades citotóxicas, genotóxicas e carcinogênicas

Vilar *et al* (2008) estudaram os efeitos mutagênicos, antimutagênicos e citotóxicos do extrato etanólico das folhas de araticunzeiro pelo teste de micronúcleo em camundongos; o extrato não apresentou efeitos mutagênicos significativos, mas apresentou significativo efeito antimutagênico e evidente atividade citotóxica nas doses de 50, 100 e 160 mg kg<sup>-1</sup> até 24 e 48 horas após a exposição; esse efeito pode ser atribuído à presença de acetogeninas, as quais possuem conhecida atividade citotóxica. Mesquita *et al* (2009) investigaram o potencial citotóxico do extrato etanólico das raízes e das cascas das raízes de *A. crassiflora* em linhagens de células tumorais para carcinoma de cólon humano (HCT-8), melanoma (MDA-MB-435), câncer cerebral (SF-295) e leucemia (HL-60); os resultados foram obtidos pelo teste azul de tiazolil – MTT e ambos os extratos apresentaram significativa atividade citotóxica para todas as linhagens de células testadas. Roesler, Lorencini & Pastore (2010) avaliaram a citotoxicidade

dos extratos etanólicos da casca e das sementes de araticum usando o método *in vitro* de Neutral Red Uptake-NRU; esse estudo mostrou que o extrato da casca não apresentou nenhum potencial citotóxico e o extrato das sementes apresentou baixo potencial citotóxico com DL<sub>50</sub> de 831,6 mg.kg<sup>-1</sup>.

Rocha *et al* (2015) utilizaram extrato metanólico das folhas em sementes *Allium cepa* submetido a diferentes tratamentos e protocolos para avaliar a mutagenicidade e antimutagenicidade do tratamento. O teste de *Allium cepa* mostrou que a extrato metanólico não é mutagênico e exibe uma atividade significativa antimutagenica. As percentagens de redução de danos obtidos com concentrações de 5, 10, e 15 mg / L foram 66,17, 75,75, e 69,19% para o pré-tratamento, 72,72, 33,33, e 22,22% para o simples tratamento simultâneo, 100,50, 93,93, e 102,52% para o tratamento simultâneo com a pré-incubação, 89,39, 79,79, e 84,34% para o pós-tratamento, e 86,36, 81,31 e 93,43% para o tratamento contínuo demonstrando que o extrato de *A. crassiflora* exibe quimioprevenção importante e atividades antimutagênicas também quando sistemicamente administrado.

Atividade genotóxica de *A. crassiflora* foi estudada por Dragano *et al* (2010); Vilar, Ferri & Chen-Chen (2011); estes realizaram teste de indução lisogênica e teste de mutagenicidade para o extrato etanólico das folhas e aqueles realizaram teste de micronúcleo em modelos *in vivo* que se alimentaram de dieta enriquecida com polpa de marolo; ambos os estudos não apresentaram genotoxicidade pelas técnicas utilizadas, porém foi verificado um perfil citotóxico.

Venâncio *et al* (2013) investigaram os efeitos da ingestão da polpa de marolo sobre a proliferação de células do cólon e no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas por meio de focos de criptas aberrantes (ACF) em ratos Wistar; os animais foram alimentados com ração comercial ou com dieta suplementada com polpa de marolo; foi usado dicloridrato de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) como indutor da carcinogênese de cólon; foram feitos testes bioquímicos e imunohistoquímicos com amostras de sangue, fígado e cólon; os resultados mostraram que a ingestão do fruto não exerceu efeito protetor contra a carcinogênese induzida pela DMH e não apresentou efeitos mutagênicos ou carcinogênicos pelos métodos avaliados.

Formagio *et al.*, (2015) investigaram a atividade antiproliferativas de 11 extratos de Annonaceae nas quais foram avaliadas em 10 linhagens de células de câncer, a saber: UA251 (glioma); UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); NCI-H460 (pulmão); 786-0 (renal); HT-29 (cólon); NCI-ADR / RES (ovário expressando o fenótipo de resistência a múltiplas drogas); OVCAR-3 (ovário); K562 (leucemia); VERO (células normais de rim de macaco) com a doxorrubicina como droga quimioterapêutica, controle positivo. O extrato metanólico das

folhas e sementes de *A. crassiflora* demonstraram potente atividade antitumoral contra as 10 linhagens de células tumorais que pode inibir a proliferação de células tumorais do câncer.

### 3.6 Atividade antiprotozoária

Mesquita *et al* (2005) avaliaram as atividades do extraído da casca das raízes de *A. crassiflora* contra *Leishmania donovani* e *Trypanossoma cruzi* e verificaram que o extrato teve atividade antileishmaniose e tripanocida significativa. Tempone *et al* (2005) estudaram os efeitos dos extratos etanólico bruto e alcaloidal contra *Leishmania chagasi* e *Trypanossoma cruzi*, os autores não citaram de qual parte de *A. crassiflora* foram preparados os extratos; mas o extrato alcaloidal mostrou efetiva atividade contra *L.chagasi* com valor de EC<sub>50</sub> de 24,89 µg.mL<sup>-1</sup> e o extrato bruto mostrou efeito contra *T. cruzi*. Tiunan *et al* (2011) revisaram a literatura sobre plantas com atividade contra leishmaniose e, a respeito de *A. crassiflora*, citaram somente o estudo de Tempone *et al* (2005) que apontou o extrato alcaloidal de *A. crassiflora* como efetivo contra *L. chagasi*.

Mesquita *et al* (2007) fizeram testes *in vitro* sobre a ação do extrato hexânico das cascas das raízes de *A. crassiflora* contra a resistência à cloroquina (FcB1) de *Plasmodium falciparum* e citotoxicidade contra linhagens celulares L-6 de ratos e MRC-5 de humanos; os resultados foram estatisticamente significativos. Pimenta *et al* (2014) também testaram a atividade antimalárica; esses autores verificaram a ação de frações das folhas de *A. crassiflora* enriquecidas de acetogeninas, alcalóides e flavonóides em camundongos infectados com *Plasmodium berghei*; os resultados mostraram que somente as frações ricas em alcalóides e flavonóides tiveram parasitemia significativa.

### 3.7 Atividade Antibacteriana

Takahashi *et al* (2006) estudaram a atividade bactericida de 16 extratos de oito plantas da família Annonaceae; foi verificado que o extrato de *A. crassiflora* apresentou atividade contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*.

### 3.8 Atividade contra plantas daninhas

O efeito de *A. crassiflora* Mart. contra algumas plantas daninhas foi pesquisado nos estudos de Inoue e colaboradores (2010). No primeiro estudo os autores avaliaram o efeito de extratos hidroetanólicos das sementes, das folhas e do caule de *A. crassiflora* sobre a germinação e o desenvolvimento das plantas daninhas *Brachiaria brizantha*, *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia* e encontraram o melhor resultado no extrato das sementes, o qual inibiu totalmente a germinação das sementes de *B. brizantha* e de *E. heterophylla*. No segundo estudo foram testadas substâncias isoladas do extrato de acetato de etila das sementes; as substâncias isoladas foram o estigmasterol glicosilado e o sitosterol glicosilado e verificaram que essas substâncias inibiram o desenvolvimento da espécie *E. heterophylla*.

## 4 CONCLUSÃO

A revisão da literatura é o processo de busca, análise e descrição de um corpo do conhecimento em busca de resposta a uma pergunta específica para base teórica para futuros estudos, as propriedades mais estudadas de *A. crassiflora* foram atividades antioxidantes e citotóxicas. Efeitos tóxicos foram encontrados em alguns estudos, o que alerta sobre o uso, indiscriminado, de partes da planta como remédios. Não foram encontrados estudos que tentassem comprovar alguns dos efeitos relatados pelo uso popular, tais como, picada de cobra, reumatismo e sífilis, no entanto as atividades de *A. crassiflora* apresentadas neste estudo sugerem pesquisas para a aplicação de extratos e produtos isolados desta espécie nos setores farmacêutico, agrícola e nutricional.

## REFERÊNCIAS

- BAGAVAN, A.; RAHUMAN, A.A.; KAUSHIK, N.K.; SAHAL, D. In vitro antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Res.** 108 (1): 15–22, 2011.
- BEZERRA, J.C.B.; SILVA I.A.; FERREIRA, H.D.; FERRI, PH; SANTOS, S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of brazilian cerrado medicinal plants. **Fitoterapia.** 73 (1): 428-430, 2002.
- BRAGA FILHO, J.R.; NAVES, R.V.; SANTOS, V.R.V.; *et al.* Fruit production and environment characterization of the occurrence of native plants of araticum the cerrado of Goias state. **Rev Bras Frutic.** 31 (2): 461-473, 2009.
- CARDOSO, L.M.; OLIVEIRA, D.S.; BEDETTI, S.; *et al.* Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) from the brazilian cerrado: chemical composition and bioactive compounds. **Fruits.** 68 (2): 121-134, 2013.
- CORRÊA, S.C.; CLERICI, M.T.P.S.; GARCIA, J.S.; FERREIRA, E.B.; EBERLIN, M.N.; AZEVEDO L. Evaluation of dehydrated marolo (*Annona crassiflora*) flour and carpels by freeze-drying and convective hot-air drying. **Food Res Int.** 44(7): 2385-2390, 2011.
- CORRÊA, S.C.; REZENDE, M.L.; FERREIRA, E.B.; *et al.* Marolo (*Annona crassiflora* Mart.): a study of value chain and processing. **Food Sci Technol.** 33 (2): 362-368, 2013.
- DAMIANIL, C.; SILVA, F.A.; LAGE, M.E.; *et al.* Stability of frozen marolo pulp during storage. **Food Sci Technol.** 33 (4): 713-721, 2013.
- DEBORA, M.M. & JORGE, L.N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Ind Crops Prod.** 42 (1): 231-235, 2013.
- DRAGANO, N.R.V.; VENANCIO, V.P.; PAULA, F.B.A.; LUCIA, F.D.; FONSECA, M.J.O.; AZEVEDO L. Influence of marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. **Plant Foods Hum Nutr.** 65 (1): 319-325, 2010.
- DURIGAN, G.; NISHIKAWA, D.L.L.; ROCHA, E.; *et al.* Characterization of two strata of cerrado vegetation at Brotas, SP, Brazil. **Acta Bot Brasilica.** 16 (3): 251-262, 2002.
- EGYDIO, A.P.M.; CATARINA, C.S.; FLOH, E.I.S.; SANTOS, D.Y.A.C. Free amino acid composition of *Annona* (Annonaceae) fruit species of economic interest. **Ind Crops Prod.** 45(1): 373-376, 2013.
- EGYDIO, A.P.M.; VALVASSOURA, T.A.; SANTOS, D.Y.A.C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. **Biochem. Syst. Ecol.** 46 (1): 145-151, 2013.



- FILHO, B.; ROCHA, J.; NAVES, R.V.; CHAVES, L.J.; *et al.* Physical and physical chemical characterization of araticum fruits (*Annona crassiflora* Mart.). **Bioscience Journal**. 30 (1): 16-24, 2014.
- FORMAGIO, A.S.N.; VIEIRA, M.C.; VOLOBUFF, C.R.F.; SILVA, MS.; MATOS, A.I.; CARDOSO, C.A.L.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO J.E. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** (2015) 48(4): 308-315.
- INOUE, M.H.; SANTANA, D.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; POSSAMAI, A.C.S.; SILVA, L.E.; PEREIRA, M.J.B.; PEREIRA, K.M. Allelopathic potential of *Annona crassiflora*: effects on weeds. **Planta Daninha**. 28 (3): 489-498, 2010.
- INOUE, M.H.; SANTANA, D.C.; VILHENA, K.S.S.; SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; POSSAMAI, A.C.S.; SILVA, L.E.; DALLACORT, R. Allelopathic potential of substances isolated from *Annona crassiflora* seeds. **Planta Daninha**. 28 (4): 735-741, 2010.
- KAMARAJ, C.; KAUSHIK, N.K.; MOHANAKRISHNAN, D.; ELANGO, G.; BAGAVAN, A.; ZAHIR, A.A.; RAHUMAN, A.A.; SAHAL, D. Antiplasmodial potential of medicinal plant extracts from Malaiyur and Javadhu hills of South India. **Parasitol Res**. 111 (1): 703–715, 2012.
- KRINSK, D. & MASSAROLI, A. Nymphicidal effect of vegetal extracts of *Annona mucosa* and *Annona crassiflora* (Magnoliales, Annonaceae) against rice stalk stink bug, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera, Pentatomidae). **Rev Bras Frutic**. 36 (1): 217-224, 2014.
- LAGE, G.A.; MEDEIROS, F.D.S.; FURTADO, W.D.L.; PIMENTA, L.P.S. *et al.* The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Nat Prod Res**. 28 (11): 808-811, 2014.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**. 21 (12): 2783-2813, 1980.
- LOPES, R.M.; SILVA, J.P.; VIEIRA, R.F.; *et al.* Composition of fat acids in pulp of native fruits from the brazilian savanna. **Rev Bras Frutic**. 34 (2): 635-640, 2012.
- MACHADO, A.R.T.; FERREIRA SR.; *et al.* Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasites & Vectors** 8:113, 2015.
- MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J.E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of brazilian cerrado plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 100(7): 783-787, 2005.
- MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. In vitro antiplasmodial activity of brazilian cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**. 110 (1): 165–170, 2007.
- MESQUITA, M.L.; PAULA, J.E.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.C.; RAPHAEL, GROUGNE,T.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L.S.

Cytotoxic activity of brazilian cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J Ethnopharmacol.** 123 (1): 439–445, 2009.

OMENA, M.C.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAULA, J.E.; LUNA, J.S.; LIMA, M.R.F.; SANT'ANA, A.E.G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some brazilian medicinal plants. **Bioresour. Technol.** 98 (1): 2549–2556, 2007.

PIMENTA AC.; REGO SS.; ZUFFELLATO-RIBAS KC.; *et al.* Morphological characterization of fruits, seeds and seedlings of araticum plant (*Annona crassiflora* Mart - Annonaceae). **Journal of Seed Science.** 35 (4): 524-531, 2013.

PIMENTA, L.P.; GARCIA, G.M.; GONÇALVES, S.G.; DIONÍSIO, B.L.; BRAGA, E.M.; MOSQUEIRA, V.C. In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Nat Prod Res.** 2014.

PIMENTA, L.P.S.; PINTO, G.B.; TAKAHASHI, J.A.; SILVA, L.G.F.; BOAVENTURA, M.A.D. Biological screening of Annonaceous brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Phytomedicine.** 10 (2): 209-212, 2003.

RIBEIRO, M.N.O.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; *et al.* In vitro seed germination and seedling development of *Annona crassiflora* Mart. **Sci Agric.** 66 (3): 410-413, 2009.

ROCHA, R.S.; KASSUYA, C.A.L.; *et al.* Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. **Pharm Biol**, Early Online: 1–13, 2015.

RODRIGUES, A.M.S.; PAULA, J.E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.F.; ESPÍNDOLA, L.S. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **J Am Mosq Control Assoc.** 22 (2): 314-317, 2006.

ROESLER, R.; CATHARINO, R.R.; MALTA, L.G.; EBERLIN, M.N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chem.** 104 (1): 1048–1054, 2007.

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 31 (1): 93-100, 2011.

ROESLER, R.; Lorencini M.; Pastore G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 30(3): 814-821, 2010.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 27(1): 53-60, 2007.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; PASTORE, G. Evaluation of the antioxidant properties of the brazilian cerrado fruit *Annona crassiflora* (araticum). **Journal of Food Science.** 71 (2): c102-c107, 2006.

SANTOS, A.F. & SANT'ANA, A.E.G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine.** 8 (2): 115–120, 2001.

SANTOS, D.Y.A.C & SALATINO, M.L.F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**. 55 (6): 567-573, 2000.

SANTOS, L.P.; BOAVENTURA, M.A.D.; SUN, N.J.; CASSADY, J.M.; OLIVEIRA, A.B. Araticulin, a *bis* tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Phytochemistry**. 42(3): 705-707, 1996.

SILVA, E.A.A.; MELO, D.L.B.; DAVIDE, A.C.; *et al.* Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Ann Bot**. 99 (5): 823-830, 2007.

SILVA, E.P.; BOAS, E.V.B.V.; ANDREIA, L.P.R.X. Characterization and development of marolo (*Annona crassiflora*, Mart.). **Food Science and Technology**. 33 (4): 666-675, 2013.

SILVA, E.M.; VALENCIA, A.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; ROCHA, T.L.; FREIRE, E., PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Inhibitory action of cerrado plants against mammalian and insect  $\alpha$ -amylases. **Pestic Biochem Physiol**. 95 (1): 141-146, 2009.

SOUZA, V.R.; PEREIRA, P.A.P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S.V.; CARNEIRO, J.D.S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of cerrado brazilian fruits. **Food Chem**. 134 (1): 381-386, 2012.

TAKAHASHI, J.A.; PEREIRA, C.R.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; SILVA, L.G.F.E. Antibacterial activity of eight brazilian Annonaceae plants. **Nat Prod Res**. 20 (1): 21-26, 2006.

TEMPONE, A.G.; TREIGER, B.S.E.; ANDRADE, J.R.H.F.; GUALDA, N.C.A.; YOGI, A.; CARVALHO, C.S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; D.C.H.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**. 12 (1): 382-390, 2005.

TIUMAN, T.S.; SANTOS, A.O.; NAKAMURA, T.U.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **Int J Infect Dis**. 15 (1): e525-e532, 2011.

VENÂNCIO, V.P.; FERREIRA, E.B.; BRIGAGÃO, M.R.P.L.; PAULA, F.B.A.; BARBISAN, L.F.; AZEVEDO, L. *Annona crassiflora* Mart. fruit pulp effects on biochemical parameters and rat colon carcinogenesis. **Ciênc.agrotec**. 37 (4): 343 - 349, 2013.

VILAR, J.B.; FERREIRA, F.L.; FERRI, P.H.; GUILLO, L.A.; CHEN, C.L. Assesment of the mutagenic antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Braz J Biol**. 68 (1): 141-147, 2008.

VILAR, J.B.; FERRI, P.H.; CHEN-CHEN, L. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. **Braz J Biol**. 71(1): 197-202, 2011.

VILLELA, P.; BATISTA, A.G.; VILLELA, N.A.D.P. Nutritional composition of *Annona crassiflora* pulp and acceptability of bakery products prepared with its flour. **Food Science and Technology**. 33(3): 417-423, 2013.

ZAFRA-POLO, M.C.; GONZÁLEZ, M.C.; ESTORNELL, E.; SAHPAZ, S.; CORTES D. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**. 42(2): 253-271, 1996.

ZOUBIRI, S. & BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**. 15 (11): 1010-1016, 2011.

SHAKIR, L.; EJAZ, S.; ASHRAF, M.B.; QURESHIC, N. A.; ANJUMD, A. A.; ILTAF I.; JAVEED, A. Ecotoxicological risks associated with tannery effluente Wastewater. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 180-191, 2012.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química nova**, v. 21, n. 5, p. 557- 559, 1998.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOARES, D. M.; GINANI, F.; BARBOZA, C. A. G. Rendimento de células mesenquimais do ligamento periodontal humano submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 41, n. 6, p. 415-419, 2012.

# CAPÍTULO IV

**Estudo fitoquímico e atividade anticolinesterásica de**  
*Annona crassiflora* Mart.

Felipe Pereira da Silva Santos, Cassio Herbert Santos de Melo, Chistiane Mendes Feitosa  
**Estudo fitoquímico e atividade anticolinesterásica de *Annona crassiflora* Mart. na busca de fitofármacos para formulações farmacêuticas direcionados à doença de Alzheimer**

### RESUMO

A espécie *Annona crassiflora* Mart. é uma planta nativa do cerrado. Estudos da literatura sugerem que esta espécie apresenta partes vegetais com atividade antioxidante potente quando comparados a alguns antioxidantes sintéticos. Os antioxidantes contribuem para redução significativa de incidências de doenças crônicas e degenerativas. Uma doença ligada ao stress oxidativo, é a doença de Alzheimer (DA), uma afecção neurodegenerativa irreversível e progressiva que proporciona muitos distúrbios cognitivos como perda da memória, dificuldade na capacidade de raciocínio e comunicação, está associada à redução de neurotransmissores cerebrais, como acetilcolina (ACh) onde o método que apresentou maior eficiência clínica é a utilização de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise ACh. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo fitoquímico e atividade farmacológica a partir dos extratos dos frutos e folhas para indentificar substâncias presentes na espécie *A. crassiflora* capazes de inibir a enzima AChE. Os ensaios de toxicidade em *Artemia salina* foram realizados nos extratos das folhas e citotoxicade avaliadas contra 10 das linhagens tumorais os extratos dos frutos de *Annona crassiflora*. Os ensaios fitoquímicos evidenciaram que todos extratos das folhas e frutos indicaram a presença de alcaloides e obteve-se resultados positivos para a inibição qualitativa e quantitativa da enzima AChE, o extratos metanólico das folhas apresentou-se melhor resultado com inibição da AChE de 79,7%. Não fora observado toxicidade e citotoxicidade nos extratos. A partir dos ensaios cromatográficos foram isolados três compostos puros e misturas que após caracterização por espectroscopia de RMN foram codificados como: A05, FAH-1, FAH-2, uma flavonol ( Miricetina-3',5'-dimetoxi-4'-isopropoxi-3-O-raminosídeo), uma mistura de sesquiterpenos ( $\beta$ -Sitosterol, Estigmasterol e 24-metilenocicloartanol) e o  $\beta$ -Sitosterol puro, respectivamente. Nenhum composto apresentou inibição da enzima AChE

**Palavras-chave:** *Annona crassiflora* Mart, Acetilcolinesterase, Alzheimer, Toxicidade, Citotoxicidade.

Felipe Pereira da Silva Santos, Cassio Herbert Santos de Melo, Chistiane Mendes Feitosa

**Phytochemical study and anticholinesterase activity of *Annona crassiflora* Mart. in the search for potential drug in Alzheimer's disease.**

**ABSTRACT**

The *Annona crassiflora* Mart. specie it is a plant native from cerrado which has antioxidant activity as high when compared to some synthetic antioxidants. Antioxidants contribute to low and significant of incidences of chronic and degenerative diseases. An illness linked with oxidative stress is the Alzheimer's disease (AD) a neurodegenerative irreversible and progressive, provides many cognitive disorders such as memory loss, difficulty in thinking ability and communication, is associated with loss of brain neurotransmitters such as acetylcholine (ACh). This study aimed to carry out a phytochemical study and pharmacological activity from the extracts of fruit and leaves to determine substances in the species *A. crassiflora* capable of inhibiting Acetylcholinesterase (AChE) enzyme. The toxicity tests in *Artemia salina* were done on the leaves extract and its cytotoxicity evaluated against 10 tumor lines the *A. crassiflora* fruits extract. Phytochemical tests showed that all extracts of leaves and fruits indicated the presence of alkaloids, the results were positive for inhibiting the qualitative, and quantitative inhibition of the enzyme AChE, the methanolic extracts of leaves of *A. crassiflora* gave the best results with inhibition of 79.7%. Was not observed toxicity and cytotoxicity on the extracts. From the chromatographic assays, three pure compounds and mixtures were isolated which, after characterization by NMR spectroscopy, were encoded as: A05, FAH-1, FAH-2, a flavonol (Miricetin-3', 5'-dimethoxy-4'-isopropoxy-3-O-raminoside), a mixture of sesquiterpenes ( $\beta$ -Sitosterol, Estigmasterol and 24-methylenecycloartanol) and pure  $\beta$ -Sitosterol, respectively. No compound showed inhibition of the AChE enzyme.

Keywords: *Annona crassiflora* Mart, acetylcholinesterase, Alzheimer's, Toxicity, Cytotoxicity.

## **1 INTRODUÇÃO**

O reino vegetal é uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos fármacos. Há um crescente interesse no Brasil em estudos de plantas medicinais, porém as pesquisas sobre plantas medicinais ainda se mostra um desafio já que a flora brasileira gradativamente tem sido destruída (MACIEL *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2011). A medicina popular, apesar de ser bastante promissora, apresenta-se carente de estudos farmacológicos, como no bioma cerrado (ALMEIDA *et al.*, 1998). O cerrado representa cerca de 25% do território nacional e está presente em 13 estados e o Distrito Federal e o bioma mais característico brasileiro. Este bioma possui a segunda maior diversidade da América do Sul, sendo superado apenas pela Amazônia, além de possuir mais 6500 espécies de plantas, no qual pelo menos 504 famílias já têm confirmado algum uso alimentar, madeireiro e medicinal. (MARQUES, 2004)

*Annonaceae* é uma das famílias mais predominantes em áreas de cerrado do território brasileiro, esta família é formada por cerca de 120 gêneros e 2300 espécies, que são distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (EGYDIO *et al.*, 2013; EGYDIO, VALVASSOURA & SANTOS, 2013). *Annona* é o maior gênero com, aproximadamente, 120 espécies (EGYDIO *et al.*, 2013). No Brasil existem 33 gêneros e cerca de 250 espécies, muitas das quais têm frutos de alta qualidade, especialmente aquelas pertencentes ao gênero *Annona* onde muitas espécies de anonáceas são usadas na medicina popular para tratamento antiparasitário e antitumoral em doenças intestinais. (PIMENTA *et al.*, 2013). Achados da literatura revelam que a classe de alcaloides são abundantes nas espécies de *Annona*, sendo marcadores quimiotaxonomicos destas espécies (DUTRA *et al.*, 2012, EGYDIO *et al.*, 2013).

*Annona crassiflora* Mart. é uma árvore nativa do cerrado brasileiro, amplamente difundida, apresenta-se como uma árvore que dá uma fruta típica conhecido como araticum do cerrado, seus frutos são altamente consumidos "*in natura*", por pessoas nativas ou usado para preparar o suco, sorvete ou gelatina (Figura 1). (PIMENTA *et al.*, 2013; CORRÊA *et al.*, 2011; BRAGA FILHO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2007).





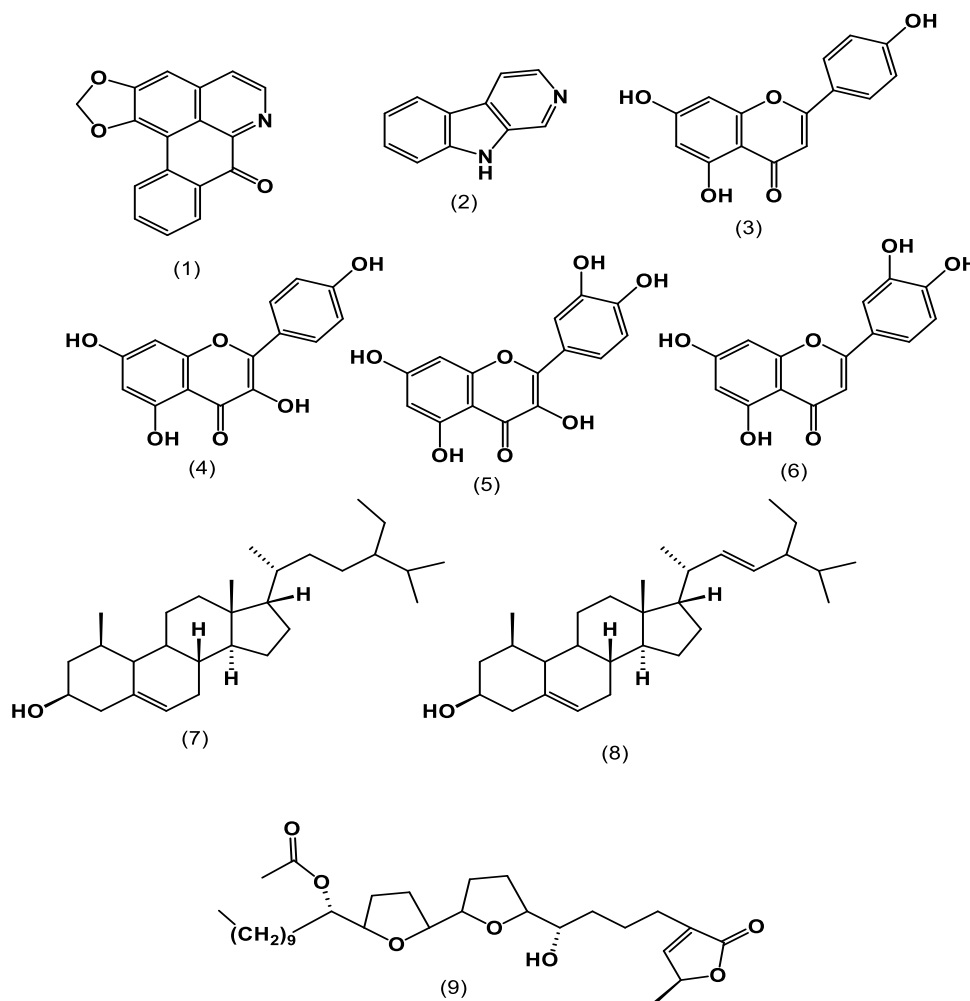
(Fonte: <http://www.espacodocerrado.com/foto04.asp>)

**Figura 1** – Árvore (A), folhas e fruto (B), fruto e polpa (C) e flor (D) de *Annona crassiflora*

Na medicina popular, as sementes de *A. crassiflora* são tradicionalmente usadas contra picadas de cobra. Também há relatos de usos de *A. crassiflora* como antidiarreico, contra reumatismo e sífilis (VILLELA, BATISTA & VILLELA, 2013; SILVA *et al.*, 2007; PIMENTA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 1996). Essas propriedades levaram a pesquisas fitoquímicas sobre a espécie, que apresenta como principais ingredientes químicos e bioativos os alcalóides, presentes nas folhas, além do policetídeo, acetogeninas e flavonoides (LAGE *et al.*, 2014). Essas substâncias possuem várias propriedades biológicas, o que justifica os estudos feitos com extratos, óleo essencial e compostos isolados de várias partes de araticunzeiro e, nessas pesquisas, encontraram-se efeitos citotóxicos, pesticidas, antimicrobianos, antiparasitários (PIMENTA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 1996), inseticida (PIMENTA *et al.*, 2013), sobre a atividade das enzimas hepáticas em modelos animais (ROESLER, 2011) e atividades antifúngica e antioxidante. (SILVA *et al.*, 2007).

Em 1982, Leboeuf e colaboradores publicaram uma revisão sobre a fitoquímica da família Annonaceae, onde é relatada a predominância de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos dentre os metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes à família. Além de alcaloides, constituintes como polifenóis, óleos essenciais, terpenos e substâncias aromáticas também são encontradas em representantes da família. Na família Annonaceae podem ser encontrados alcaloides dos tipos quinolínicos, pirrolizidínicos, piperidínicos,

indolizidínicos, piridínicos e isoquinolínicos (SIMÕES e SCHENKEL, 2004). O alcaloide oxoaporfínico liriodenina (**1**) (Figura 2) é o mais encontrado em espécies da família Annonaceae (SANTOS et al., 2003). Quanto aos compostos fenólicos, na família Annonaceae os de maior ocorrência são os flavonoides (SIMÕES & SCHENKEL, 2004). Flavonoides como O-glicosilados, apigenina (**3**), kaempferol (**4**), quercetina (**5**), e luteolina (**6**) (Figura 2) foram detectados em espécies da família Annonaceae (SANTOS & SALATINO, 2000). Entre os esteroides, os dois de ocorrência muito comum em Annonaceae são o  $\beta$ -sitosterol (**7**) e o estigmasterol (**8**) (Figura 2) (LEBOEUF et al., 1982). Segundo Bermejo e colaboradores (2005), já foram isoladas 417 acetogeninas na família Annonaceae, destas, 176 foram relatadas no período de 1998 a 2004, sendo que a predominância dos compostos descritos era para espécies de *Annona*. A primeira acetogenina de anonácea, a uvaricina (**9**), foi isolada das raízes de *Uvaria acuminata* (JOLAD et al., 1982)



**Figura 2** - Alguns metabólitos secundários da família Annonaceae: liriodenina (1), alcaloide  $\beta$ -carbólico (2), apigenina (3), kaempferol (4), quercetina (5), luteolina (6),  $\beta$ -sitosterol (7), estigmasterol (8) e uvaricina (9)

Os frutos e as folhas da *A. crassiflora* possui atividade antioxidante tão alto como os outros produtos vegetais antioxidantes conhecidos, de acordo com uma avaliação de modelos *in vitro* (ALMEIDA *et al.*, 1998). Com base em estudos clínicos e epidemiológicos de populações cujas dietas são altas na ingestão de alimentos como cereais, frutas e vegetais têm mostrado evidências de que antioxidantes naturais são os principais fatores que contribuem para baixa e significativa redução de incidências de doenças crônicas e degenerativas. (SHAHIDI, 1996). Pesquisas apontam que drogas provenientes de produtos naturais como sendo eficazes no tratamento da doença de Alzheimer (DA), patologia degenerativa que atinge principalmente no indivíduo a memória e a capacidade de raciocínio (RANG *et al.*, 2001).

Na DA ocorre deficiência de neurotransmissores cerebrais que são responsáveis pela transmissão dos estímulos nervosos transmitidos de um neurônio a outro. O principal neurotransmissor é a acetilcolina (ACh) que está envolvida diretamente nos processos motores, cognitivos e de memória. A DA gera a degradação de neurônios diminuindo a atuação da ACh, a qual é degradada pela ação de enzimas (DEMARIN *et al.*, 2011; SHAO *et al.*, 2004; GOOD, 1996). O método que apresentou maior eficiência clínica é o uso inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise da acetilcolina (KIELY *et al.*, 1991). Acredita-se que com a inibição da AChE, aumente a concentração de acetilcolina e portanto diminuiria ou retardaria a progressão da DA. (DEMARIN *et al.*, 2011).

Há vários inibidores desta enzima comercializados como a tacrina (Cognex<sup>®</sup>) que é hepatóxica; a rivastigmina (Exelon<sup>®</sup>) no qual apresenta efeitos prejudiciais, e a fisostigmina (Synapton<sup>®</sup>) que é moderadamente eficaz, porém estes geralmente estes possuem efeitos colaterais indesejáveis, neste contexto a busca de inibidores da enzima AChE através de produtos naturais constitui em uma alternativa promissora e viável para o delineamento de novos fitomedicamentos (FEITOSA, *et al.*, 2011). A galantamina (Reminyl<sup>®</sup>) é um alcaloide inibidor de longa-ação seletiva, reversível e competitivo da AChE e é considerada o medicamento mais efetivo no tratamento da DA, com poucas limitações (GUPTA *et al.*, 1997; GORDON, 2000, INGKANIMAN *et al.*, 2003, BOKDE, *et al.* 2009).

Apesar da DA não ter cura, existe um tratamento que tem sido bastante eficaz em diminuir os sintomas desta doença, através do uso de fármacos inibidores da AChE (anticolinesterásicos) para evitar a degradação da AChE. Em relação à ligação que estabelecem com a AChE, os anticolinesterásicos podem ser classificados em reversíveis, irreversíveis e pseudoirreversíveis (DEMARIN *et al.*, 2011; GOOD, 1996). Uma abordagem consiste no tratamento colinérgico da doença (BORES *et al.*, 1996; RASKIND *et al.*, 1995), e o método que demonstrou maior eficácia clínica é o uso de inibidores diretos da AChE, responsável pela

hidrólise da acetilcolina (BARTUS, 1982). Neste contexto, há uma progressiva busca por inibidores da AChE a partir de produtos naturais, em que apresente menos efeitos prejudiciais a saúde do ser humano que outros medicamentos já existentes e assim possam ser utilizados futuramente como fitoterápicos. (FEITOSA *et al.*, 2011)

No presente trabalho teve por objetivo realizar o estudo fitoquímico, farmacológico e análise cromatográfica para determinar potenciais substâncias bioativas dos extratos da *Annona crassiflora* Mart capazes de inibir a enzima AChE.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Suportes para dados cromatográficos, espectroscópicos e atividade enzimática.

- **Cromatografia em coluna (CC).** Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro, utilizando como fase estacionária com as seguintes especificações: (i) gel sílica 60 com partículas entre 0,063- 0,200 mm (70-230 mesh ASTM) da Merck;

- **Cromatografia em camada delgada preparativa (CCD).** As análises em escala preparativa foram desenvolvidas em cromatoplasmas de tamanho 10 x 10 e 5 x 5 cm, espessura de 1,0 mm. A visualização das faixas foi efetuada com auxílio de luz ultravioleta (254 e 366 nm). A recuperação das amostras foi efetuada utilizando como solventes: diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) ou metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

- **Cromatografia de exclusão molecular (CE).** A eluição das amostras foi efetuada utilizando como solventes:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / Hexano (4:1),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /AcEtOH (3:2), MeOH PA. O tamanho da partícula seca utilizado foi o Sephadex G-25 (dextrana).

- **Reveladores.** A revelação das faixas foi feita sob luz ultravioleta 254 e 366 nm, reagente de Dragendorff e solução de Sulfato Cérico.

- **Solventes.** Para cromatografia foram utilizados solventes das marcas Merck, Synth, Vetec e Aldrich P.A. Para obtenção de espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados das marcas Merck e Aldrich.

- **Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de Carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ).** Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D) foram obtidos em espectrômetros modelo Avance DRX-300, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, 499,6 MHz e na frequência do carbono a 125 MHz.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados, no caso dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas do solvente deuterado utilizado: clorofórmio ( $\delta$  7,27) e metanol ( $\delta$  4,87;  $\delta$  3,31). Para os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados pelos picos dos carbonos 13 dos solventes clorofórmio ( $\delta$  77,23) e metanol ( $\delta$  49,15).

As multiplicidades das absorções em RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (dubleto), t (tripleto), q (quarteto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN  $^{13}\text{C}$  foi determinado através da técnica DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*), com ângulo de  $135^\circ$  (CH e  $\text{CH}_3$  com amplitudes em oposição aos  $\text{CH}_2$ ), e foi descrito segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico),  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico), sendo que os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT  $135^\circ$  do espectro de  $^{13}\text{C}$ .

- **Estudo da atividade anticolinesterásica**

**I. Tampões** - Os seguintes tampões foram utilizados no ensaio enzimático para determinação da inibição da enzima AChE:

Tampão 1: Tris/HCl [Tris(hidrometil)metilamina]  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0;

Tampão 2: Tris/HCl [Tris(hidrometil)metilamina]  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0, contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA);

Tampão 3: Tris/HCl [Tris(hidrometil)metilamina]  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0 contendo NaCl 0,1M e  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$  0,02M.

**II. Enzima utilizada nos ensaios de CCD e em microplaca** - A enzima acetilcolinesterase (AChE) (tipo VI-s, pó liofilizado, 292 U/mg sólido, 394 U/mg de proteína) foi obtida da Sigma Chemical Co. Os ensaios em CCD foram realizados com a enzima diluída na concentração de 3U/mL em tampão (1) e, para a utilização em microplaca, a solução da enzima foi diluída com tampão (2) a uma concentração de 0,22 U/mL.

**III. Substrato** - O substrato utilizado para os ensaios em CCD foi o iodeto de acetiltiocolina (ATCI), obtido da Aldrich Chem. Co., o qual foi diluído em tampão (1) para obtenção de uma solução de ATCI  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Para os ensaios em microplaca, a solução preparada foi de  $15 \text{ mmol.L}^{-1}$  em água milipore.

- IV. Reagente de Ellman** - Nos ensaios em CCD, foi utilizado o ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 1 mmol.L<sup>-1</sup> em tampão (1). Para os ensaios em microplaca, utilizou-se uma solução 3 mmol.L<sup>-1</sup> em tampão 3, obtido da Aldrich Chem. Co.
- V. Inibidores de referência** - Nos ensaios em placas de CCD, foi utilizado como referência o alcalóide cafeína, obtido do isolamento da espécie *Paulinia cupana*. Nos ensaios em microplaca, foi utilizado o alcalóide denominado galantamina, medicamento aprovado pelo FDA para o tratamento de pacientes com DA.

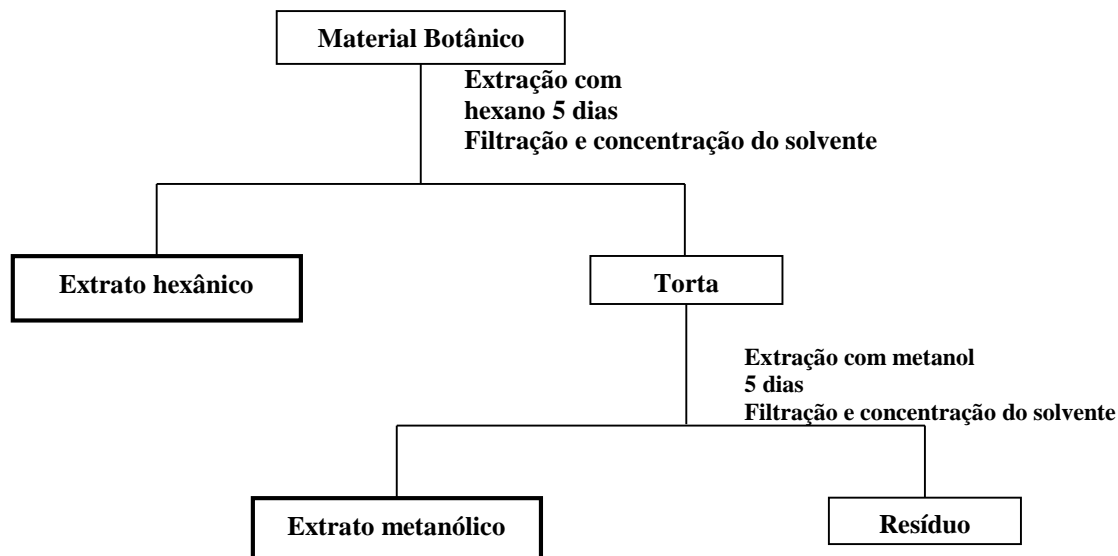
## 2.2 Coleta e identificação botânica

O material botânico de *A. crassiflora* (frutos e folhas) foram coletado no Campus do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí (latitude 7°16'32,3'' sul e longitude 44°30'07,7'' oeste) na cidade de Uruçuí – PI, no mês de fevereiro de 2013 e as exsiccatas foram identificadas e depositadas no herbário Herbário Graziela Barroso da UFPI sob os números de registro 18850.

## 2.3 Folhas

### 2.3.1 Extratos

O material vegetal fresco coletado (1,3 kg), foi pré-seco à sombra à temperatura ambiente, posteriormente triturados. As folhas da espécie em estudo após secas, moídas e pesadas, foram submetidos à extração por maceração com hexano e metanol, respectivamente. Foram utilizados de 10,00 L de cada solvente e a extração ocorreu a frio durante 5 dias, extraíndo-se o material com uma agitação mecânica diária e posterior filtração do extrato (Esquema 1).



**Esquema 1.** Fluxograma de obtenção dos extratos.

**2.3.2** Screening fitoquímico das folhas da *A. crassiflora* na prospecção fitoquímica para identificação de metabólitos secundários.

Os extratos hexânico e metanólico de *A. crassiflora* foram submetidos à análise fitoquímica através de uma série de reações de caracterização dos compostos a saber: alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos e/ou esteróis. Os testes se baseiam em reações cromáticas e de precipitação conforme descrito por Simões *et al.* (2004).

Os extratos das folhas foram submetido a teste para verificar a presença de alcaloides através da aplicação de alíquotas do extrato em placas de gel de sílica utilizando-se o revelador de Dragendorff. O reagente de Dragendorff, uma solução de iodeto de bismuto do potássio,  $K(BiI_4)$ , em ácido diluído que forma ppt laranja avermelhados quando em contato com alcalóides e compostos nitrogenados, como trata-se de uma reação não específica para alcalóides, resultados falso-positivos são comuns, devendo o material ser submetido a uma extração ácido-base para a confirmação da presença e extração dos alcalóides (SANTOS, 2003).

O aparecimento de precipitado vermelho-alaranjado no teste de Dragendorff e considerado resultados positivos para a presença de alcalóides.

**2.3.3** Avaliação da toxicidade sobre a *Artemia salina* nos extratos das folhas da *A. crassiflora*

O teste larvicida sobre *Artemia salina* (TAS) tem se tornado um importante ensaio na seleção de agentes com potencial atividade citotóxica, anticancerígena e pesticida. O ensaio tem demonstrado correlação com diversas atividades biológicas (MEYER et al., 1982),

O TAS foi realizada segundo metodologia descrita por MC Laughlin e Rogers (1998) nos extratos das folhas de *Annona crassiflora*, o extrato hexânico foi diluído em uma solução salina 0,9% + Tween (0,05%) e o extrato metanólico em água, ambos em concentrações de 31,25, 62,5, 125, 250,500 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup> e adicionados à cultura de *A. salina* contendo dez crustáceos por mL. Um controle positivo (dicromato de potássio) e controle negativo (solução salina 0,9%) foi realizado simultaneamente, nas mesmas concentrações. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetido 3 vezes. Após 24 horas de tratamento a temperatura ambiente, realizou-se a contagem dos crustáceos que morreram e os dados expressos como percentagem de mortalidade pela seguinte equação:

**Equação 1** – Porcetagem de mortalidade de crustáceos.

$$Mortalidade(\%) = Nm - \frac{Nc \times 10}{No}$$

No qual,  $N_m$  é o número médio de *A. salina* que morreram,  $N_0$  é o número inicial de *A. salina* que sobreviveram em cada concentração e  $N_c$  representa a mortalidade no controle negativo. A  $CL_{50}$  (concentração que mata 50% de *A. salina*) do complexo foi obtida por regressão de Probit a partir do software IBM SPSS STATISTIC 20 e índice de mortalidade a partir do software *GraphPad Prism 6.01*.

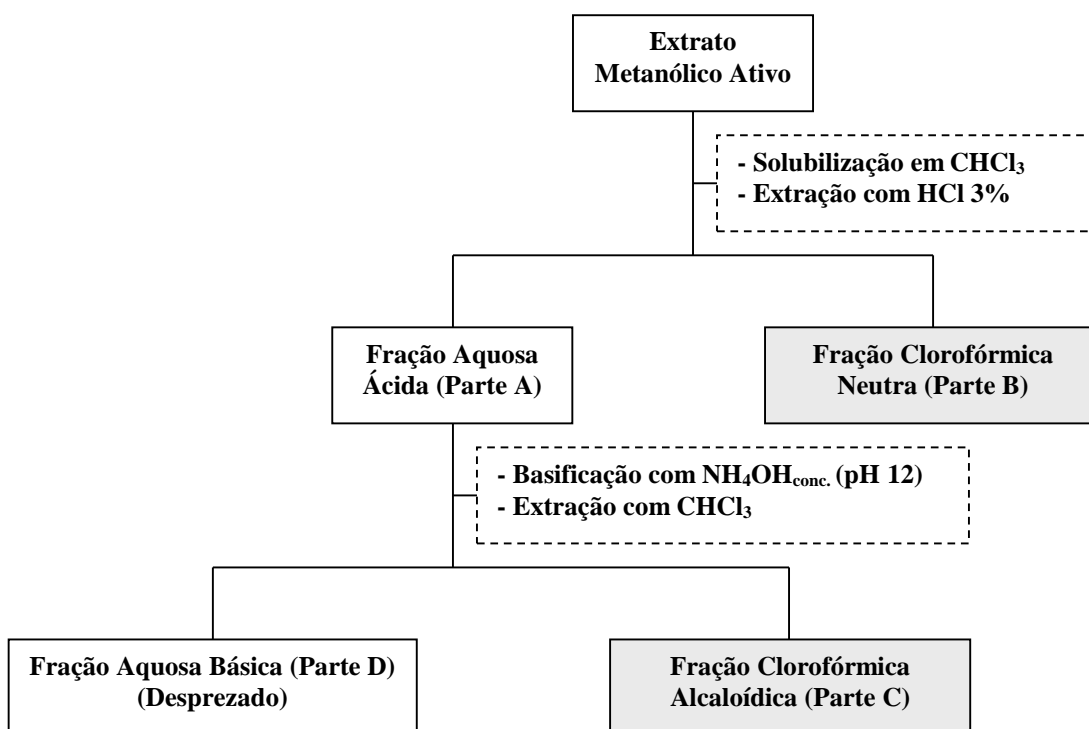
Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

### 2.3.4 Extração das bases alcalóides

A análise cromatográfica por CCD dos extratos hexânico e metanólico das folhas da *A. crassiflora* permitiu sugerir a presença de alcalóides, através da utilização do reagente de Dragendorff. Baseado neste indício, os extratos hexânico e metanólico bioativos foram submetidos à extração ácido-base (Costa et al., 2006). Os extratos foram solubilizados em clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e extraídos sucessivamente com solução de ácido clorídrico 3 % v/v, obtendo-se duas frações: a fração aquosa ácida (Parte A) e a fração clorofórmica neutra (Parte



B). A fração aquosa ácida (Parte A) foi basificada com hidróxido de amônio concentrado até pH 12 e extraída com clorofórmio em seguida levando as duas novas frações: a fração clorofórmica alcalóidica (Parte C) e a fração aquosa básica (Parte D) que foi desprezada. A fração alcalóidica (Parte C) foi submetida à análise cromatográfica. O Esquema 2 mostra como foi realizado essa extração de alcalóides.



**Esquema 2.** Metodologia para extração dos alcalóides presentes nos extratos metanólicos bioativos.

### 2.3.5 Isolamento e purificação de compostos dos extratos das folhas da *A. crassiflora*

As frações alcalóidica (Parte C) dos extratos hexânico e metanólico obtidos a partir das folhas estão em fase de isolamento para obtenção de alcalóides isolados, essa purificação está sendo realizada por meio de coluna cromatográfica, cromatografia em camada delgada e coluna de sephadex utilizando os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, misturados em diferentes proporções.

## 2.4 Frutos

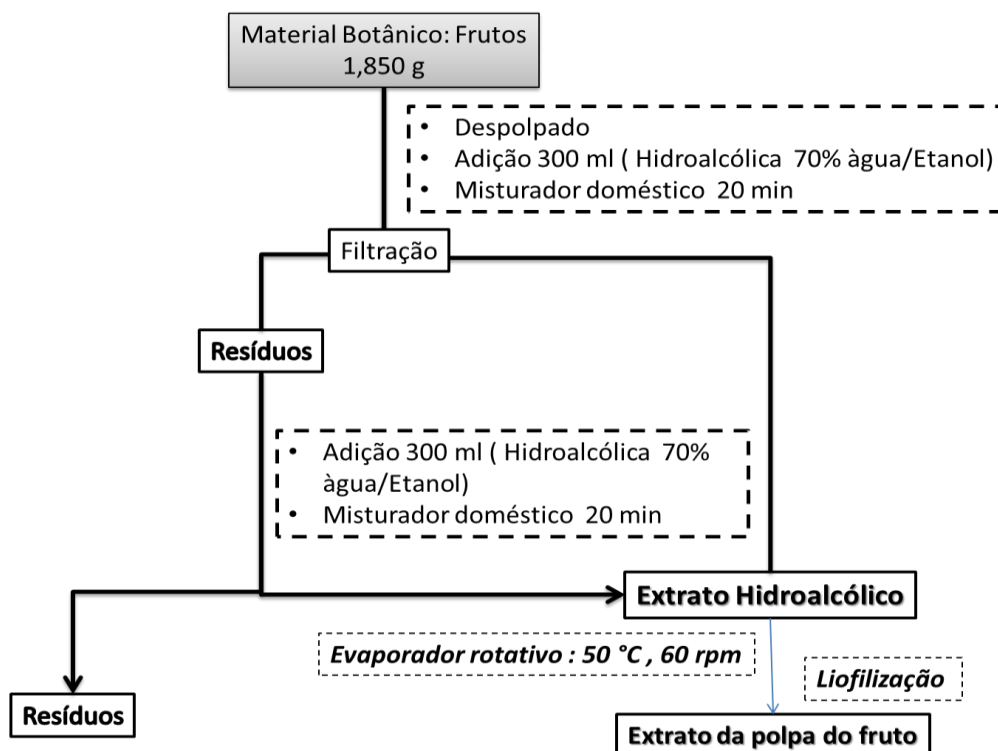
### 2.4.1 Extratos

Pesou-se 1,850 Kg do fruto (Figura 3) o qual depois foi despulpado, misturado para extração com 300 mL de solução aquosa de etanol (70% de etanol) (5:95, v/v, água: etanol), utilizando um misturador doméstico por 20 min. Os extratos foram filtrados e o resíduo extraído novamente sob as mesmas condições. Os resíduos foram reservados para futuras avaliações. O material resultante do extrato da polpa foi rotaevaporado sob vácuo a 70 °C para remover o etanol, em seguida parte extrato etanólico concentrado foi liofilizador e a outra parte utilizou-se o *spray dryer* para comparação dos rendimentos. Os extratos secos obtidos foram armazenados a -18 °C em frascos de vidro âmbar até futura utilização (Esquema 3).



Fonte: <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/araticum-do-cerrado.htm>

**Figura 3** – Fruto maduro, Mesocarpo (polpa) e sementes *Annona crassiflora* Mart.



**Esquema 3** – Fluxograma de obtenção dos extratos dos frutos de *Annona crassiflora*.

**2.4.2** Screening fitoquímico dos frutos de *A. crassiflora* na prospecção fitoquímica para identificação de metabólitos secundários.

O extrato bruto de *A. crassiflora* foi submetido a screening fitoquímico através de uma série de reações de caracterização a saber: alcaloides, taninos, flavonoides; saponinas; triterpenos e/ou esteróis. Os testes se baseiam em reações cromáticas e de precipitação conforme descrito por Simões *et al.* (2004).

O extratos do fruto foi submetidos a um teste para verificar a presença de alcaloides que foi realizado aplicando a amostra em placas de gel de sílica utilizando-se o revelador de Dragendorff conforme Santos *et al.* (2003). O surgimento de precipitado (ppt) vermelho-alaranjado indica a presença de alcalóides.

#### 2.4.3 Estudo da citotoxicidade do extrato do fruto da *A. crassiflora*

Os extratos etanólicos concentrados e liofilizados (10,0 g) foram armazenados a -18 °C em frascos de vidro âmbar até serem utilizados nos testes de citotoxicidade. As linhagens tumorais utilizadas, HL60 (leucemia pro-mielocítica), NCI-H292 (câncer de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Os extratos da polpa de *A. crassiflora*, foram diluída em DMSO puro estéril. As linhagens NCI-H292 (câncer de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama) foram plaqueadas na concentração de  $1,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> e a de HL60 (leucemia pro-mielocítica) foi plaqueada na concentração de  $0,30 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> Como padrão positivo utilizou-se a doxorubicina, medicamento comumente utilizado para tratamento de câncer (SANTOS *et al.*, 2009).

O padrão positivo no teste de citotoxicidade, a doxorubicina ainda é muito utilizada na quimioterapia principalmente em pacientes com câncer de mama, sendo potencialmente cardiotoxicidade (SANTOS *et al.*, 2009). A doxorubicina é um antibiótico da classe antraciclina e sua toxicidade cardíaca tem caráter progressivo e está diretamente relacionada à dose total utilizada. O percentual da cardiotoxicidade varia diretamente com a dose total usada (SHAPIRO & RETCH, 2008, SCHWARTZ *et al.*, 2008).

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança no programa *GraphPad Prism 6,01*. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

#### 2.4.4 Isolamento e purificação de substâncias do fruto de *A. crassiflora*

Utilizou-se 23,22 g do extrato dos frutos e fez-se secagem por atomização utilizando *spray dryer* (temperatura de entrada de 150 °C, aspiração 80 %, alimentação com 10 % da capacidade do equipamento, usou-se 30 de aerosil).

O extrato liofilizado da polpa do fruto (10,0 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica (CC) gel de sílica 60 como adsorvente, utilizando-se solventes orgânicos puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade. A passagem da fase móvel se deu pela utilização dos solventes: diclorometano, diclorometano-acetato de etila (1:1), acetato de etila PA, acetato de etila-metanol (1:9, 2:8, 3:7 e 1:1) e metanol PA (**Tabela 1**).

As frações obtidas foram monitoradas por CCD, eluídas em variados sistemas de solventes, e as que apresentaram o mesmo fator de retenção foram reunidas para avaliação do grau de pureza das substancias isoladas.

**Tabela 1** – Tratamento cromatográfico do extrato liofilizado da polpa de *A. crassiflora*

Frações	Frações	Volumes (mL)
1-2	Diclorometano	100
3-4	Diclorometano-acetato de etila (1:1)	100
5-6	Acetato de etila	100
7-8	Acetato de etila-metanol (9:1)	100
9-10	Acetato de etila-metanol (8:2)	100
11-12	Acetato de etila-metanol (7:3)	100
13-18	Acetato de etila-metanol (6:4)	300
19-24	Acetato de etila-metanol (1:1)	300
25-26	Metanol	100

**Fonte** - Proprio autor

## 2.5 Ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE

As substâncias A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8 e A9, determinadas posteriormente no isolamento e purificação de substâncias do fruto da *A. crassiflora* foram submetidas a ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE segundo metodologia abaixo.

O ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE seguiu o método de Ellman *et al.* (1961) modificado por Rhee e colaboradores (2001) para detectar a atividade de inibição da AChE. Inicialmente pesou-se 1 mg de cada amostra (diluindo para se obter as concentrações de 1,0, 0,5; 0,25, 0,125 e 0,0625 mg.mL<sup>-1</sup>, seguidamente as amostras foram aplicadas em placas de gel de sílica de 6 cm x 6 cm junto com o padrão (cafeína) e colocou-se as placas em recipientes com eluente clorofórmio e metanol 9:1, posteriormente pesou-se 11,6 mg de iodeto de acetilcolina e 16 mg de 5,5'-ditiobis e foram dissolvidos em 40 mL da solução tampão pH 8 TRIS (hidróxi-metil metano) HCl, então borrifou as placas que estavam contidas as amostras. Por fim esperou o tempo de secagem e borrifou novamente as placas com a enzima AChE em solução tampão.

Um teste falso positivo foi realizado para verificar se o resultado positivo da amostra em ensaio CCD é na verdade inibição da enzima ou apenas uma reação química entre DTNB e tiocolina, e foi realizado da seguinte forma: 3 U.mL<sup>-1</sup> de AchE será misturada com 1 mmol.L<sup>-1</sup> ATCI em tampão tris pH 8 e incubada por 15 minutos a 37 °C. Esta mistura enzima-substrato será usada como revelador tiocolina. As amostras são aplicadas em CCD de sílica gel e pulverizadas com uma solução 1 mmol.L<sup>-1</sup> de DTNB seguida de revelador tiocolina. Manchas brancas em um campo amarelo são observadas para compostos falso-positivos. Alguns aldeídos, aminas e ácidos apresentam efeito falso-positivo no método de Ellman *et al.* (1961).

## **2.6 Ensaio para detecção de inibição quantitativa da enzima AChE**

Os extratos hexânico e metanólico obtidos a partir das folhas de *A. crassiflora* foram submetidos ao ensaio para detecção de inibição quantitativa da enzima AChE. Este ensaio quantitativo da enzima AChE pode ser realizado em espectrofotômetro ou em microplacas.

Nos ensaios em espectrofotômetro, quatro concentrações (1, 0,5, 0,25 e 0,125 mg.mL<sup>-1</sup>) das amostras foram preparadas em triplicata. Inicialmente, 100 µL do extrato em triplicata nas concentrações diferentes em solução tampão 50 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8, e metanol 10% foram misturados com 100 µL de AChE (0,22 U.mL<sup>-1</sup> em 50 m.molL<sup>-1</sup> Tris-HCl, tampão pH 8, 0,1% albumina de soro bovino (BSA) e 200 µL de tampão (50 m.molL<sup>-1</sup> Tris-HCl, tampão pH 8, 0,1% de BSA). A mistura reacional foi incubada por 5 minutos a 30 °C. Em seguida, 500 µL de ácido ditiobis-nitrobenzoico (DTNB) (3 m.molL<sup>-1</sup> em Tris-HCl, tampão pH 8, 0,1% de

NaCl, 0,02 mol/L MgCl<sub>2</sub>) e 100 µL de iodeto de acetiltiocolina (ATCI) (4 m.molL<sup>-1</sup> em água) foram posteriormente adicionados.

Neste ensaio, um teste branco foi realizado também em triplicata pela substituição da enzima AChE por 100 µL de tampão (50 m.molL<sup>-1</sup> Tris-HCl, tampão pH 8, 0,1% de BSA). A reação é monitorada por 5 minutos em 412 nm. Um fármaco utilizado no tratamento da doença foi utilizado como controle positivo, como controle negativo o Tampão (50 m.molL<sup>-1</sup> Tris-HCl, tampão pH 8, 0,1% de BSA) foi utilizado.

A atividade anticolinesterásica em percentual (1%) foi calculada pela Equação 2 (Elmman *et al.*, 1961; Kiendrebeogo *et al.*, 2011):

**Equação 2** – Percentual da atividade anticolinesterásica.

$$I (\%) = \frac{(1 - V_0 \text{ amostra})}{V_0 \text{ branco}} \times 100$$

Onde V<sub>0</sub> da amostra e V<sub>0</sub> do branco representam os valores da variação das absorvâncias da amostra e do branco no intervalo de 5 minutos, respectivamente. Os valores da concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) foi determinada por regressão não-linear, com intervalo de 95% de confiança no *software GraphPad Prism 6.01* (San Diego, CA, USA)

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Folhas

##### 3.1.1 Rendimento Extratos

Os rendimentos dos extratos hexânico e metanólico das folhas foram obtidos de acordo com a Tabela 2.

**Tabela 2** – Rendimento dos extratos das folhas

Extrato	Rendimento (%)
Hexânico	1,53
Metanólico	15,52

Os rendimentos dos extratos coletados das folhas EHA (1,53%) e EMA (15,52%) das folhas foram considerados bons, em comparação aos resultados encontrados por UGOLINE, 2012; LAGE, 2012, que obtiveram um valor de (2,2%) para o EHA das folhas.

### 3.1.2 Screening fitoquímico das folhas

O extrato hexânico e metanólico das folhas de *Annona* (EH e EM, respectivamente) foram submetidos a uma triagem fitoquímica preliminar, com o objetivo de se conhecer os constituintes químicos da espécie brasileira do gênero *Annonaceae* (*Annona crassiflora*) e caracterizar fitoquimicamente, os resultados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Screening fitoquímico dos extratos de hexano e metanol das folhas da *A. crassiflora*

Extratos	Esteróides/ triterpenos	Alcalóides	Flavonóides	Taninos	Saponinas
Hexânico	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Metanólico	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

A presença de alcalóides nos EH e EM direcionou os estudos visando o isolamento e elucidação estrutural dos mesmos, o screening condiz com outros estudos abordados na literatura (DUTRA *et al.*, 2012, EGYDIO *et al.*, 2013) e a partir do teste reativo de Dragendorff confirmou-se a presença alcalóides por detecção de coloração alaranjada (Figura 4).

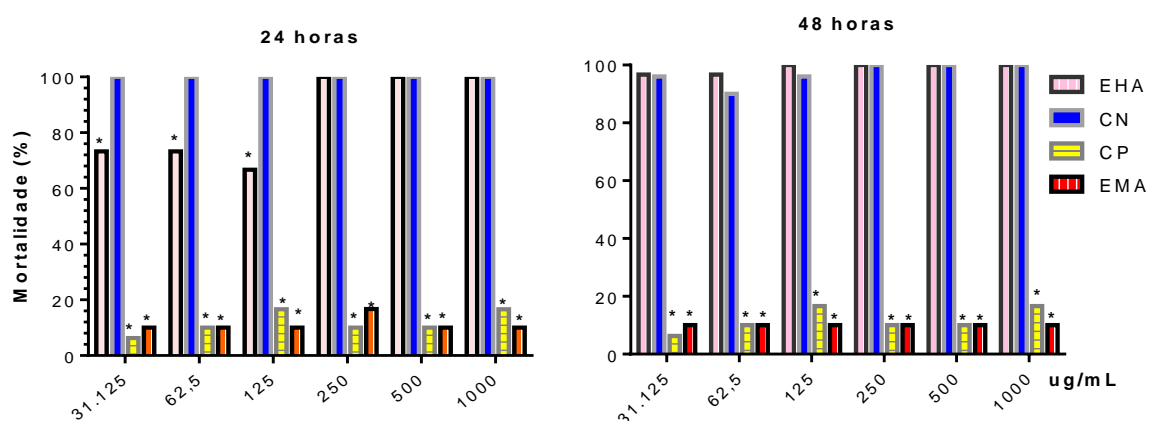


**Figura 4** – Teste reativo de Dragendorff

### 3.1.3 Avaliação da toxicidade sobre a *Artemia salina* nos extratos das folhas da *A. crassiflora*

Os resultados de toxicidade sobre *A. salina* foram avaliados através do programa *GraphPad Prism 6.01*. Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e a significância estatística foi determinada utilizando uma análise de variância seguida pelo teste de *one-way ANOVA* significância de  $p < 0,05$ . O Gráfico 1 expressa os resultados obtidos no teste com *A. salina*.

**Gráfico 1** – Taxa de mortalidade (%) *versus* concentração do extrato ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) na avaliação da toxicidade



**Legenda** – EHA: extrato hexânico de *A. crassiflora*; CN: controle negativo; CP: controle positivo; EMA: extrato metanólico *A. crassiflora*.

Pesquisas apontam que os extratos e substâncias puras são considerados ativos quando a dose que mata 50% dos indivíduos ( $CL_{50}$ ) for menor que  $1000 \mu\text{g/mL}$  (MEYER et al., 1982).



Os extratos testados demonstraram boa atividade larvicida contra as *A. salina*, onde o extrato metanólico de *A. crassiflora* não demonstrou toxicidade sobre *A. salina* em nenhuma das concentrações testadas no qual de acordo com Meyer (1982) valores superiores a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  na avaliação não apresenta toxicidade significativa, assim, não obteve-se a  $\text{CL}_{50}$ . Entretanto, no extrato hexânico observou-se que nas concentrações de 62,5 e  $31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em 24 hrs a taxa de mortalidade é de 75% com a presença de artemias, contudo outras concentrações analisadas demonstraram-se tóxicas e letais com  $\text{CL}_{50}$   $503 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Levando-se em consideração pesquisa realizada por Pimenta (2003) utilizando crustáceos obteve um valor de  $\text{CL}_{50}$  do extrato hexânico de *A. crassiflora* igual a  $622,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (UGOLINE, *et al.*, 2013) e extrato etanólico com  $\text{CL}_{50}$  de 1,45 a  $46,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$

### 3.1.4 Tentativa de extração de alcalóides

A Tabela 4 apresenta os rendimentos da extração por maceração das folhas de *A. crassiflora* (1300g).

**Tabela 4** – Rendimento para extração de alcalóides dos extratos das folhas *A. crassiflora*

Extrato	Rendimento (%)
Hexânico	1,14
Metanólico	32,47

#### 3.1.4.1 Estudo do Extrato Hexânico (EHA)

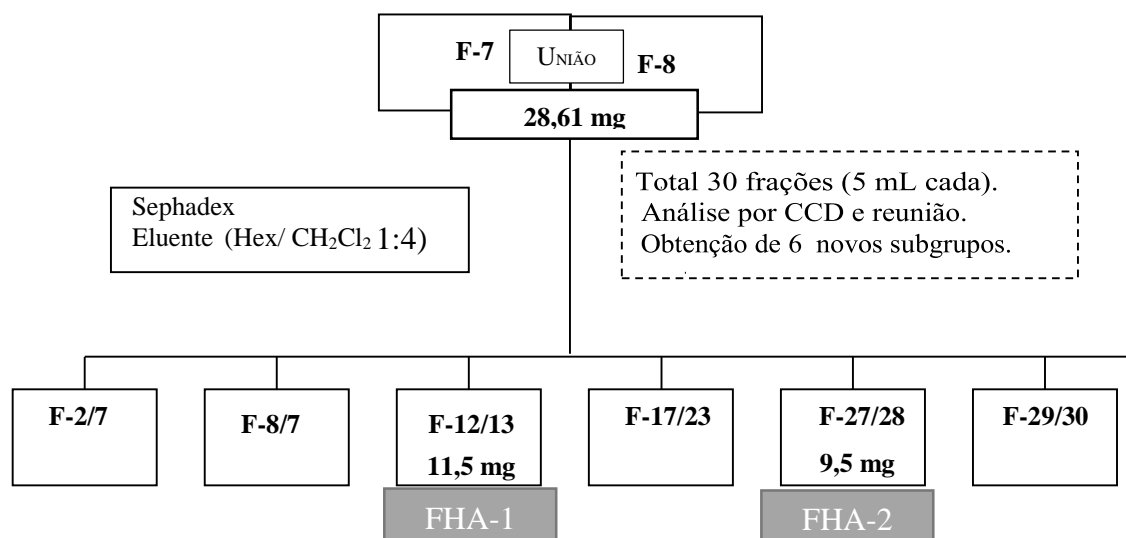
A EHA (4,3 g) foi inicialmente submetida ao fracionamento através de uma CC e uma CCD, eluída com Hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt e MeOH com gradiente de eluição crescentes, obtendo-se 83 frações de 20 mL cada. As frações obtidas foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com os seus respectivos  $R_f$ s (Tabela 5).

**Tabela 5.** Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato hexânico de *A. crassiflora* (CCHA).

Grupos de frações (F)	Frações	Massa (mg)	Substâncias Isoladas	Quantidade (mg)
1	1-7	1,6 mg		
2	8-11	16,87 mg		
3	12-14	16,97 mg		
4	15-18	-		
5	19-24	-		
6	25-28	-		
7	29-32	28,61 mg	FAH-1	11,5 mg
8	32-37	-	FAH-2	9,5 mg
9	38-42	-		
	43-47	-		
10		-		
11	48-52	-		
	53-60	-		
12	61-68	-		
13	69-79	11,47 mg		
14	80-83	22,29 mg		
		-		

### 3.1.4.1.1 Estudo da fração F – 7/8 do extrato hexânico de *Annona crassiflora*.

O esquema 4 a seguir é apresentado o estudo de F- 7/8 (28,61 mg), o qual levou ao isolamento de duas substâncias codificadas como **FAH-1** e **FAH-2**.



**Esquema 4.** Dados obtidos do fracionamento cromatográfico de FHA-1 e FHA-2.

### 3.2 Frutos

#### 3.2.1 Extratos

O extrato da polpa do fruto de *A. crassiflora* obteve-se um rendimento de 0,54%, que pode ser justificado segundo Almeida et al. (1998), cada 100g da polpa da fruta existia cerca de 77,2g de água, 0,90g de sais minerais totais (cinzas), 26,4g de açúcares totais, sendo 13,50g de redutores em glicose e 12,90g de não-redutores em sacarose, pH em torno de 4,6, acidez total de 4,5g, ácido cítrico de 0,29g e teor de proteínas em torno de 1,10g.

#### 3.2.2 Screening fitoquímico dos extratos dos frutos de *A. crassiflora*

No estudo fitoquímico da espécie brasileiras do gênero *Annonaceae* (*Annona crassiflora*) no extrato da polpa do fruto da *A. crassiflora*, os resultados são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6** – Screening fitoquímico da polpa de *A. crassiflora*

Esteróides/ triterpenos	Alcalóides	Flavonóides	Taninos	Saponinas
Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

Os resultados levaram a continuidade dos estudos para isolamentos e identificação do metabólicos secundários de grande interesse farmacológico como os alcaloides amplamente utilizados no tratamento de doenças neurodegenerativas.

#### 3.2.3 Estudo da citotoxicidade do extrato do fruto da *A. crassiflora*

O ataque indiscriminado promovido pelas drogas antineoplásicas às células de rápida proliferação, cancerosas ou normais, produz os indesejáveis efeitos colaterais ou tóxicos sendo que o tratamento pode variar de acordo com cada paciente, pois o organismo reage de maneira diferente obtendo os efeitos colaterais e para análise destes efeitos utilizam-se testes de citotoxicidade realizados *in vitro*, o qual faz parte de um screening inicial para determinar o possível potencial antitumoral das substâncias.

Neste sentido, a análise de citotoxicidade pelo método MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais

de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e de preço acessível. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

A partir da análise dos resultados (Tabela 7), observa-se que o extrato da polpa de *A. crassiflora* apresentou inibição moderada frente às linhagens NCI-H292 (câncer de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama), e inibição comparativa com o controle positivo para HL60 (leucemia pro-mielocítica). Estes resultados obtidos são bastante promissores tendo por base o controle positivo do teste realizado através do uso da cloridrato de doxorubicina.

**Tabela 7** - Percentual de inibição em concentração única do crescimento celular das amostras em três linhagens tumorais e seu intervalo de confiança

Amostras	Inibição NCI- H292 (%)	DESVIO da NCI-H292	Inibição MCF-7	DESVIO da MCF-7	Inibição HL60	DESVIO da HL60
Doxorrubicina	88,4	11,5	62,2	0,7	80,0	0,4
Extrato de <i>A. crassiflora</i>	59,5	9,7	57,6	11,2	83,8	3,4

Obs.: A droga Doxorubicina foi utilizada como controle positivo

Uma das estratégias para tentar reduzir os danos causados com efeitos adversos provocados pelo uso contínuo de fármacos antitumorais já incluídos nas indústrias farmacêuticas é a substituição desses por constituintes químicos menos nocivos ao organismo, oriundos de metabólitos secundários provenientes do *reino vegetal* que tenha igual ou maior potencial antitumoral (MACIEL *et al.*, 2002)

### 3.2.4 Isolamento e purificação de substâncias do fruto da *A. crassiflora*

A análise cromatográfica por CCD dos extratos metanólico ativos (Tabela 8) em diferentes sistemas de solvente evidenciou a presença de alcalóides, através da utilização do reagente de Dragendorff (indicativo de alcalóides). Baseado neste indício, os extratos metanólicos bioativos foram submetidos à cromatográfica em coluna para tentativa de isolamento destes compostos.

**Tabela 8** – Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas dos extratos do fruto de *Annona crassiflora* (EAFt)

Grupo	Frações (F)	Massa (mg)
Extrato Diclorometano-Acetato de etila	FDAA – 40% (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcetOH)	0,5751
Extrato Diclorometano-Acetato de etila	FDAA – 50% (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcetOH)	0,2972
Extrato Acetato de Etila / Metanol 50%	FMA–50% (AcetO/MeOH)	0,7742
Extrato Metanólico	FMA (MeOH)	0,2293

### 3.2.4.1 Extrato Acetato de etila - Metanol ( FMA-50%)

#### 3.2.4.1.1 EAFt – Fração Acetato de Etila / Metanol 50%

O fracionamento cromatográfico dos extratos acetato de etila / metanólico bioativos (4,0 g) foi realizado inicialmente através do fracionamento de uma coluna cromatográfica de sílica gel eluída com Hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 26 frações de 30 mL cada. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo conforme similaridade dos seus respectivos R<sub>f</sub>s (Tabela 9).

Na Tabela 9 é apresentada as substância isoladas na F-1 e F-2, substâncias de alta polaridade e que requerem maior purificação através da cromatografia por gel-partição que gera exclusão por tamanho utilizando CE para remoção de impurezas.

### 3.2.4.2 Extrato Etanólico dos Frutos (EEAFt)

#### 3.2.4.2.1 EEAFt – Fração Etanólica 40-50%

O fracionamento cromatográfico dos extratos etanólicos bioativos (0,87g) foi realizada inicialmente através do fracionamento utilizando-se uma coluna cromatográfica de sílica gel eluída com Hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 35 frações de 30 mL cada. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com os seus respectivos R<sub>f</sub>s (Tabela 10).

**Tabela 9** – Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato metanólico do fruto de *Annona crassiflora* (EAFt / FMA 50%)

Grupo de Frações (F)	Frações	Massa (mg)	Substâncias Isoladas	Quantidade (mg)
1	1-4	29,9	-	29,9
2	5-6	54,8	-	54,8
3/4/5/6	7-26	-	DESCARTE – massa insuficiente	

**Tabela 10** – Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato hidroalcolólico do fruto de *Annona crassiflora* (EEAFt / FDAA 40-50%)

Grupo de Frações (F -5)	Frações	Massa (mg)	Substâncias Isoladas	Quantidade (mg)
1	1-2	-	Não apresentou substâncias	
2	3-5	-	Não apresentou substâncias	
3	6-13	3,5	DESCARTE – massa insuficiente	
7	14-18	-	Não apresentou substâncias	
8	19-21	-	Não apresentou substâncias	
9	22-28	-	Necessita Estudo	
10	29-35		Não apresentou substâncias	

Na Tabela 10 é apresentada a união F-9 que em ao realizar CCDs das frações observou o mesmo perfil cromatográfico necessitando realização de outra coluna cromatográfica.

#### 3.2.4.2.1 *Estudo da Fração 9*

Ao avaliar a necessidade da realização de mais um fracionamento cromatográfico da fração nove foi submetida ao fracionamento através de uma coluna cromatográfica de sílica gel eluída com AcOEt e MeOH em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 25 frações de 30 mL cada. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com os seus respectivos R<sub>f</sub>s (Tabela 11).

**Tabela 11** – Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato hidroalcolóico do fruto de *Annona crassiflora* (EEAFt / FDAA 40-50% / F-9)

Grupo de Frações (F)	Frações	Massa (mg)	Substâncias Isoladas	Quantidade (mg)
1	1-4	-	DESCARTE – Ausência de substâncias	
2	7-8	96,3	<b>A 08</b>	-
3	6/9-10	-	DESCARTE – Ausência de substâncias	
4	11-13	-	DESCARTE – Ausência de substâncias	
5	14-16	39,6	<b>A 09</b>	-
6	17-25	-	DESCARTE – Ausência de substâncias	

Na Tabela 11 é apresentada o perfil de purificação para a substância isolada F-2 que após união por Rfs observou-se uma substância de cor marrom escura, pegajosa que ao se realizar CCD apresentou-se pura e resultou no isolamento de um composto codificado como A08, além desta substância ocorreu o isolamento de uma substância decodificada de A09 que ao ser analisada por CCD apresentou-se com impurezas sendo necessária outra purificação.

### 3.2.4.3 Extrato Metanólico dos Frutos (EMFt)

#### 3.2.4.3.1 EMFt – Fração Extrato Metanólica PA

O fracionamento cromatográfico do extrato Metanólico bioativo (0,23 g) foi inicialmente submetida a coluna cromatográfica de sílica gel eluída com AcOEt e MeOH em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 55 frações de 30 mL cada. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com os seus respectivos Rfs (Tabela 12).

Ao se realizar CCD do EMFt obtiveram-se substâncias isoladas com com necessidade de outra purificação, obteve-se as frações F-5 substância de cor marron escura, pegajosa-decodificada A02, F-7 substância amarelo queimado, forma de cristais- decodificada A03 e F-9 substância marron claro, pegajoso, decodificada como A05 (Tabela 12).

**Tabela 12** – Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato metanólico do fruto de *A. crassiflora* (EAFt / FMA)

Grupo de Frações (F)	Frações	Massa (mg)	Substâncias Isoladas	Quantidade (mg)
1	1-6	-	Não apresentou substâncias	
2	7-9	1,6	DESCARTE – massa insuficiente	
3	10-22	-	Não apresentou substâncias	
4	23-24	1	DESCARTE – massa insuficiente	
5	25-28	14	<b>A02</b>	
6	29	-	Não apresentou substâncias	
7	30-33	11,9	<b>A 03</b>	
8	34-37	17,2	Necessita mais estudos	
9	38-43	53,8	<b>A05</b>	
10	48-50	16,2	Necessita mais estudos	
11	51-55	55	Descarte - Perfil indeterminado	

#### 3.2.4.3.1 Estudo da fração 9

Ao avaliar a necessidade da realização de uma purificação para eliminação de impurezas realizou-se mais um fracionamento cromatográfico da qual a fração 9 do EMFt foi submetida a coluna cromatográfica de sílica gel eluída com AcOEt e MeOH em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 10 frações de 30 mL cada. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com os seus respectivos R<sub>f</sub>s (Tabela 13).

Na Tabela 13 é apresentada a substância isolada da fração F-9 que ao realizar purificação demonstrou uma substância pura em CCD sendo decodificada como A05. As substâncias que apresentarem-se puras A02 e A03 não obteve-se massa suficiente para purificação e elucidação estrutural.



**Tabela 13** – Relação entre grupos de frações/substâncias isoladas do extrato metanólico do fruto de *Annona crassiflora* (EAFt / FMA / F 9 ), purificação .

Frações	Massa (mg)	Substâncias Isoladas
1-5	45,4	A 05
5-10	-	Descarte - Perfil indeterminado

### 3.3 Identificação e determinação estrutural dos compostos isolados de *A. crassiflora*.

A identificação dos triterpenos inicia-se pela análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , seguida pela de  $^{13}\text{C}$ . Assim, os primeiros indícios da presença de triterpenos são a presença de ligação dupla isolada entre 5 e 6 ppm e a presença de 8 metilas entre 0,8 e 1,7 ppm, nos espectros de RMN  $^1\text{H}$ . Na seqüência, os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT 135°) foram analisados, de maneira a obter a identificação estrutural onde pela análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 6) observou-se a presença de 44 carbonos sendo 4 não hidrogenados quando comparados ao DEPT 135 (Figura 7) indicando provavelmente uma mistura esteroidal, contendo no mínimo dois esteróides. Comparando-se com os dados descritos na literatura, verificou-se concordâncias entre EFAH-1 e SFAH-1 com os deslocamentos químicos atribuídos às substâncias e os respectivos sinais dos esteróides Estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol (Tabela 14).

O extrato hexânico das folhas de *A. crassiflora* após o fracionamento e identificação por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC, HSQC e COSY forneceu uma mistura das substâncias  $\beta$ -sitosterol (SFAH-1) e estigmasterol (EFAH-1) (Figura 5).

Pelas análises preliminares dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de FAH-1 (Figura 8), pôde-se verificar um padrão característico de triterpenóides, evidenciado pelo sinal em  $\delta$  3,2 atribuível a H-3 em triterpenos 3 $\beta$ -OH, juntamente com vários singletos entre  $\delta$  0,7-2,0 correspondentes a grupos metílicos e observa-se a presença de um singlete largo em  $\delta$ H 5,14, relativo ao hidrogênio (H-6) ligado ao carbono olefínico C-6 de um esteroide e um multiplete em  $\delta$ H 3,62-3,71, correspondente a hidrogênio ligado a carbono oximetínico C-3 e relativo aos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente da mistura esteroidal (EFAH-1 e SFAH-1).

Na região de  $\delta$  0,66 a  $\delta$  2,20 verificou-se os sinais referentes aos hidrogênios metílicos e metilênicos, além de sinais de pequena intensidade em  $\delta$  5,15 (dd, J=15,1 e 8,0 Hz) e em  $\delta$  5,01 (dd, J =15,1 e 8,0 Hz) atribuídos aos hidrogênios vinílicos H-23 e H-22, confirmando a presença do estigmasterol. A identificação do sitosterol pode ser justificada pela forte intensidade dos sinais nas

regiões das metilas em  $\delta$ H 0,66 e entre  $\delta$ H 0,92- 0,84 (Figura 8). Os sinais que foram mencionados podem ser observados no espectro de RMN  $^1$ H obtido da fração 7.3, conforme analisado em literatura (HUNG & YEN, 2001; FALCÃO, 2003; ROCHA & SILVA ET AL., 2007).

Adicionalmente, a identificação de FAH-1 foi ratificada pela análise do espectro de RMN  $^{13}$ C (Figura 6).

### 3.3.1 Determinação estrutural de **FAH-1**

Do estudo fitoquímico e cromatográfico de *A. crassiflora* foi possível o isolamento e identificação de um composto codificado como **FAH-1**, que se apresentou como um sólido amarelado e com coloração azul quando revelado em câmara de irradiação ultravioleta no comprimento de 254 nm .

O composto codificado como **FAH-1** foi obtido da extração ácido-base do extrato hexânico e posterior tratamento cromatográfico (CE) em hexano:diclorometano (1:4) da fração (F7/8), onde foi obtido 11,5 mg de material sólido amorfo amarelo claro, que apresentou única mancha em CCD e solubilidade em clorofórmio.

Os sinais dos carbonos  $sp^2$  C-22 e C-23 do estigmasterol (EFAH-1) foram observados em  $\delta$  138,3 e  $\delta$  129,2, bem como os sinais dos carbonos  $sp^3$  C-22 e C-23 do  $\beta$ -sitosterol (SFAH-1) em  $\delta$  33,9 e  $\delta$  26,0. Observou-se também os sinais em  $\delta$  25,3 e  $\delta$  23,0 referidos como sendo dos carbonos metilênicos C-28 do estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, respectivamente, assim como os sinais em  $\delta$  140,7 e  $\delta$  121,6 característicos dos carbonos olefinicos C-5 e C-6, e o sinal em  $\delta$  71,7 típico de carbono carbinólico atribuído a C-3 de ambos os compostos (Tabela 14). Os dados fornecidos pelas análises de RMN  $^1$ H,  $^{13}$ C e DEPT 135, e comparações com os dados da literatura permitiu-se concluir que o composto FAH-1 trata-se de uma mistura esteroidal de  $\beta$ -sitosterol (SFAH-1), estigmasterol (EFAH-1), substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal.

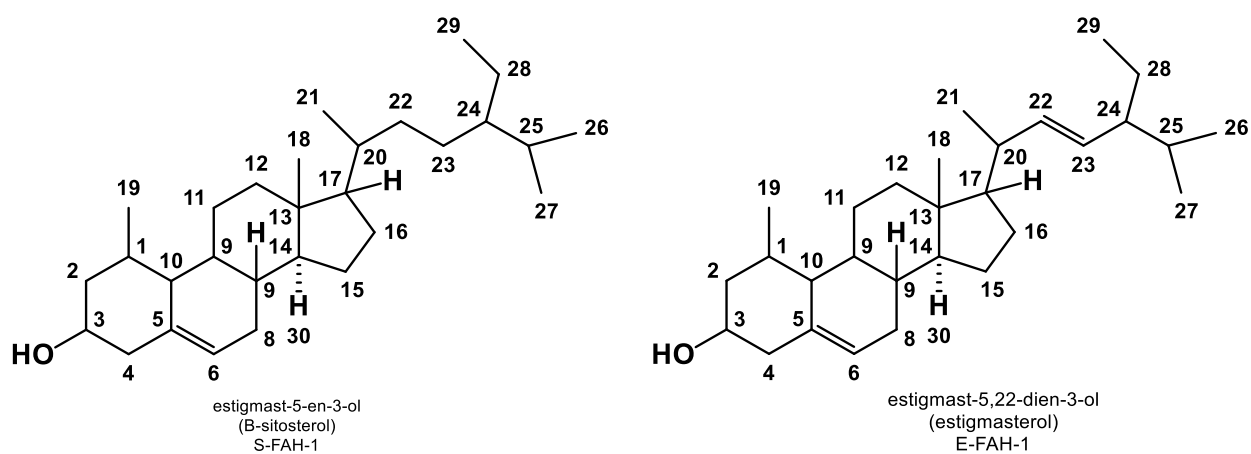
Os terpenos são uma ampla e diversa classe de metabólitos formados pela condensação de unidades de difosfato de dimetilalila. Eles são classificados como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos e tetraterpenos que possuem respectivamente 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 átomos de carbonos em sua estrutura (DEWICK, 2002).

A comparação dos dados de RMN  $^{13}$ C de FAH-1 com os encontrados na literatura para os esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (PEREIRA et al., 2006) permitiu a identificação desta como sendo uma mistura destes esteróides. Esta mistura, apesar de ser amplamente encontrada nos vegetais e bastante descrita na literatura já consta sua obtenção nas folhas de *Annona crassiflora*.

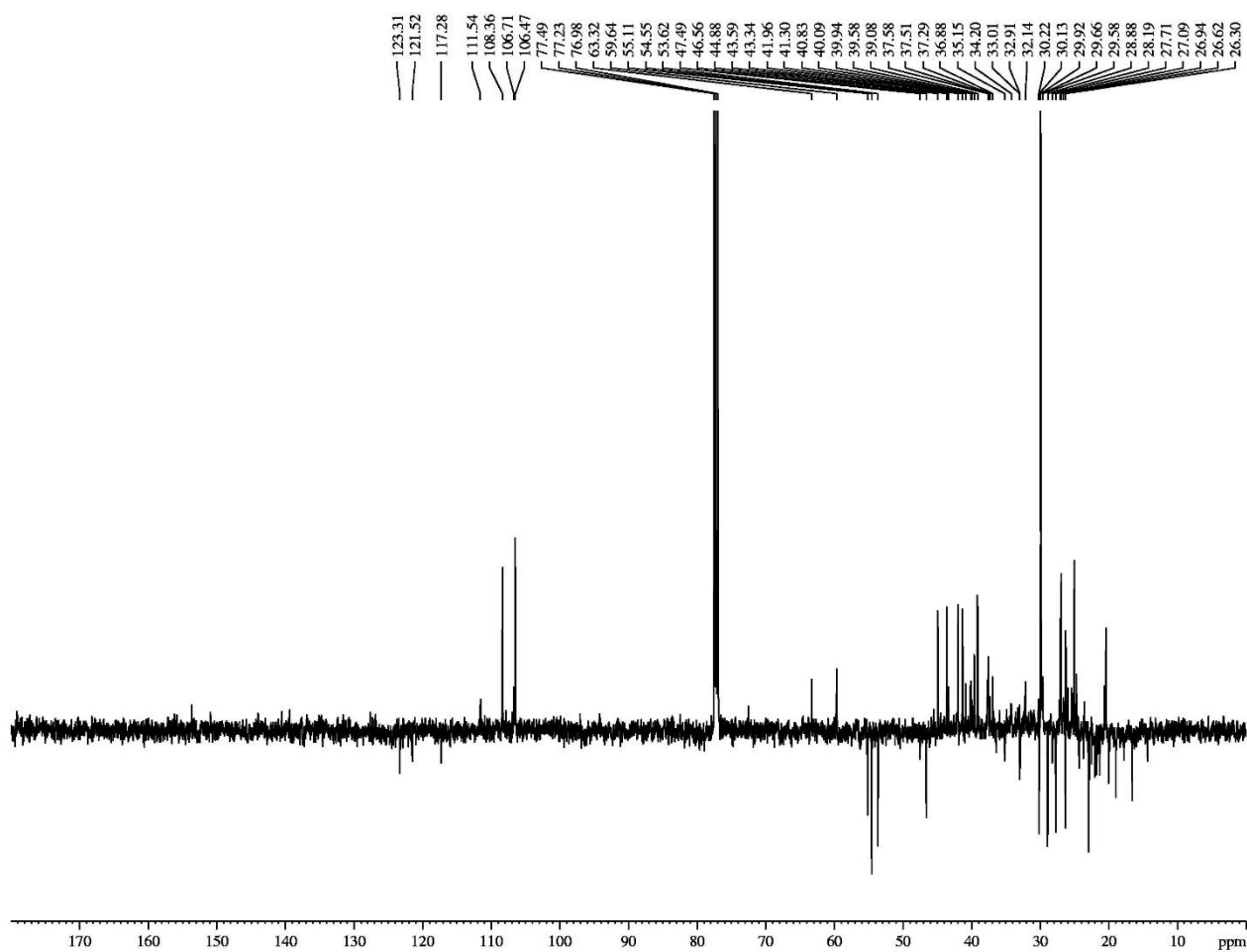
**Tabela 14** - Dados de deslocamento químico ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}$ C (125 MHz,  $CDCl_3$ ) de FAH-1 comparados com os dados da literatura

C	SFAH-1	PEREIRA, 2006	EFAH-1	PEREIRA, 2006
	125, MHz CDCl <sub>3</sub>		125, MHz CDCl <sub>3</sub>	
1	36,7	36,5	37,5	37,2
2	31,9	31,6	31,9	31,9
3	72,0	71,7	72,0	72,1
4	42,5	42,2	37,5	37,2
5	<b>141,32</b>	<b>140,7</b>	<b>138,5</b>	<b>138,3</b>
6	<b>121,52</b>	<b>121,7</b>	<b>121,9</b>	<b>121,7</b>
7	32,1	31,6	32,1	31,9
8	31,9	31,9	31,9	31,9
9	50,4	50,1	50,4	50,1
10	36,5	36,5	36,7	36,5
11	21,3	21,2	21,3	21,2
12	39,9	39,7	39,9	39,7
13	42,5	42,2	42,5	42,2
14	15,7	56,8	57,0	56,8
15	24,5	24,3	24,5	24,3
16	28,5	28,2	28,5	28,9
17	56,2	56,8	56,2	56,8
18	12,3	11,8	12,3	12,2
19	19,6	19,4	19,3	19,8
20	36,4	36,5	40,7	40,5
21	18,9	18,8	21,4	21,2
22	33,9	33,9	<b>139,53</b>	<b>138,3</b>
23	25,6	26,1	<b>123,31</b>	<b>129,2</b>
24	46,0	45,8	51,5	51,2
25	29,1	29,1	32,1	31,9
26	19,6	19,8	19,0	19,4
27	19,0	19,0	21,3	21,2
28	23,3	23,0	25,6	25,4
29	12,3	12,0	12,3	12,2

Deslocamento químico em ppm ( $\delta$ ).



**Figura 5** – Substâncias isoladas das folhas de *Annona crassiflora*: SFAH-1 ( $\beta$ -Sitosterol) e EFAH-1 (Estigmasterol).



**Figura 6** - Expansão do espectro de DEPT (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **FAH-1**

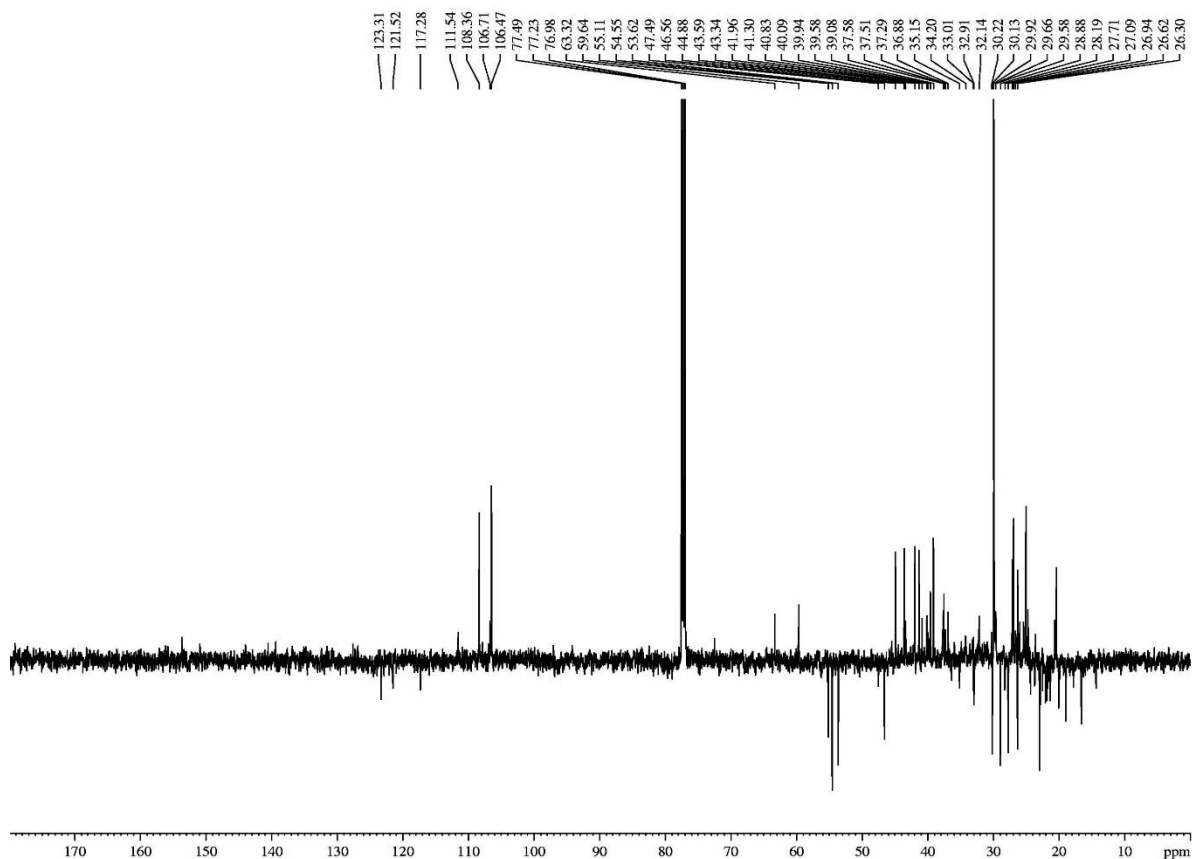


Figura 7 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 $^\circ$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de FAH-1

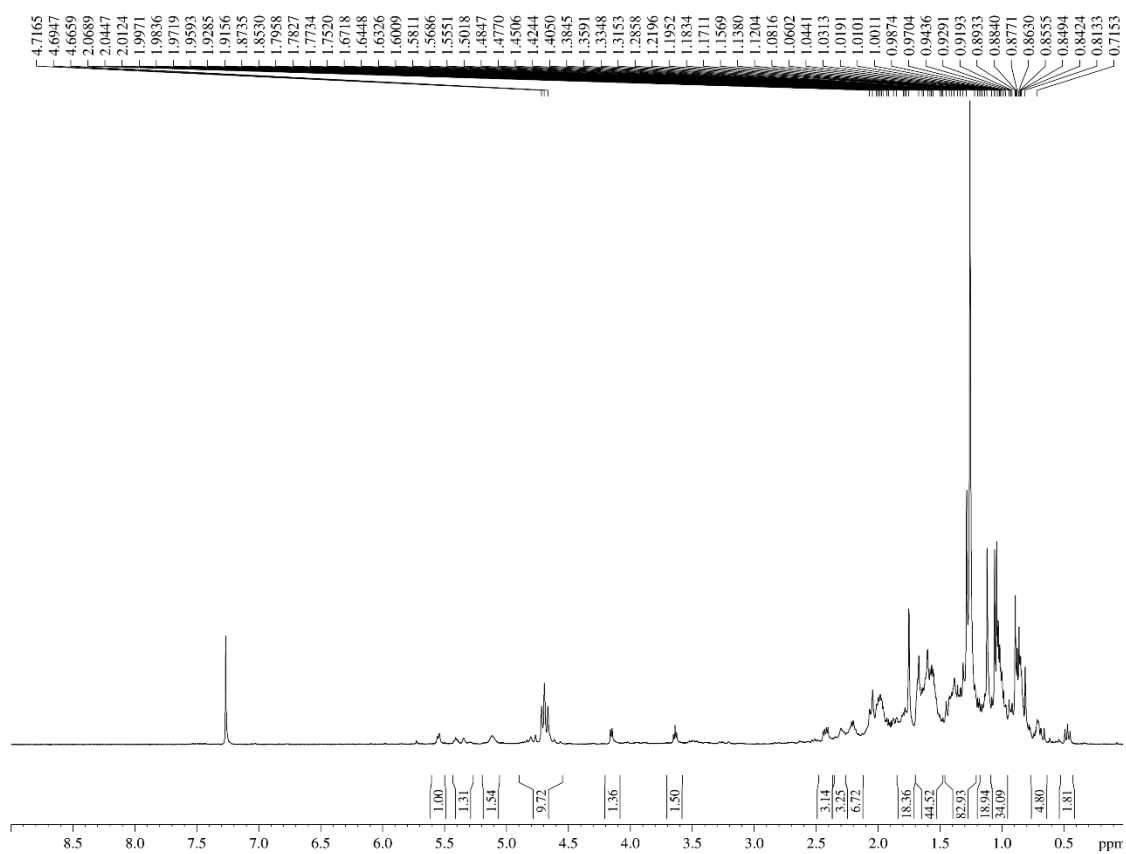


Figura 8 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de FAH-1

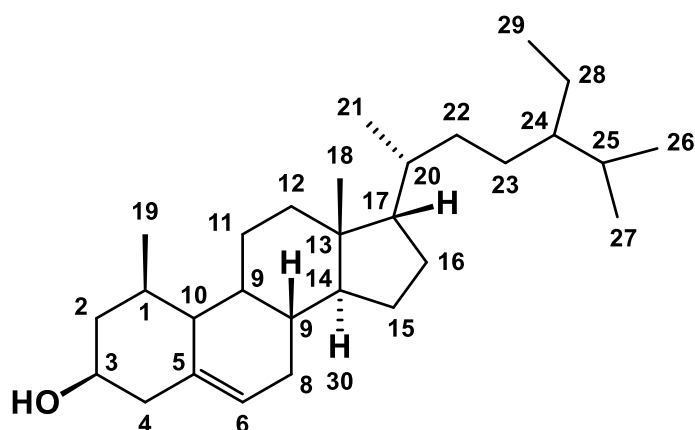
### 3.3.2 Determinação estrutural de FAH-2

O composto codificado como **FAH-2** foi isolado do tratamento ácido e base das folhas de *A. crassiflora* e posterior separação cromatográfica por exclusão molecular obtida da partição (F 7/8) do extrato hexânico. O composto **FAH-2** (9,5 mg) apresentou-se como um sólido amorfo, solúvel em clorofórmio, com única mancha em CCD, o que sugere tratar-se de uma substância pura (Figura 9). **FAH-2** apresentou resultado negativo para inibição da AChE.

Observam-se, no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), figura 10, um sinal duplo em  $\delta$  5,35 e, em  $\delta$  3,55 (Figura 11) um hidrogênio com sinal múltiplo. O sinal  $\delta$  0,68 é atribuído a hidrogênio metílico ( $\text{CH}_3$ -18) e  $\delta$  0,85-0,89 ( $\text{CH}_3$ -26;  $\text{CH}_3$ -27;  $\text{CH}_3$ -29), figura 12, sinal duplo  $\delta$  0,93 ppm característico da  $\text{CH}_3$ -21, e ainda em  $\delta$  1,02 ppm característico de metila  $\text{CH}_3$ -19 (Figura 13).

A análise dos dados obtidos no RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , juntamente com os dados da literatura (AWAD & FINK, 2000; ROBINSON, 1991), indicou que o composto **FAH-2** trata-se de um fitoesteróide. Os sinais de esteróides são caracterizados em  $\delta$  0,60-2,27 ppm, referentes a hidrogênios de carbonos saturados.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (Figura 14), observou-se a presença de um sinal em  $\delta$  121,99, referente a carbono  $\text{sp}^2$  (C-6). Essas informações sugerem uma substância de fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  e possibilitam deduzir que **FAH-2** é o fitoesteróide conhecido por  $\beta$ -sitosterol.



**Figura 9** – Estrutura química do  $\beta$ -sitosterol (**FAH-2**)

**Tabela 15** - Dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da Substância **FAH-2** e valores da literatura (GRECA, *et al.*, 1990)

Carbonos	FAH-1 ( $\delta$ ) $\beta$ -Sitosterol	$\beta$ -Sitosterol ( $\delta$ )
C-1	37,45	37,33
C-2	29,92	31,63
C-3	72,04	71,73
C-4	42,53	42,2
C-5	140,99	140,70
C-6	121,94	121,61
C-7	32,14	31,93
C-8	31,9	31,81
C-9	50,37	51,13
C-10	36,74	36,43
C-11	21,3	21,09
C-12	40,0	39,79
C-13	42,55	42,37
C-14	57,0	56,02
C-15	24,5	24,15
C-16	28,47	25,25
C-17	56,29	56,1
C-18	12,09	11,84
C-19	19,26	19,46
C-20	36,37	36,07
C-21	18,93	18,68
C-22	34,18	33,95
C-23	26,32	26,10
C-24	46,08	45,82
C-25	29,3	29,15
C-26	19,62	19,77
C-27	19,12	19,21
C-28	23,30	23,13
C-29	12,21	11,04

( $\delta$ ) Deslocamento químico em ppm.

O  $\beta$ -sitosterol (Figura 9) tem sido frequentemente encontrado em folhas de *A. muricata* e *A. senegalensis*, nas sementes, casca e raízes de *A. squamosa*, frutos e sementes de *A. cherimolia* (RAO *et al.*, citados por LEBOEUF, 1982) e em *A. crassiflora* (PIMENTA, 1995).

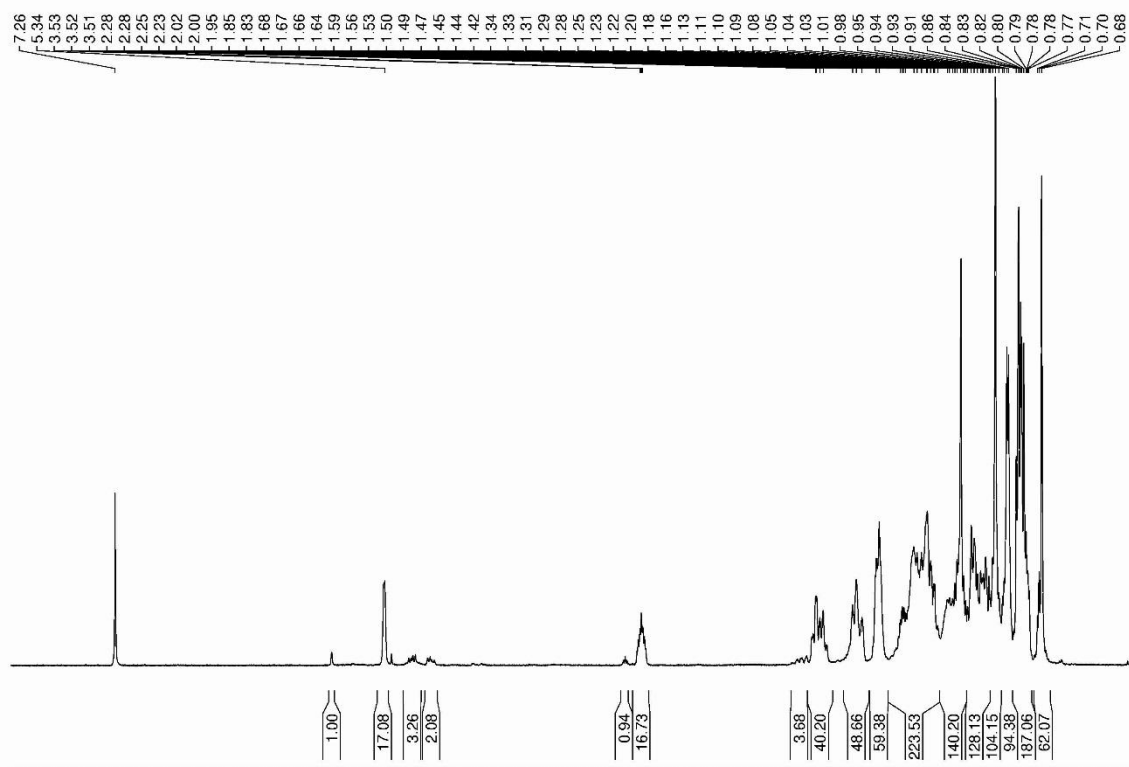


Figura 10 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de FAH-2

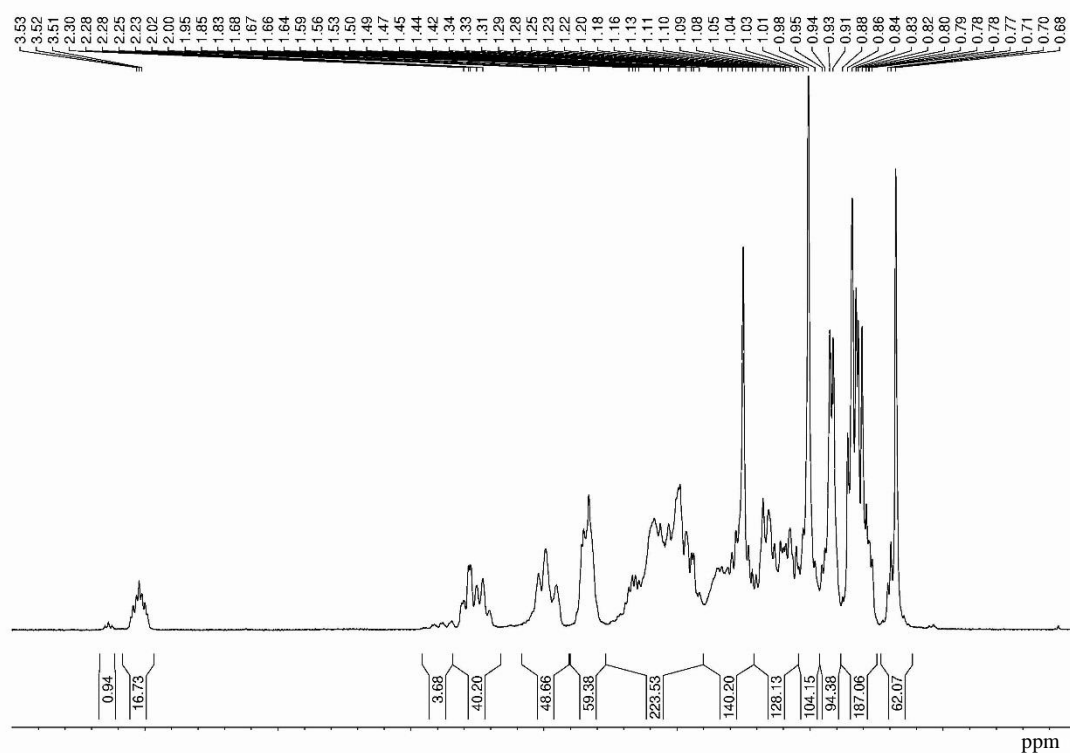


Figura 11 - Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de FAH-2



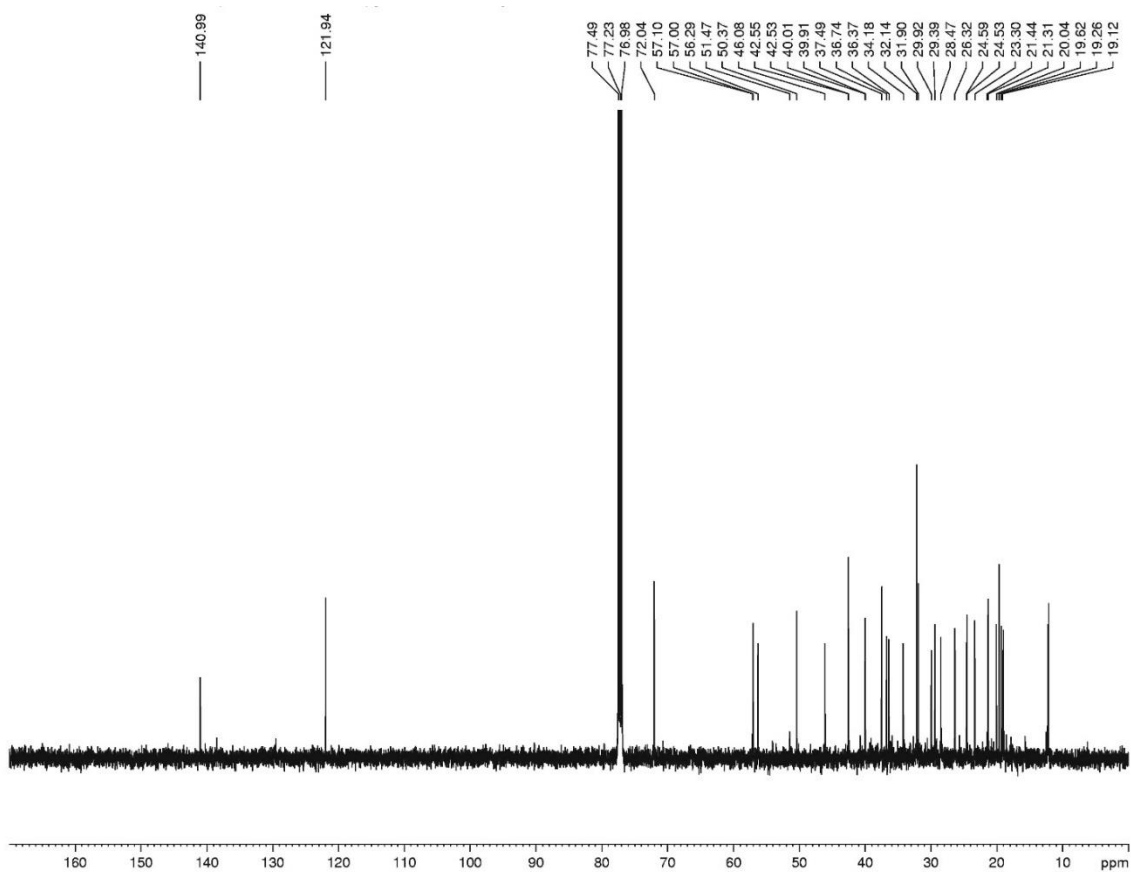


Figura 12 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de FAH-2

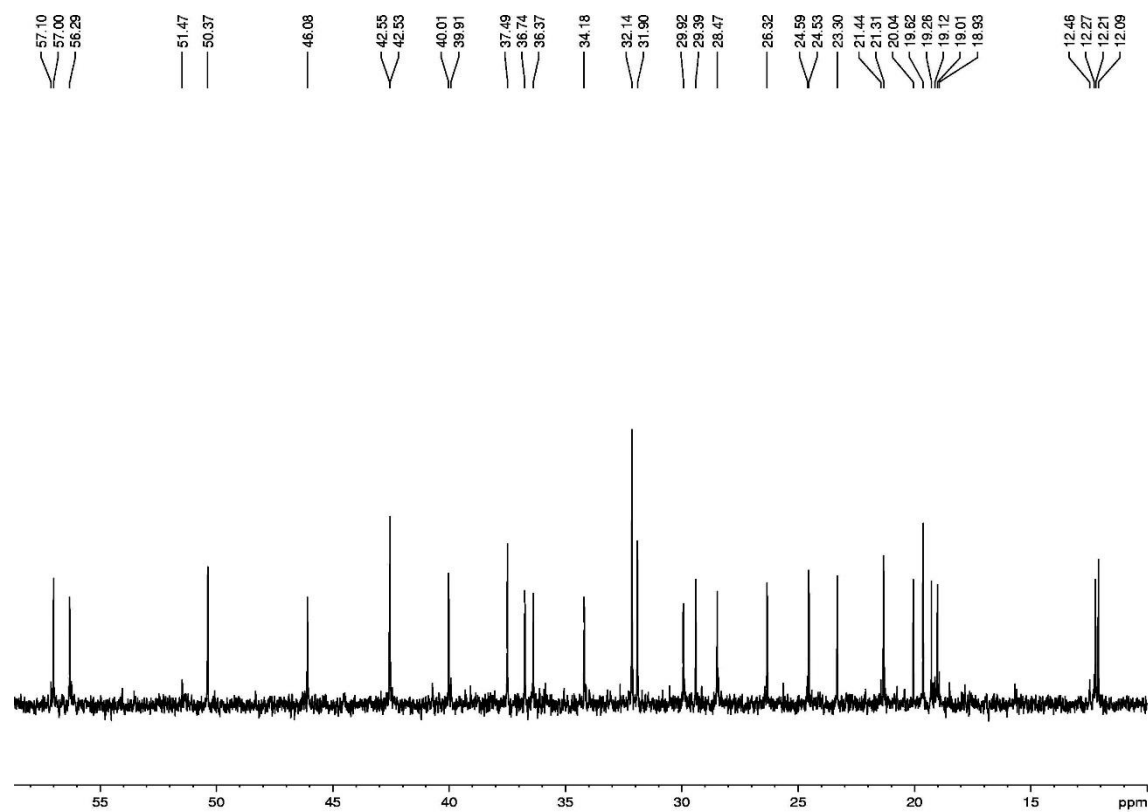
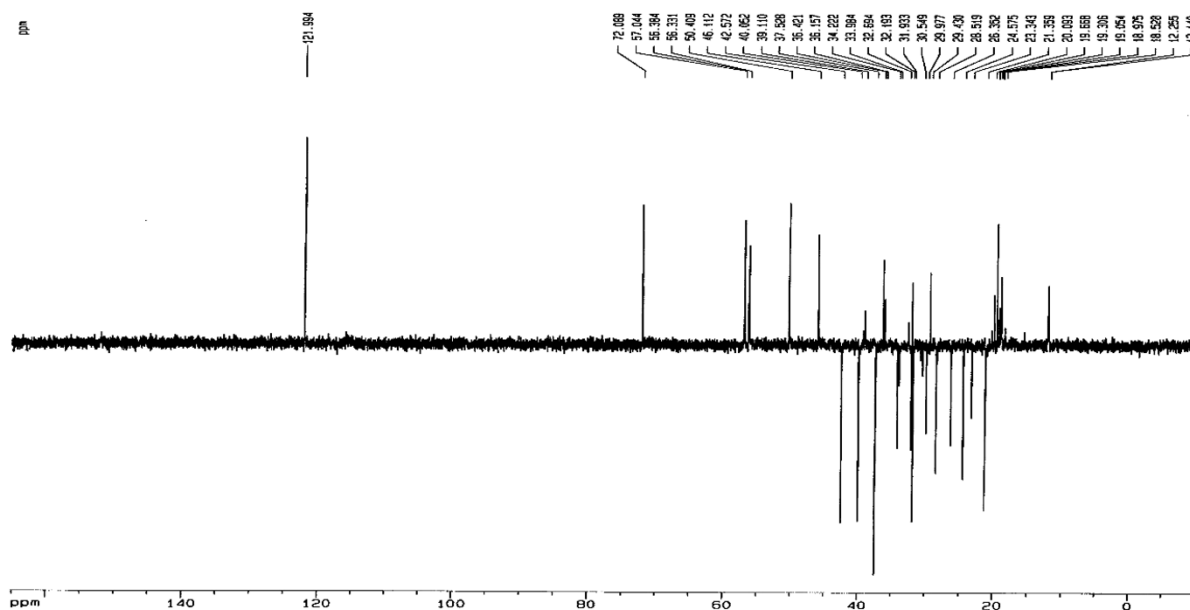


Figura 13 - Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de FAH-2



**Figura 14** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **FAH-2**

### 3.3.3 Determinação estrutural de A05

A cromatografia por exclusão (Sephadex G-25) proveniente do fracionamento cromatográfico da fração F(9/38-43) do extrato metanólico da polpa dos frutos, levou ao isolamento de 53,4 mg de um sólido amarelo escuro solúvel em metanol, denominada de **A05**.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de A05 (Figura 16) revelou sinais na região de aromático em  $\delta\text{H}$  6,91 (s), 6,35 (d) e 6,18 (d) (Figura 17) estes últimos associados a hidrogênios *meta* posicionado, sinais na região de açucars em  $\delta\text{H}$  5,30 (d), associado a hidrogênio anomérico, em  $\delta\text{H}$  3,78 (d) 3,75 (d) e 0,97 (d) associados a hidrogênios em conformação equatorial, além dos sinais múltiplos em  $\delta\text{H}$  3,90; 3,52 e 3,32 (Figura 18) que completam a hexose.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{MeOD}$ ) de A05 (Figura 19) mostrou um sinal típico de carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada em  $\delta\text{C}$  178,2, quatro sinais característicos de carbonos aromáticos oxigenados em  $\delta\text{C}$  164,68; 161,76; 157,97 e 157,06, dois sinais intensos em  $\delta\text{C}$  145,41 também associados a carbonos oxigenados, um sinal em  $\delta\text{C}$  108,11 bastante intenso atribuído a carbonos hidrogenado, seis sinais típicos de flavonóis tetra-substituídos em  $\delta\text{C}$  136,0; 134,85; 120,46; 108,11; 104,87 e 93,28, um sinal intenso em  $\delta\text{C}$  63,31 associados a carbonos oximetílico e sinais em  $\delta\text{C}$  47 associados a metoxilas, além dos sinais característicos da raminose em 98,43; 71,91; 70,68; 70,59; 70,44 e 16,23.

A análise comparativa do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  com o DEPT 135 (Figura 20) de A05 revelou 10 sinais de carbonos não hidrogenados, sinais de carbonos metínicos típicos de monossacarídeo em  $\delta\text{C}$  98,43; 71,91; 70,68; 70,59; 70,44, além de carbonos metílicos  $\delta\text{C}$  47,94, 47,63 e 16,23 e um carbono metílico em  $\delta\text{C}$  que é típico do açúcar raminose. Observou-se um sinal em  $\delta\text{C}$  108,11 ppm, associado aos carbonos em posição *orto no* anel B e os sinais em  $\delta\text{C}$  102,19 e 94,83 associados a carbonos hidrogenados pertencente ao anel aromático A com substituições nas posições *orto e para*.

Os demais sinais da unidade do carboidrato foram confirmados pela presença de correlação no espectro HMQC (Figura 21) entre os seguintes sinais:  $\delta\text{C}$  70,44 (C-2'') /  $\delta\text{H}$  4,21 (dd; H-2'') e  $\delta\text{C}$  70,68 (C-3'') /  $\delta\text{H}$  3,78 (dd; H-3''), um carbono metílico (grupo metila da raminose em  $\delta\text{C}$  16,09 correlacionando com o sinal em  $\delta\text{H}$  0,94 (d), sinal de carbono oximetílicos ( $\text{OCH}_3$ ) em  $\delta\text{C}$  63,31 (C-3' e C-5'). O sinal em 102,08 foi atribuído ao carbono anomérico C-1'', que apresentou sinal de correlação com  $\delta\text{H}$  5,30 (d) atribuído ao H-1'' no espectro de HMQC (Figura 22) e os hidrogênios e carbonos aromáticos: H-2' /  $\delta\text{C}$  108,11 e H-6' /  $\delta\text{C}$  108,11 atribuídos a um intenso sinal em  $\delta\text{H}$  6,91 (s) no RMN  $^1\text{H}$  semelhante aos H-6 ( $\delta\text{H}$  6,35 dd) /  $\delta\text{C}$  94,83 e H-8 ( $\delta\text{H}$  6,18 dd) /  $\delta\text{C}$  94,83 correlacionados ao espectro de HMQC (Figura 23). Os dados de RMN obtidos para esta substância corroboram os valores descritos na literatura para derivado do flavonól miricetina. (AGRAWAL, 1989, MAHMOUD, *et al.*, 20001)

A análise dos dados permitiu sugerir a estrutura de um flavonóide glicosilado na posição C-3 com o anel B tetra substituído. A comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de A05 com os dados da literatura para este tipo de esqueleto permitiu confirmar a estrutura com sendo um derivado da miricetina (MAGURO *et al.*, 2004), Tabela 16.

**Tabela 16** - Dados de deslocamento químico ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de A05, comparados com os dados da literatura

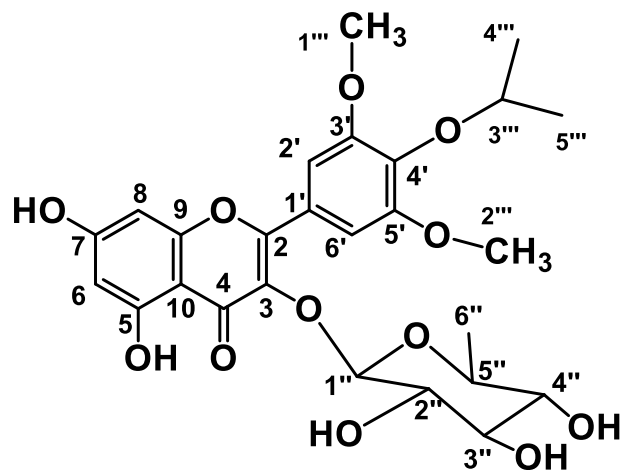
Nº	A05	MANGURO et al., 2004
	C (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	C (200 MHz $\text{CD}_3\text{COD}$ ) – Miricetrina-3- <i>O</i> -raminosídeo
2	158,9	159,2
3	134,8	136,1
4	178,2	179,5
5	161,7	163,1
6	98,4	99,7
7	164,8	164,0
8	94,8	94,6
9	158,0	158,4
10	104,8	105,6
1'	122,1	121,7
2'/6	108,1	109,4
3'/5	145,4	146,7
4'	136,6	137,7
1''	102,	103,5
2''	71,9	71,7
3''	70,6	72,0
4''	70,5	73,2
5''	70,4	71,9
6''	16,2	17,5
1'''	63,3	-
2'''	63,3	-
3'''	47,8	-
4'''	23,8	-
5'''	23,8	-

( $\delta$ ) Deslocamento químico em ppm.

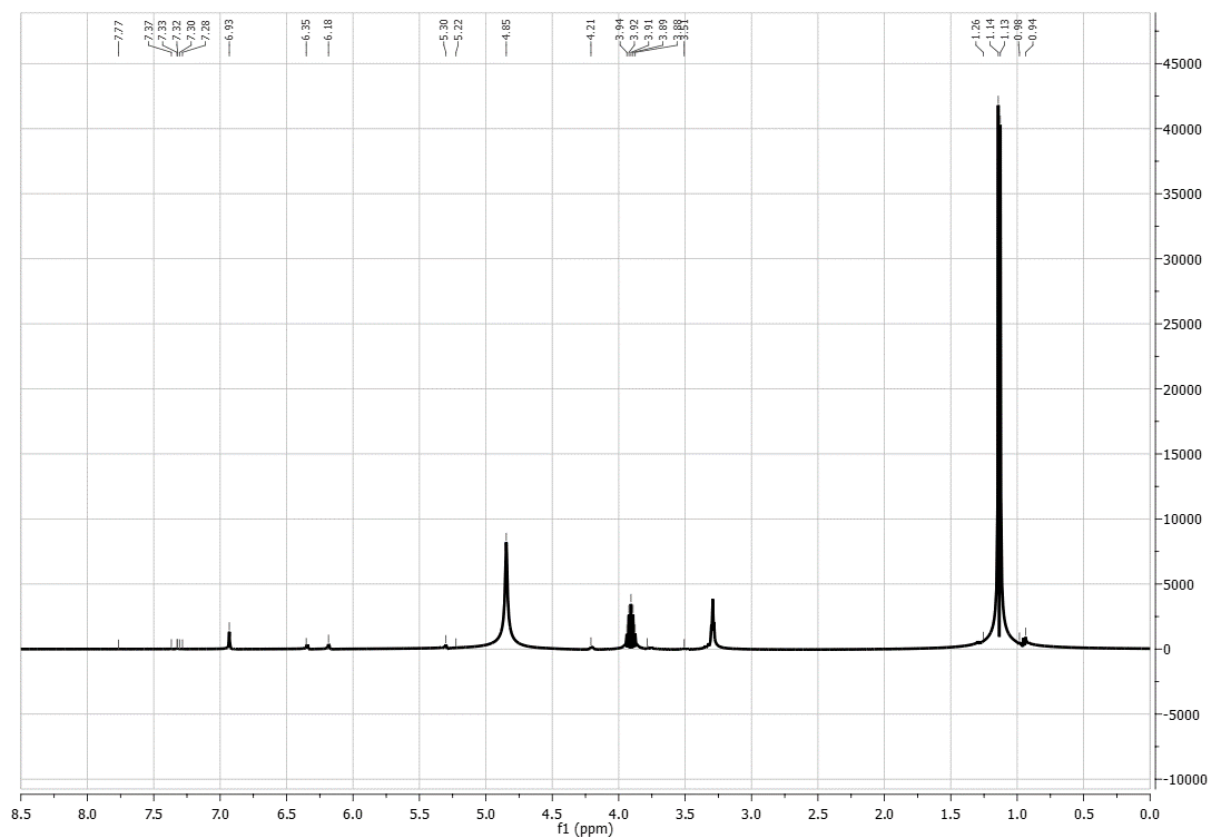
Os flavonoides são uma classe muito extensa de produtos naturais distribuída no reino vegetal e são substâncias redutoras (SIMÕES et al., 2004) derivados das chalconas. Ocorrem nas plantas em uma variedade de formas estruturais, todas contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo básico (HARBONE, 1984). Eles derivam compostos químicos com esqueletos do tipo flavonas, flavonóis, antocianidinas e catequinas, entre outros (DEWICK, 2002), estão presentes em todas as partes das plantas, desde raízes até as flores e frutos. Ocorrem de forma livre (aglicona) ou ligados a açúcares (glicosídeos). Muitos são coloridos (amarelos), atuando na atração de insetos para a polinização de plantas (YAO et al., 2004).

As classes de flavonoides mais abundantes no gênero *Annona* são os flavonóis e seus derivados glicosilados, estando presentes tanto os O-glicosídeos como os C-glicosídeos

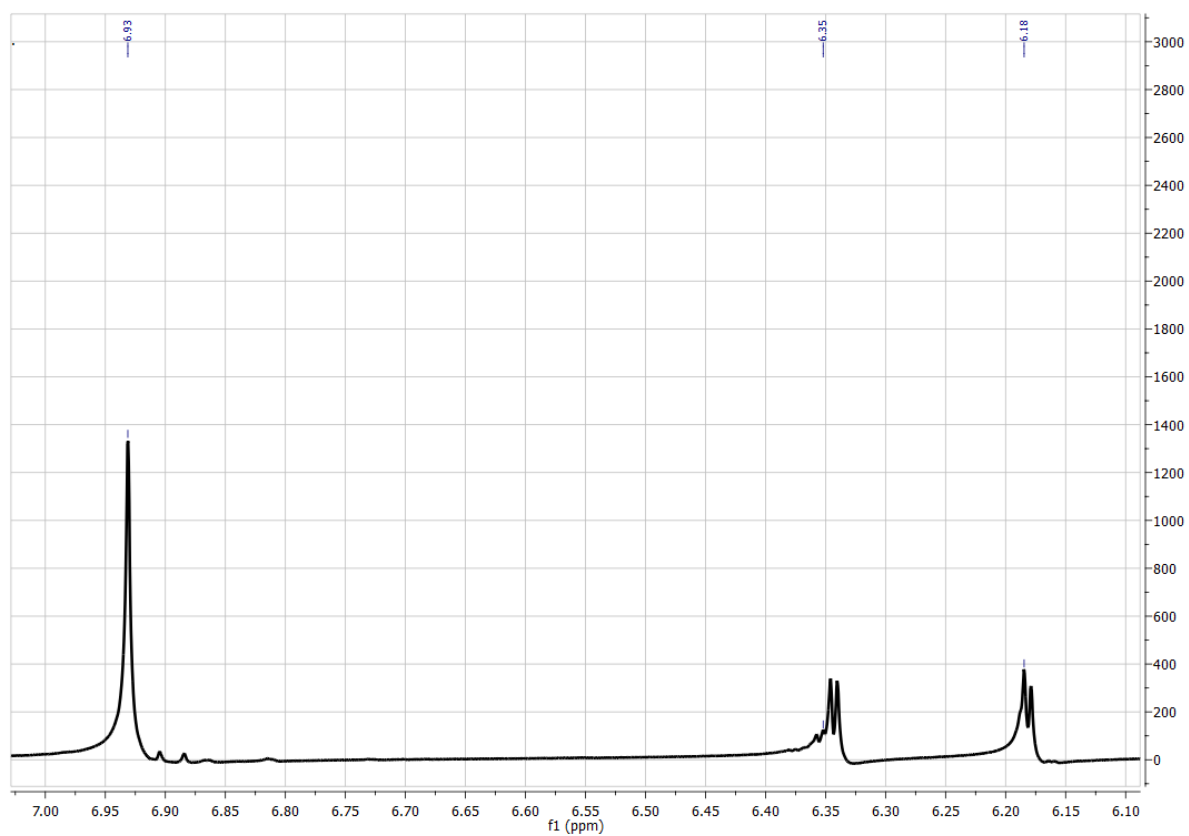
(SANTOS e SALATINO, 2000). Os flavonoides glicosilados: Kaempferol-3-O-galactosídeo, kaempferol-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-arabinosídeo, quercetina-3-O-arabinosilarabinosídeo e quercetina-3-O-arabinosilgalactosídeo. A substância isolada, A05 (Miricetina-3',5'-dimetoxi-4'-isopropoxi-3-O-raminosídeo) é um flavonol inédito isolado dentro da espécie derivado do núcleo da miricetina.



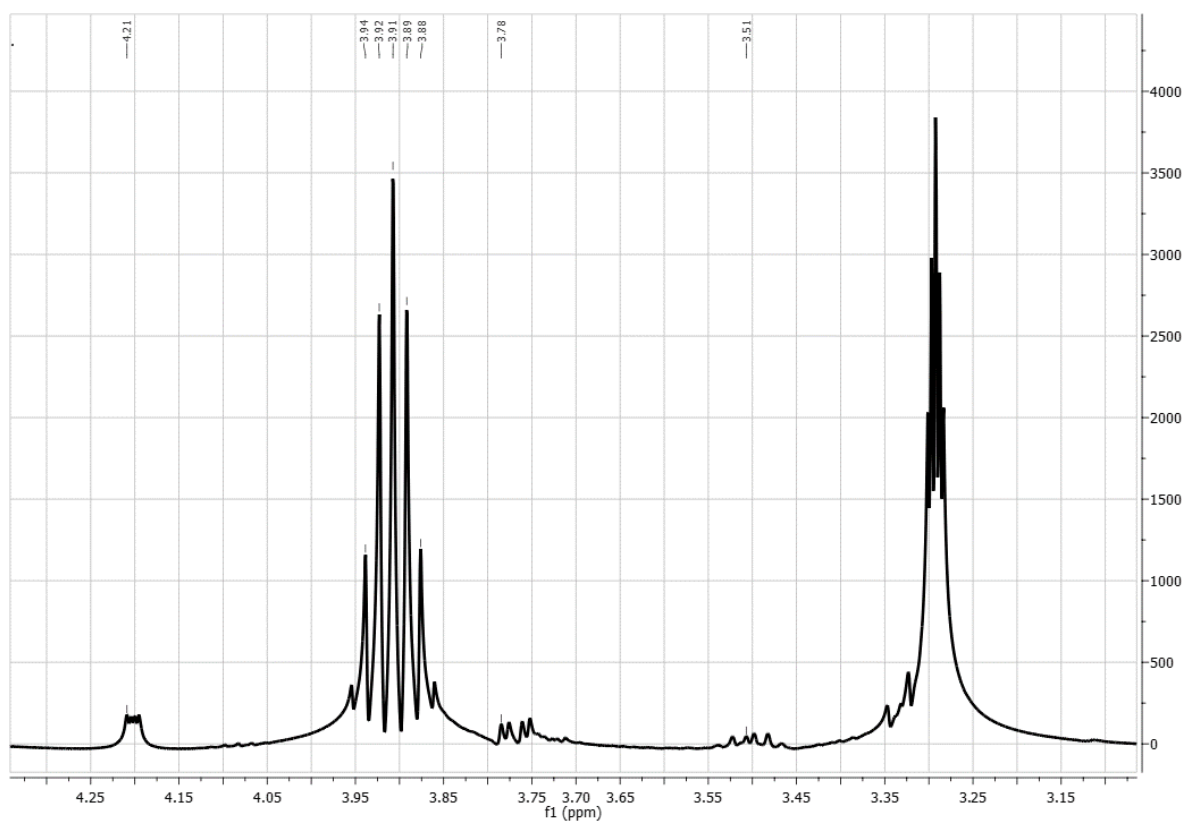
**Figura 15-** Estrutura da Miricetina-3',5'-dimetoxi-4'-isopropoxi-3-O-raminosídeo (A05)



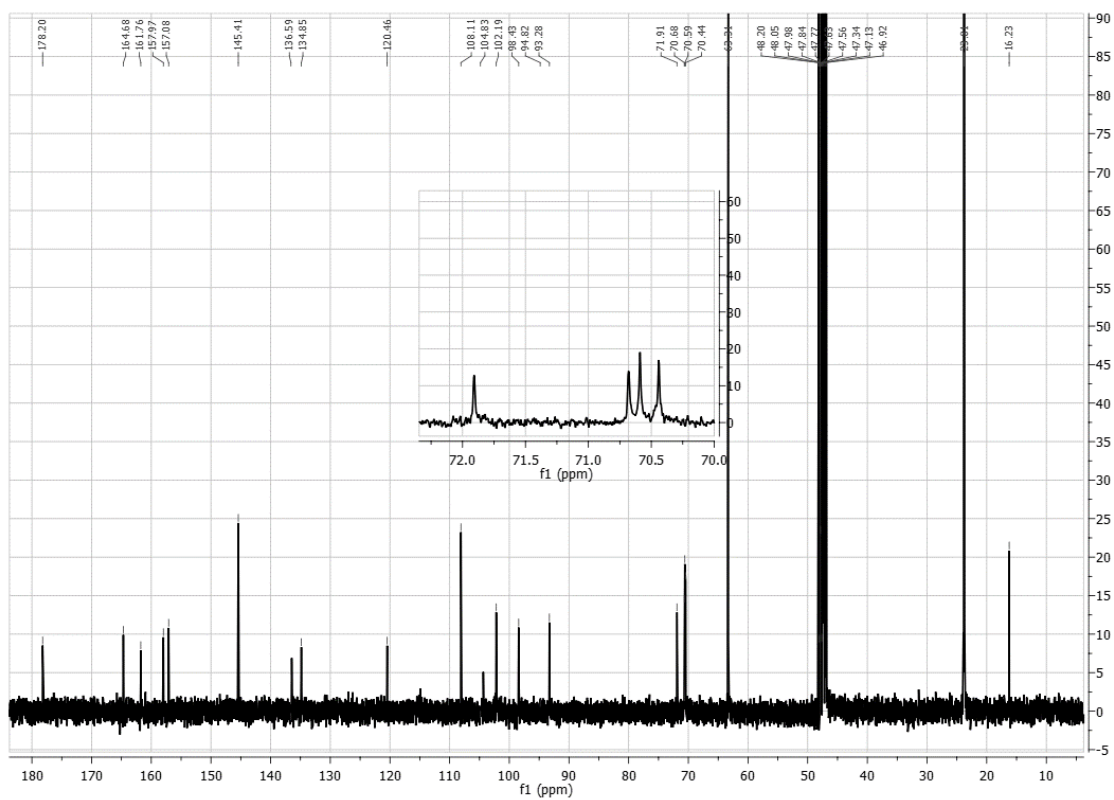
**Figura 16** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de A05



**Figura 17** - Expansão Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de A05



**Figura 18** - Expansão Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de A05



**Figura 19** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de A05

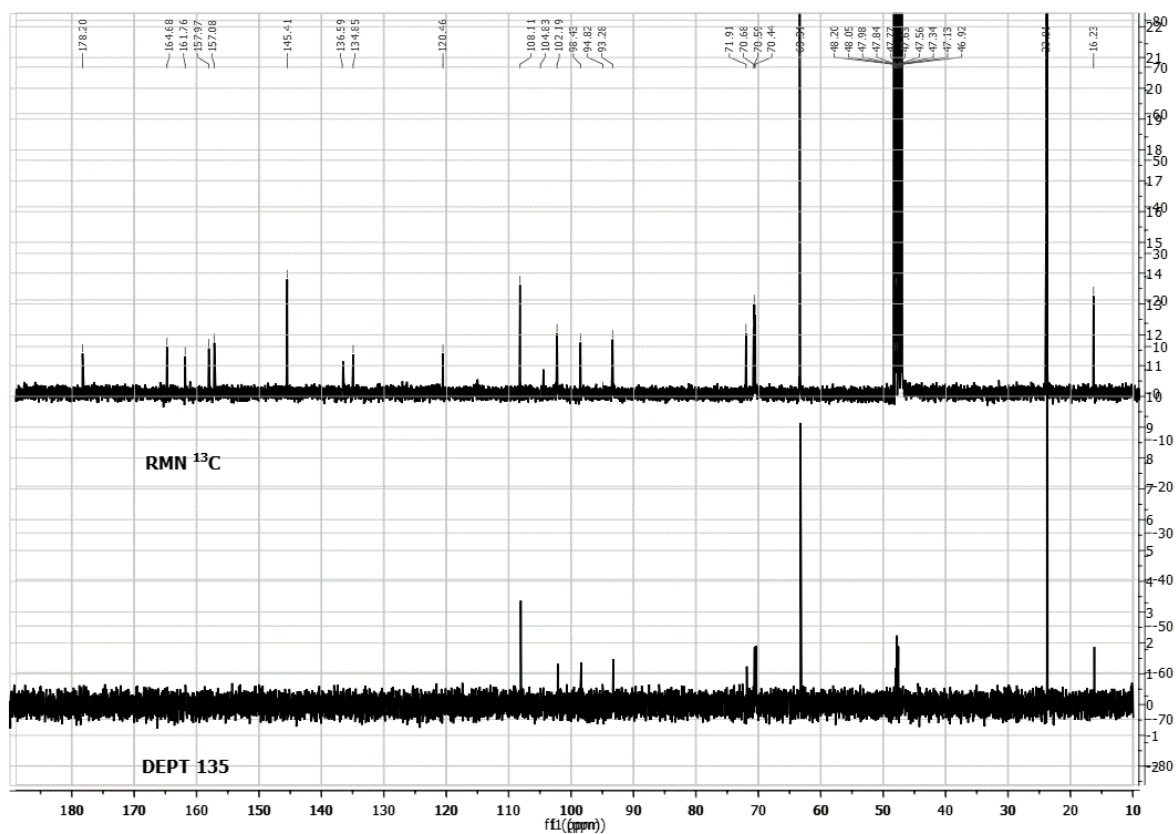


Figura 20 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (100 MHz, CD $_3$ OD) de A05

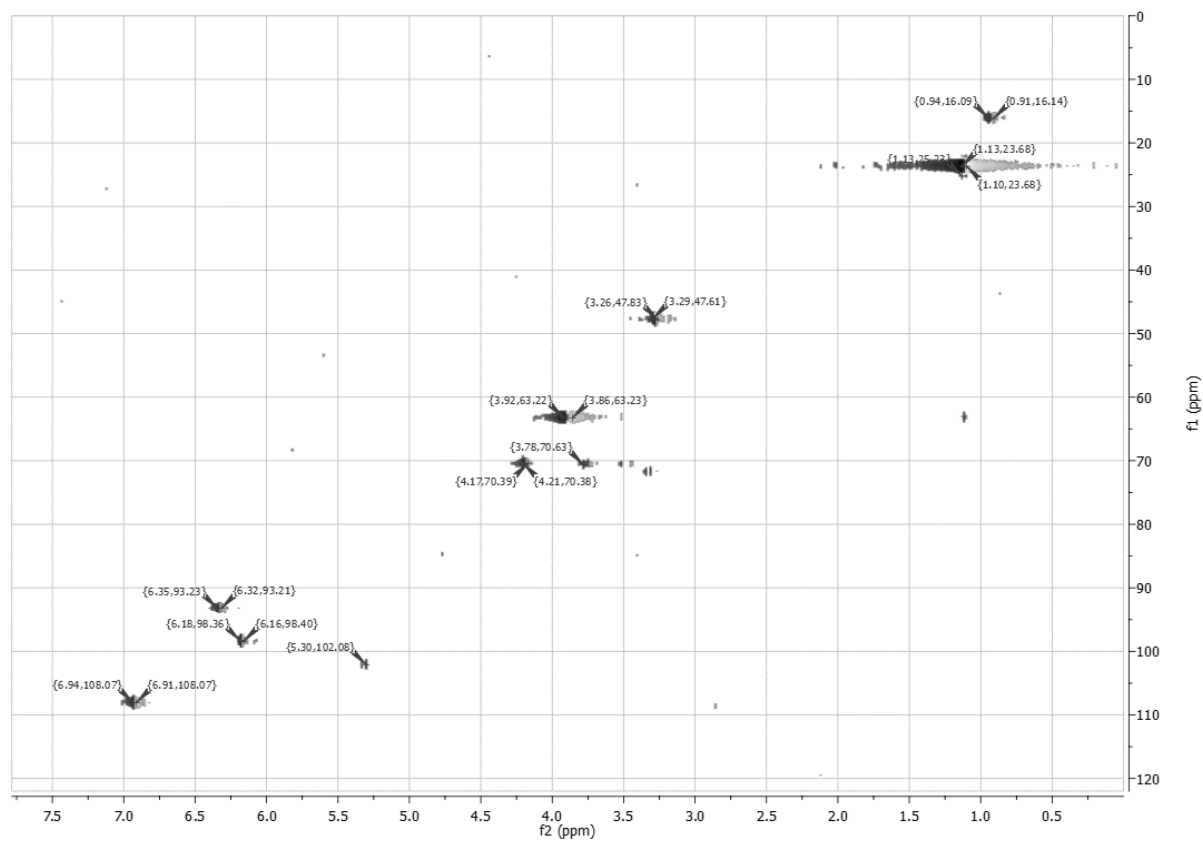
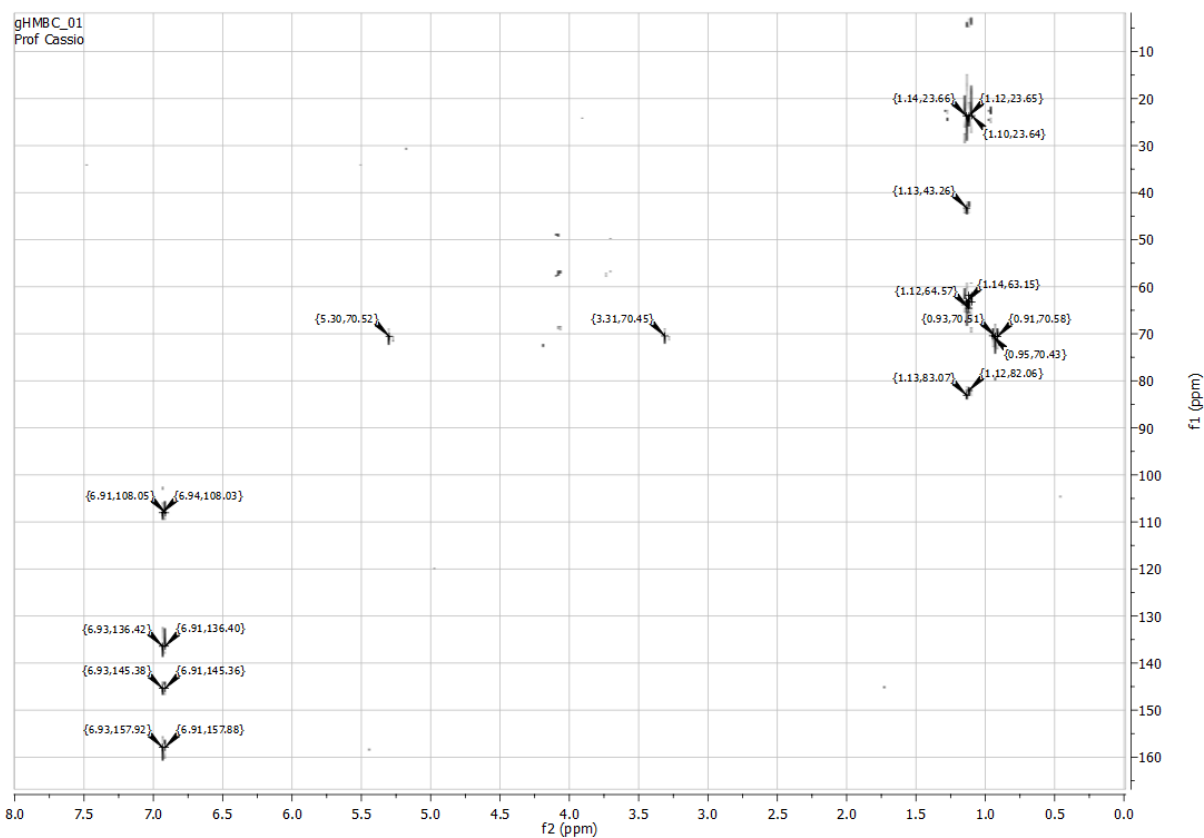
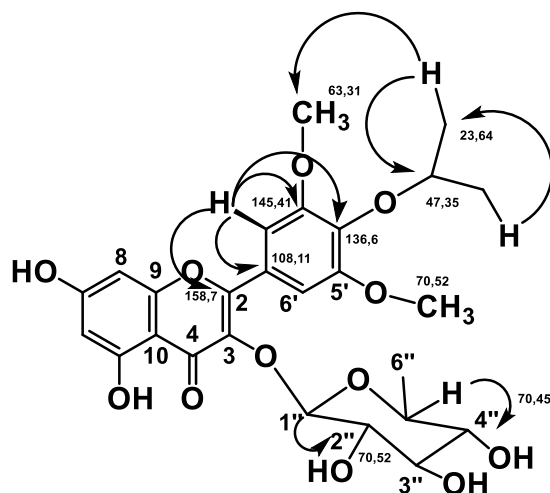


Figura 21 - Espectro de RMN 2D-HMBC (500 x 125 MHz) de A05





**Figura 22** - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (500 x 125 MHz) de A05

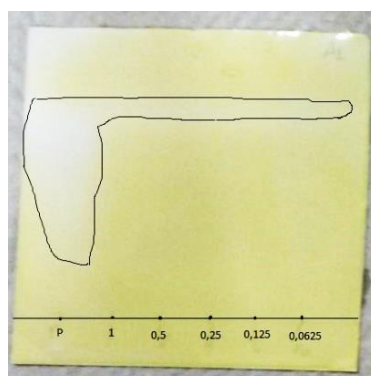


**Figura 23** - Correlações espectros de HMBC

### 3.4 Ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE

Através do ensaio de Elman et al. (1961), foram detectadas as placas de CCD que apresentaram inibição da enzima AChE (ver tabela 17), que revelaram manchas brancas sobre a superfície amarela, assim como o padrão (cafeína), essas manchas indicam a inibição da enzima AChE. Isso pode ser observado na figura 24.

**Figura 24** – Ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE



Através do ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE das substâncias do fruto, obteve-se resultado positivo para as substâncias isoladas que foi realizado o teste, exceto a amostra A 03 que apresentou resultados inconclusivos. O resultado deste teste é apresentado na Tabela 17.

**Tabela 17** – Teste para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE das substâncias do fruto

Substâncias	Resultado
A02	Positivo
A03	Positivo
A05	Não conclusivo
A08	Positivo
A09	Positivo

O ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE realizado para os extratos das folhas apresentaram resultado positivo, conforme visto na Tabela 18.

**Tabela 18** – Teste para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE das substâncias do fruto

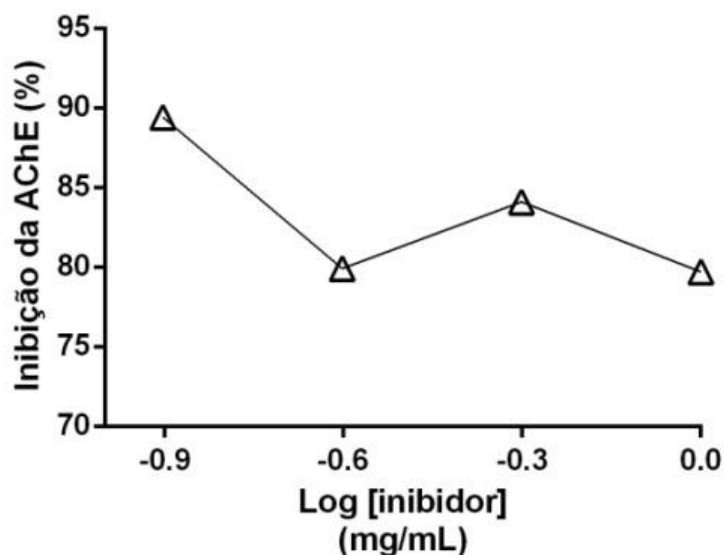
Extrato	Resultado
Hexânico	Positivo
Metanólico	Positivo

### 3.5 Ensaio para detecção de inibição quantitativa da enzima AChE dos extratos das folhas

Na Tabela 19 podem ser observados os valores de inibição quantitativa dos extratos realizados em espectrofotômetro. No Gráfico 2 é visto o resultado do extrato metanólico (EM).

**Tabela 19** - Ensaio para detecção de inibição quantitativa da enzima AChE

Extrato	Inibição enzimática (%)
Hexânico	em análise
Metanólico	79,7



**Gráfico 2** – Inibição quantitativa para o EM das folhas de *A. crassiflora* sobre a enzima AChE.

Os resultados analisados para o cálculo de  $CI_{50}$  (Gráfico 2) dos extratos mostraram-se promissores, uma vez que extratos cuja inibição enzimática seja maior ou igual a 50% são

considerados candidatos a futuros fracionamento e isolamento de inibidores da AChE. Em outros estudos analisou-se um *screening* feito com plantas coletadas no Nordeste do Brasil, onde o EM das folhas ( $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) apresentou 43, 69, 71 e 73% de inibição para as espécies *Senna reticulata*, *Leucaena leucocephala*, *Caesalpinia ferrea* e *Gossypium herbaceum*, respectivamente<sup>9</sup>, sendo esses valores comparáveis aos do EM das folhas de *A. crassiflora* o qual mostrou maior inibição sobre a AChE em menor concentração do que a testada nas espécies citadas. O EM apresentou concentração inibitória de 50% da amostra ( $CI_{50}$ ) =  $252,1 \pm 2,15 \text{ mg.mL}^{-1}$  e as análises do extrato hexânico continuam em realização.

## 4 CONCLUSÃO

O estudo dos extratos das folhas, frutos e frações de *A. crassiflora* apresentaram resultado positivo para a presença de alcaloides e compostos nitrogenados revelados com o reagente de Dragendorff, sendo um resultado promissor visto que o medicamento mais utilizado no tratamento da doença de Alzheimer é um alcaloide (galantamina) isolado de plantas.

Os resultados obtidos no teste de citotoxicidade sugerem que a espécie *A. crassiflora* apresenta compostos pesticidas e antitumorais. Estudos posteriores irão fornecer as estruturas destes compostos ativos bem como atividades biológicas e farmacológicas potenciais.

Pode-se observar potencial de inibição citotóxica do fruto da espécie *A. crassifolia*, uma espécie típica do bioma Cerrado brasileiro. O extrato apresentou melhor resultado ao ser realizado o teste com células de leucemia pro-mielocítica (HL 60) com inibição de 83,8%. Esses trabalhos possibilitam a escolha de melhores métodos e estratégias a serem utilizados na busca de novos compostos antineoplásticos com atividades biológicas com um grau bem menor de toxicidade, os quais no futuro podem contribuir para o isolamento, identificação e aplicabilidade em diferentes áreas, bem como: farmacêuticas, alimentícias, agrônômicas, etc.

Através do estudo fitoquímico foi possível isolar do extrato dos frutos e folhas 6 compostos com a identificação das substâncias codificadas como A05, FAH-1, FAH-2 que por RMN unidimensionais e bidimensionais foi possível identificar, um flavonol (Miricetina-3',5'-dimetoxi-4'-isopropoxi-3-O-raminosídeo), uma mistura de sesquiterpenos ( $\beta$ -Sitosterol, Estigmasterol e 24-metilenocicloartanol) e o  $\beta$ -Sitosterol puro.

O extrato metanólico das folhas da espécie *A. crassiflora* demonstrou promissor potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase fortalecendo a importância desta espécie para fins medicinais e sugerindo sua futura aplicação em formulações para uso na terapêutica da DA. Muitas frações apresentaram resultado positivo para a inibição da enzima AChE, logo este estudo se mostrou promissor para a continuidade dos trabalhos que levem ao isolamento e caracterização destas substâncias.

## PERSPECTIVAS

- Contribuir para o estudo químico e biológico de espécies da família Annonaceae.
- Os estudos *in vivo* com extratos ou compostos isolados constitui em uma etapa promissora para a busca de novos fitofármacos.
- Elucidação estrutural substâncias isoladas dos compostos ativos de *A. crassiflora*
- Estudo das atividades biológicas e farmacológicas potenciais
- Ensaio *in vivo* em modelos experimentais de DA;
- Estudos toxicológicos *in vivo* amplos;
- Elaboração de Complexo de inclusão com ciclodextrinas

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K.; Carbon-13 NMR of Flavonoids, Ed. 39 Elsevier: Amsterdam, 1989.
- ALMEIDA, S.P.; Frutas nativas do cerrado: caracterização físicoquímica e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC. p. 247-285, 1998.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa, 1998
- AWAD, A. B.; FINK, C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition*, v. 130, n.9, p. 2127- 2130, 2000.
- BAGAVAN, A.; RAHUMAN, A.A.; KAUSHIK, N.K.; SAHAL, D. In vitro antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Res.**108 (1): 15–22, 2011.
- BARTUS R.T.; DEAN III R.L.; BEER B.; LIPPA A.S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science** 1982; v.217, p.408-414.
- BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, E. E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, 22, 269-303, 2005.
- BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S.; MCCOY, K.D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BEZERRA, J.C.B.; SILVA, I.A.; FERREIRA, H.D.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of brazilian cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**. **73** (1): 428-430, 2002.
- BOKDE, A.L.W.; M. KARMANN, *et al.* Decreased Activation Along the Dorsal Visual Pathway After a 3-Month Treatment With Galantamine in Mild Alzheimer Disease A Functional Magnetic Resonance Imaging Study. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, **29** (2): p.147-156, 2009.
- BRAGA FILHO, J.R.; NAVES, R.V.; SANTOS, V.R.V. *et al.* Fruit production and environment characterization of the occurrence of native plants of araticum the cerrado of Goias state. **Rev Bras Frutic**. 31 (2): 461-473, 2009.
- CARDOSO, L.M.; OLIVEIRA, D.S.; BEDETTI, S.F.; *et al.* Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) from the brazilian cerrado: chemical composition and bioactive compounds. **Fruits**. 68 (2): 121-134, 2013.
- CORRÊA, S.C.; CLERICI, M.T.P.S.; GARCIA, J.S.; FERREIRA, E.B.; EBERLIN, M.N.; AZEVEDO, L. Evaluation of dehydrated *marolo* (*Annona crassiflora*) flour and carpels by freeze-drying and convective hot-air drying. **Food Res Int**. 44(7): 2385-2390, 2011.

CORRÊA, S.C.; REZENDE, M.L.; FERREIRA, E.B., *et al.* Marolo (*Annona crassiflora* Mart.): a study of value chain and processing. **Food Sci Technol.** 33 (2): 362-368, 2013.

COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; XAVIER, C.M.; SILVA, J.R.A.; AMARAL, A.C.F.; SOUZA, A.D.L.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; FERREIRA, A.G.; MACHADO, G.M.C.;

DAMIANIL, C.; SILVA, F.A.; LAGE, M.E., *et al.* Stability of frozen marolo pulp during storage. **Food Sci Technol.** 33 (4): 713-721, 2013.

DEBORA, M. M. & JORGE, L. N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Ind Crops Prod.** 42 (1): 231-235, 2013.

DEMARIN, V.; ZAVOREO, I.; KES, V.B.; SIMUNDIC, A.M. Biomarkers in Alzheimer's disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, p. 773, 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach.** 2<sup>a</sup> Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 507 p., 2002.

DURIGAN, G.; NISHIKAWA, D.L.L.; ROCHA, E., *et al.* Characterization of two strata of cerrado vegetation at Brotas, SP, Brazil. **Acta Bot Brasilica.** 16 (3): 251-262, 2002.

DUTRA, L.M., COSTA, E.V., MORAES, V.R.S., *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology.** v. 41 p. 115-118, 2012.

DRAGANO, N.R.V.; VENANCIO, V.P.; PAULA, F.B.A.; LUCIA, F.D.; FONSECA, M.J. O.; AZEVEDO, L. Influence of marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. **Plant Foods Hum Nutr.** 65 (1): 319-325, 2010.

EASTWOOD, R., REISBERG, B. Mood and behaviour, In: Gauthier S. editor. **Clinical diagnosis and management of Alzheimer's disease.** London: Martin Dunitz. p. 90-175, 1996.

EGYDIO, A. P. M.; CATARINA, C. S.; FLOH, E. I. S.; SANTOS, D. Y. A. C. Free amino acid composition of *Annona* (Annonaceae) fruit species of economic interest. **Ind Crops Prod.** 45(1): 373-376, 2013.

EGYDIO, A. P. M.; VALVASSOURA, T. A.; SANTOS, D. Y. A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. **Biochem. Syst. Ecol.** 46 (1): 145-151, 2013.

EGYDIO, A. P., VALVASSOURA, T. A., SANTOS, D. Y. A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 145-151, 2013.

FEITOSA, C. M. *et al.*, Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants, **Brazilian Journal of Biology**, v.71, p. 783-789, 2011.

FEITOSA, C. M. Contribuição estudo químico de Plantas do Nordeste do Brasil. Estudo monitorado da enzima acetilcolinesterase das plantas: *Kalanchoe brasiliensis* Camb. *Senna*



*siamea e Anacardium Occidentale* (Tese de doutorado), Universidade Federal do Ceará Fortaleza- CE, 385p, 2005.

FILHO, B.; ROCHA, J.; NAVES, R. V.; CHAVES, L. J., *et al.* Physical and physical chemical characterization of araticum fruits (*Annona crassiflora* Mart.). **Bioscience Journal**. 30 (1): 16-24, 2014.

FINKELSTEIN, B.L.; BENNER, E.A.; HENDRIXSON, M.C. *et al.* Tricyclic Cyanoguanidinas: Synthesis, Site of Action and Inseticidal Activity of Novel Class of Reversible Acetylcholinesterase Inhibitors. **Biorganic Medicinal Chemistry**. v. 10, p. 599-613, 2002.

GOOD, P.F.; WERNER, P.; HSU, A. *et al.* Evidence for Neuronal Oxidative Damage in Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, 149, 21, 1996.

GORDON, K.W.; LILIENFELD S.; GAENS, E. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. **British Medical Journal**, v. 321, p.1445-1478, 2000.

GROSSBERG, G.T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. **Current Therapeutic Research**.64 (4): p.216-35, 2003.

GUPTA, A.; GUPTA, R. A survey of plants for presence of cholinesterase activity. **Phytochemistry** 46, p. 827-831, 1997.

HARBONE, J.B.; **Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis**, 2<sup>nd</sup> ed., Chapman and Hall: London, 55-136, 1984

INGKANINAN, K.; HAZEKAMP, A.; De Best, C. M.; *et al.* The application of HPLC with on-line UV-MS-biochemical detection for isolation of an acetylcholinesterase inhibitor from *Narcissus "Sir Winston Churchill"*. **Jornal of Natural Products**. 63, p.803-806, 2000.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; PEREIRA, M. J. B.; PEREIRA, K. M. Allelopathic potential of *Annona crassiflora*: effects on weeds. **Planta Daninha**. 28 (3): 489-498, 2010.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; VILHENA, K. S. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; POSSAMAI A. C. S.; SILVA L. E.; DALLACORT R. Allelopathic potential of substances isolated from *Annona crassiflora* seeds. **Planta Daninha**. 28 (4): 735-741, 2010.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, K. H. S.; COLE, J. R.; Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**, 47, 3151-3153, 1982.

KAMARAJ, C.; KAUSHIK, N. K.; MOHANAKRISHNAN, D.; ELANGO, G.; BAGAVAN, A.; ZAHIR, A. A.; RAHUMAN, A. A.; SAHAL, D. Antiplasmodial potential of medicinal plant extracts from Malaiyur and Javadhu hills of South India. **Parasitol Res**. 111 (1): 703-715, 2012.

KRINSK, D. & MASSAROLI, A. Nymphicidal effect of vegetal extracts of *Annona mucosa* and *Annona crassiflora* (Magnoliales, Annonaceae) against rice stalk stink bug, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera, Pentatomidae). **Rev Bras Frutic.** 36 (1): 217-224, 2014.

KIELY, J. S., MOOS, W. H., PAVIA, M. R., *et al.*, A silica gel plate-based qualitative assay for acetylcholinesterase activity: A mass method to Screen for potencial inhibitors. **Analytical Biochemistry** 196, p. 439-442, 1991.

LAGE, G. A.; MEDEIROS, F. D S.; FURTADO, W. D. L.; PIMENTA, L. P. S., *et al.* The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Nat Prod Res.** 28 (11): 808-811, 2014.

LAGE, G.A. Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *annona crassiflora* Mart 2011. Dissertação (mestrado). Pós graduação em Química – Universidade Federal de Minas Gerais.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry.** 21 (12): 2783-2813, 1980.

LEON, L.L.P.J. A Pyrimidine- $\beta$ -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. **Journal of Natural Products**, 2006.

LOPES, R. M.; SILVA, J. P.; VIEIRA, R. F., *et al.* Composition of fat acids in pulp of native fruits from the brazilian savanna. **Rev Bras Frutic.** 34 (2): 635-640, 2012.

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

MAELICKE A, ALBUQUERQUE, E.X. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology.** 393(1-3), p 165-70, 2000.

MANGURO, L.O.A, UGI, I, LEMEN, P. Further flavonol glycosides of *embelia schimperi* leaves. **Bull. Chem. Soc. Ethiop.** 18(1), 51-57, 2004.

MARQUES, J. J. **Solos do Cerrado**. Departamentos de Ciências do Solo, Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG, 2004. Disponível em: <[www.dcs.ufla.br](http://www.dcs.ufla.br)> Acesso em: 24 junho de 2015.

McLAUGHLIN J.L., ROGERS L.L. & ANDERSON J.E. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf. J.*, 32: 513-524

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p.31-34, 1982.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of brazilian cerrado plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 100(7): 783-787, 2005.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. In vitro antiparasitoid activity of brazilian cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**. 110 (1): 165–170, 2007.

MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. C.; RAPHAEL; GROUGNET; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of brazilian cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J Ethnopharmacol**. 123 (1): 439–445, 2009.

MAHMOUD, I.I., MARZOUK, M.S.A., MOHARRAM, F.A., ELGINDI, M.R., HASSAN, A.M.K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, 58: 1239-44, 2001.

OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some brazilian medicinal plants. **Bioresour. Technol**. 98 (1): 2549–2556, 2007.

PEREIRA, M.M.; SOUZA JÚNIOR, S.N.; ALCÂNTARA, A.F.C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALVES, R.B.; MACHADO, P.O.; AZEVEDO, A.O.; MOREIRA, F.H.; CASTRO, M.S.; A.; RASLAN, D.; S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae), **Rev. Bras. Planta. Med.**, Botucatu, 8(3), 01 - 08, 2006.

PIMENTA, A. C.; REGO, S. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C., *et al.* Morphological characterization of fruits, seeds and seedlings of araticum plant (*Annona crassiflora* Mart - Annonaceae). **Journal of Seed Science**. 35 (4): 524-531, 2013.

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B. J.; TAKAHASHI, A.; SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test) v. 10, Issues 2–3, p. 209–212, 2003.

PIMENTA, L. P.; GARCIA, G. M.; GONÇALVES, S. G.; DIONÍSIO, B. L.; BRAGA, E. M.; MOSQUEIRA, V. C. In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Nat Prod Res**. 2014.

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Phytomedicine**. 10 (2): 209-212, 2003.

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

RAO, R. V. K.; MURTY, N.; RAO, J. V. L. N. IN: LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; Mukherjee, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, 21 (12), 2783-2813, 1982a.

RASKIND, M.A. Alzheimer's disease: treatment of noncognitive behavioural abnormalities. In: Bloom FE, Kupper DJ. Psychopharmacology: the fourth generation of progress. New York: Raven Press. p. 1427-35, 1995.

- RHEE, I. K., VAN DE MEENT, M., INGKANINAN, K., VERPOORTE, 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.
- RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M.; VILLA, F., *et al.* In vitro seed germination and seedling development of *Annona crassiflora* Mart. **Sci Agric**. 66 (3): 410-413, 2009.
- ROBINSON, T. **The Organic Constituents of Higher Plants**. 6 ed. Massachusetts : Cordus Press. p. 151-153. 1991.
- RODRIGUES, A. M. S.; PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.F.; ESPÍNDOLA, L. S. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **J Am Mosq Control Assoc**. 22 (2): 314-317, 2006.
- ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chem**.104 (1): 1048–1054, 2007.
- ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. 31 (1): 93-100, 2011.
- ROESLER, R.; LORENCINI, M.,; PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. 30(3): 814-821, 2010.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. 27(1): 53-60, 2007.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; PASTORE, G. Evaluation of the antioxidant properties of the brazilian cerrado fruit *Annona crassiflora* (araticum). **Journal of Food Science**. 71 (2): c102-c107, 2006.
- SANTOS, A.C.S., MESQUITA, T.M., MENEZES, M.E.F.C, COSTA, M.P.C., MÍRIAN CRUZ DE SOUZA SANTOS, M.C.S. Cardioncologia: anormalidades eletrocardiográficas em pacientes com cardiomiopatia pós-uso de doxorubicina. **Rev SOCERJ**. 22(5):281-288, 2009.
- SANTOS, A. F. & SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**. 8 (2): 115–120, 2001.
- SANTOS, D. Y. A. C. & SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**. 55 (6): 567-573, 2000.
- SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; SUN, N. J.; CASSADY, J. M.; OLIVEIRA, A. B.; Araticulin, a *bis* tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Phytochemistry**. 42(3): 705-707, 1996.
- SANTOS, P. L.; GUIMARÃES, G. P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

Santos, P. R. D.; Morais, A. A.; Braz-Filho, R. Alkaloids from *Annona dióica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 14 (3), 369-400, 2003.

SANTOS, P. R. P.; CARVALHO, R. B. F.; FREITAS, R. M.; *et al.* 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 / Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p. 161-168, 2013.

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

SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis, Ed. da UFSC, 2004.

SHAPIRO C, RECHT A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 2001;344(26):1997-2008.

SCHWARTZ R, MCKENZIE W, ALEXANDER J, *et al.* Congestive heart failure and left ventricular dysfunction complicating doxorubicin therapy seven-year experience using serial radionuclide angiocardiology. *Am J Med*.82(6):1109-118, 1987.

SHAO, D.; ZOU, C.; LUO, C.; *et al.* Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**; 14 (18), p. 4639-42, 2004.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SHAHIDI, F. Natural Antioxidants: Natural Antioxidants: An Overview “in” Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications. *AOCS Press: Champaign, Illinois*, p. 1-11. 1996.

SILVA, E. A. A.; MELO, D. L. B.; DAVIDE, A. C., *et al.* Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Ann Bot**. 99 (5): 823-830, 2007.

SILVA, E. M.; VALENCIA, A.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; ROCHA, T. L.; FREIRE, E.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Inhibitory action of cerrado plants against mammalian and insect  $\alpha$ -amylases. **Pestic Biochem Physiol**. 95 (1): 141–146, 2009.

SIMÕES, C. M. O, SPITZER V. Óleos Voláteis. In: Simões C. M. O, SCHENKEL E. P; GOSMANN G., MELLO J. C. P. de, MENTZ L. A., PETROVICK P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of cerrado brazilian fruits. **Food Chem**. 134 (1): 381–386, 2012.

TAKAHASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; SILVA, L. G. F. E. Antibacterial activity of eight brazilian Annonaceae plants. **Nat Prod Res.** 20 (1): 21-26, 2006.

TEMPONE, A. G.; TREIGER, B. S. E.; ANDRADE, J. R. H. F.; GUALDA, N. C. A.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V. D. C. H.; FISCHER D. C. H. Antiprotozoal activity of brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine.** 12 (1): 382–390, 2005.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, T. U.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **Int J Infect Dis.** 15 (1): e525–e532, 2011.

UGOLINE, B.C.A. Isolamento biomonitorado de ativos tóxicos das folhas de *Annona crassiflora* Mart. e eficácia antimalárica do alcaloide norestefalagina em nanoemulsões. 2012. Dissertação (Mestrado) Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Ouro Preto.

UGOLINE, B. C. A.; PIMENTA, L. P. S.; LAGE, G. A.; FURTADO, W. L.; MOSQUEIRA, V. C. F. *Bioguided fractionation of leave's ethanolic extract of Annona crassiflora Mart by larvicidal assay*, 2013.

VENÂNCIO, V. P.; FERREIRA, E. B.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; PAULA, F. B. A.; BARBISAN, L. F.; AZEVEDO, L. *Annona crassiflora* Mart. fruit pulp effects on biochemical parameters and rat colon carcinogenesis. **Ciêncagrotec.** 37 (4): 343 - 349, 2013.

VILAR, J. B.; FERREIRA, F.L.; FERRI, P. H.; GUILLO, L. A.; CHEN, C. L. Assesment of the mutagenic antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Braz J Biol.** 68 (1): 141-147, 2008.

VILAR, J. B.; FERRI, P. H.; CHEN-CHEN, L. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. **Braz J Biol.** 71(1): 197-202, 2011.

VILLELA, P.; BATISTA, A. G.; VILLELA, N. A. D. P. Nutritional composition of *Annona crassiflora* pulp and acceptability of bakery products prepared with its flour. **Food Science and Technology.** 33(3): 417-423, 2013.

WOLOZIN, B., *et al.*, 2000, “Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3- methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors”. *Arch Neurology*, v. 57, p.1439–1443 (in YANAGISAWA, 2002)

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS- BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in Food and their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 113-122, 2004.

ZACKIEWICZ, M.; SALLES FILHO, S. Technological Foresight – um instrumento para política científica e tecnológica. *Revista Parcerias Estratégicas, Estudos Prospectivos*, n. 10, p. 144-161, 2001.

ZAFRA-POLO, M. C.; GONZÁLEZ, M. C.; ESTORNELL, E.; SAHPAZ, S.; CORTES, D. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry*. 42(2): 253-271, 1996.

ZOUBIRI, S. & BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15 (11): 1010-1016, 2011.

## PESPECTIVAS

- ↻ Continuidade da análise cromatográfica dos extratos das folhas e frutos;
- ↻ Elucidação estrutural substâncias isoladas e compostos ativos;
- ↻ Avaliação da atividades biológicas e farmacológicas potenciais das substâncias isoladas;
- ↻ Busca de inibidores da AChE nos extratos de *Annona crassiflora*;
- ↻ Publicação de artigo com os dados obtidos;
- ↻ Ensaios in vivo em modelos experimentais de DA;
- ↻ Estudos toxicológicos *in vivo* amplos;
- ↻ Estudos de farmacocinética e farmacodinâmica;
- ↻ Elaboração de Complexo de inclusão com ciclodextrinas.



**ANEXOS**

## ANEXO I

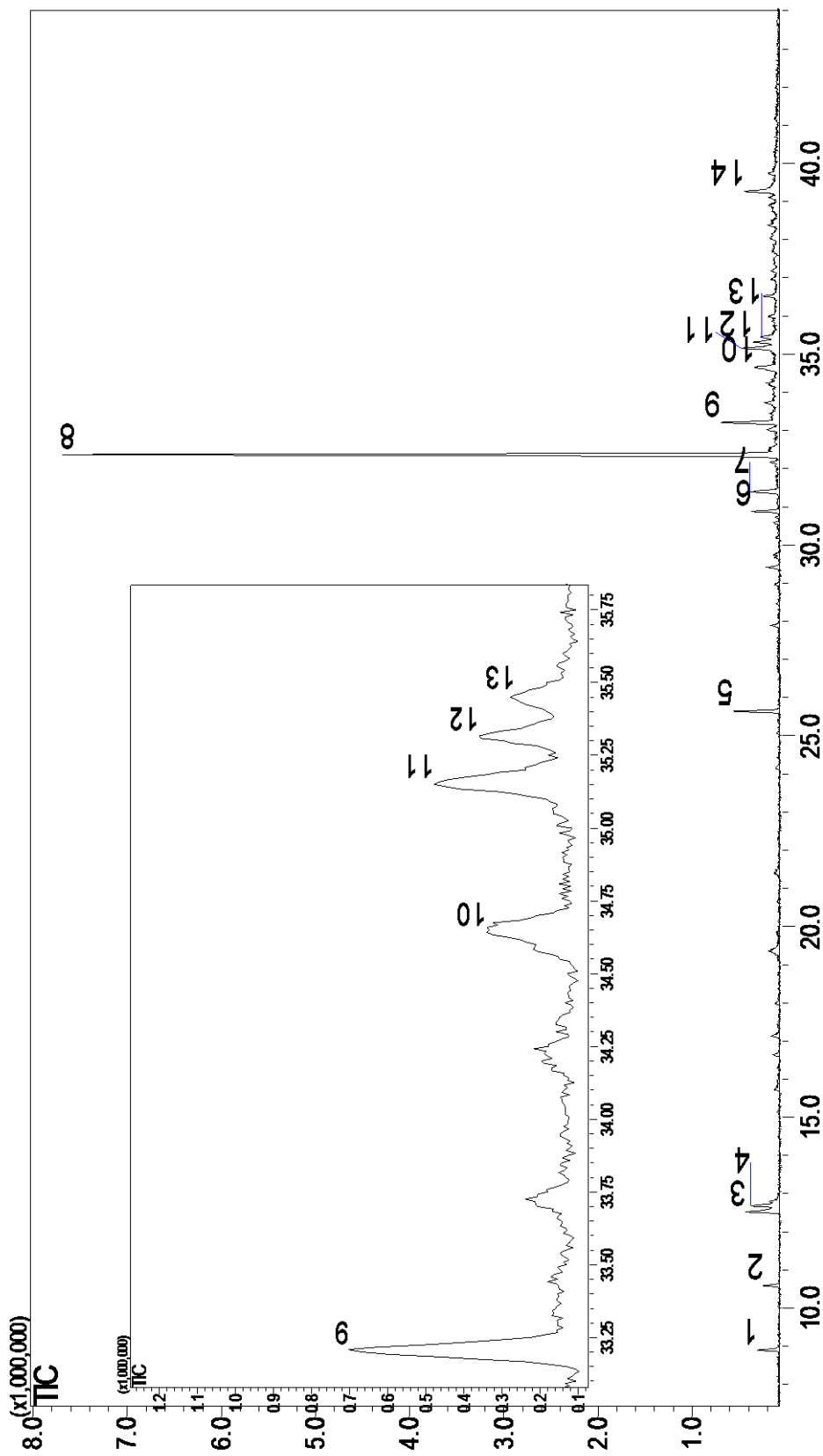
Composição do óleo essencial a partir das folhas de *E. dysenterica*.

Pico	T. de Ret.	IR <sub>exp</sub> <sup>a</sup>	IR <sub>lit</sub> <sup>b</sup>	Composto	% Área
1	8,895	1030	1025	β-felandreno	1,73
2	10,582	1074	-	NI	1,42
3	12,523	1112	1108	1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	3,51
4	12,677	1114	-	NI	1,89
5	25,642	1374	1374	Isoledeno	3,91
6	30,880	1535	-	NI	2,22
7	31,392	1551	-	NI	2,78
8	32,366	1583	1582	Óxido cariofileno	66,37
9	33,207	1610	-	NI	5,06
10	34,643	1659	1658	Selin-11-en-4-α-ol	1,69
11	35,152	1677	1676	Mustakona	3,46
12	35,314	1682	-	NI	1,95
13	35,458	1687	-	NI	1,38
14	39,265	1824	-	NI	2,63
Total identificado				6 compostos	80,67

<sup>a</sup>IR<sub>exp</sub>: índice de retenção determinado em uma coluna DB-5MS com comparação ao tempo de retenção de uma série de n-alcanos, de acordo com a equação de Van Den Dool & Kratz<sup>15</sup>. <sup>b</sup>IR<sub>lit</sub>: índice de retenção<sup>14</sup>.

## ANEXOS II

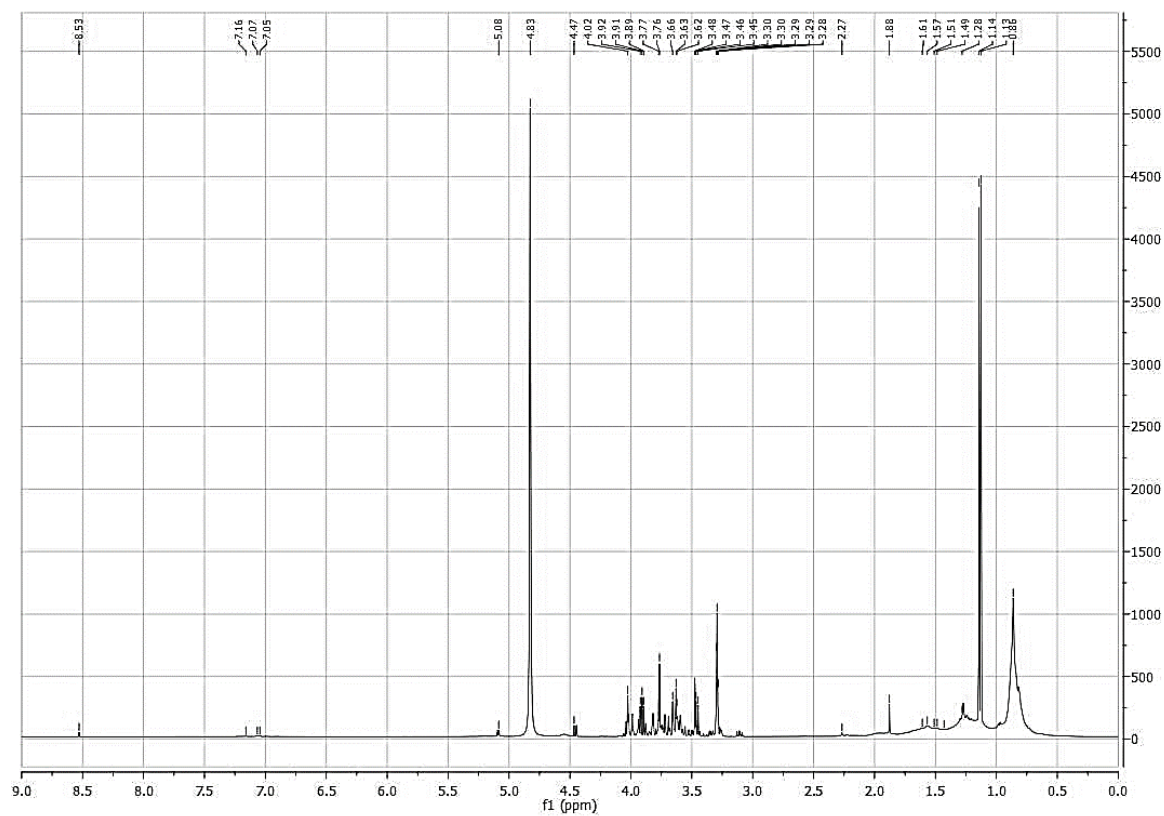
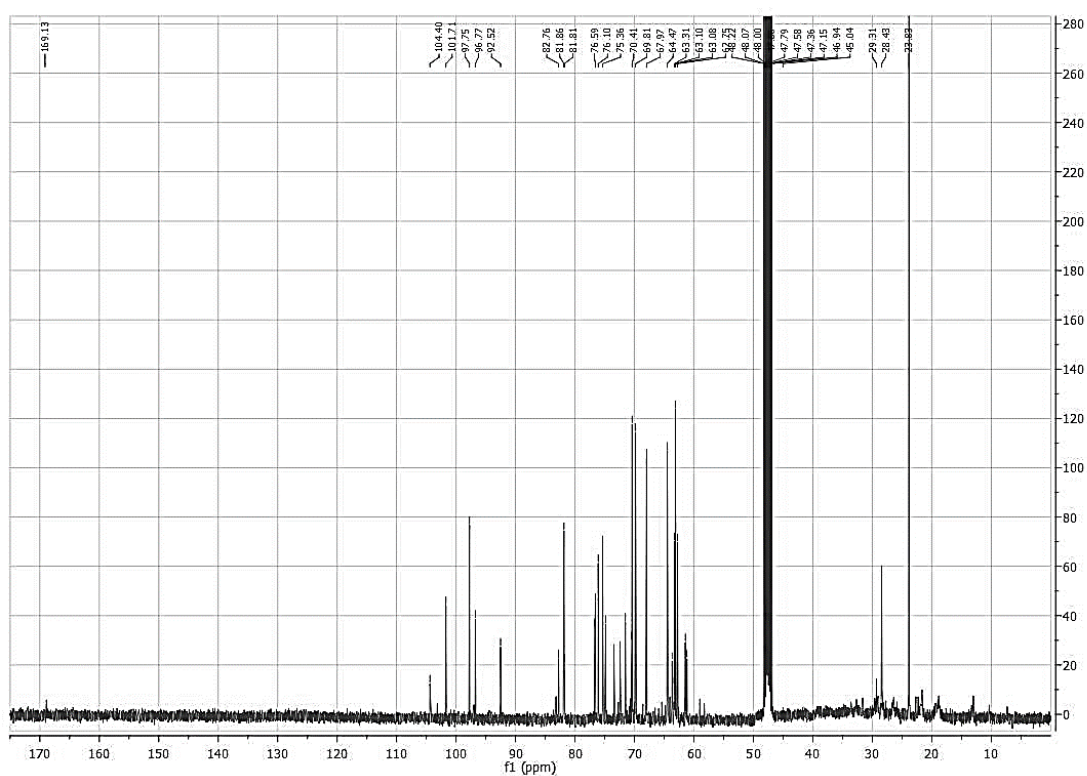
*Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massas do óleo essencial de E. dysenterica*



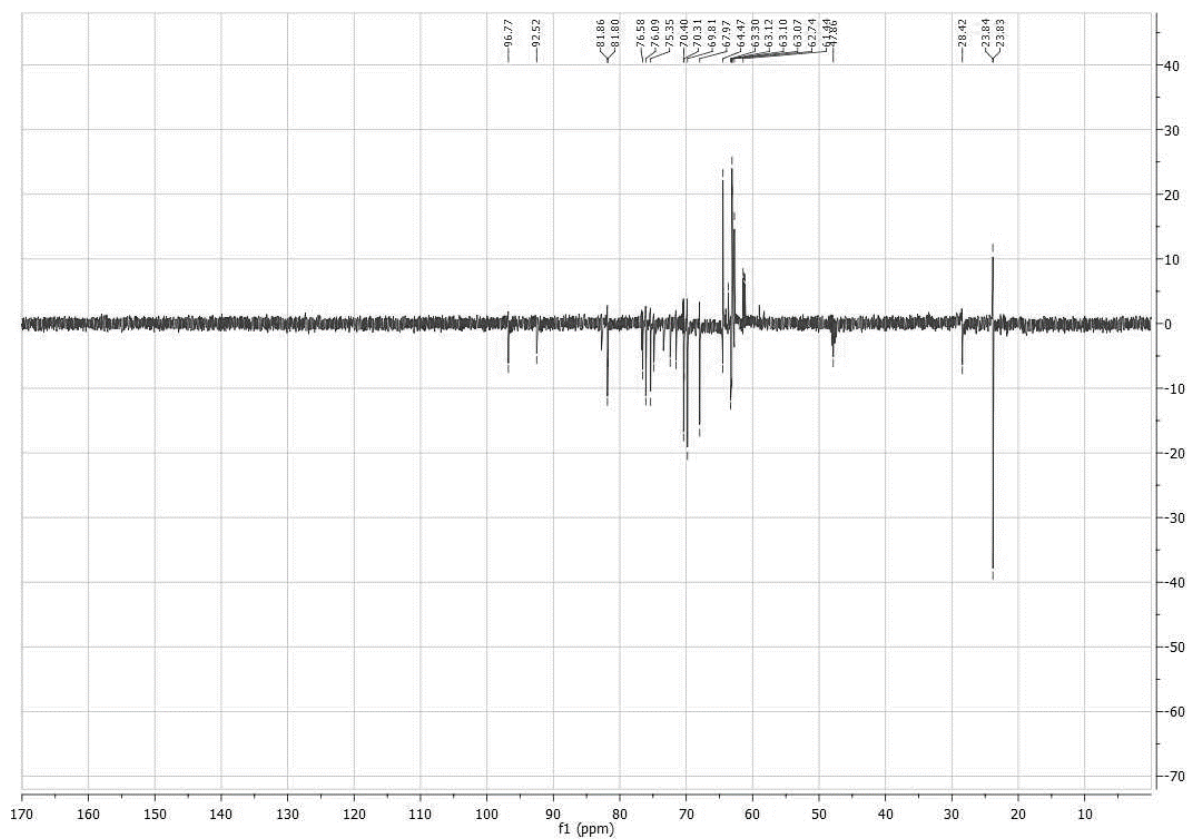
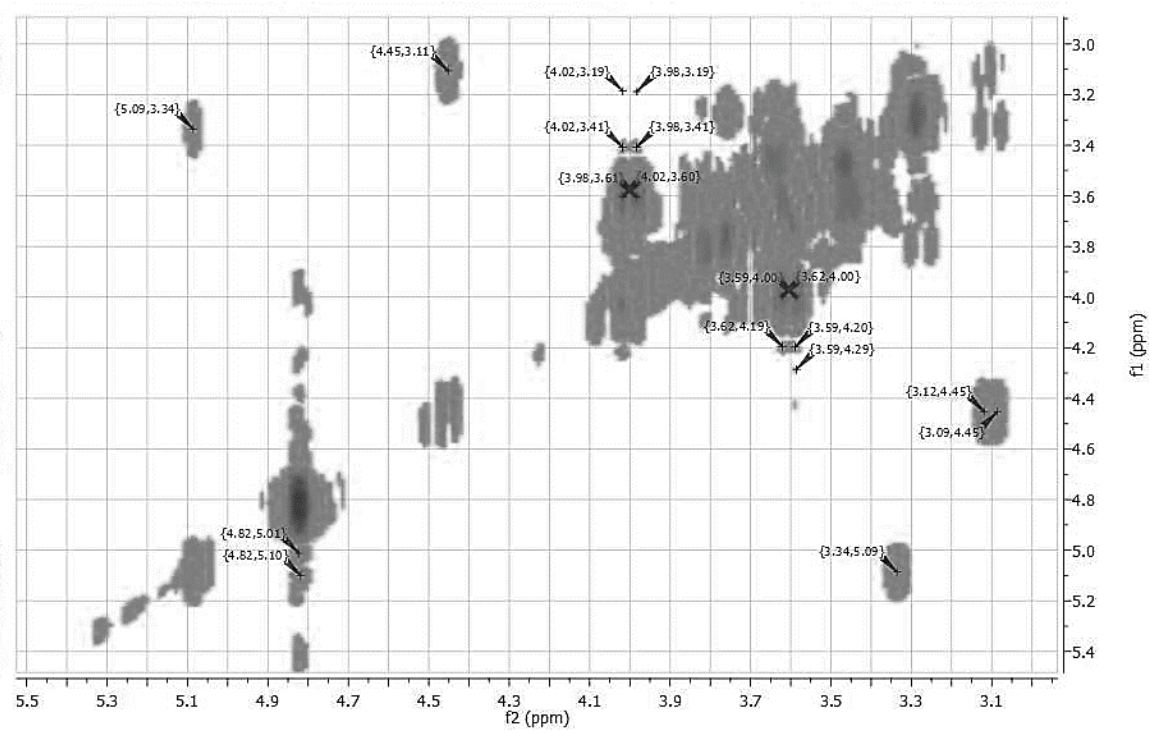
**Notação:** 1)  $\beta$ -felandreno, 3) 1,3,8-*p*-menthatriene 5) Isoledene, 8) Óxido de cariofileno, 10) Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol, 11) Mustakone, 2,4,6,7,9,12,13,14) Não indentificad

## ANEXOS III

LISTA DE ESPECTROS  
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS*Annona crassiflora*

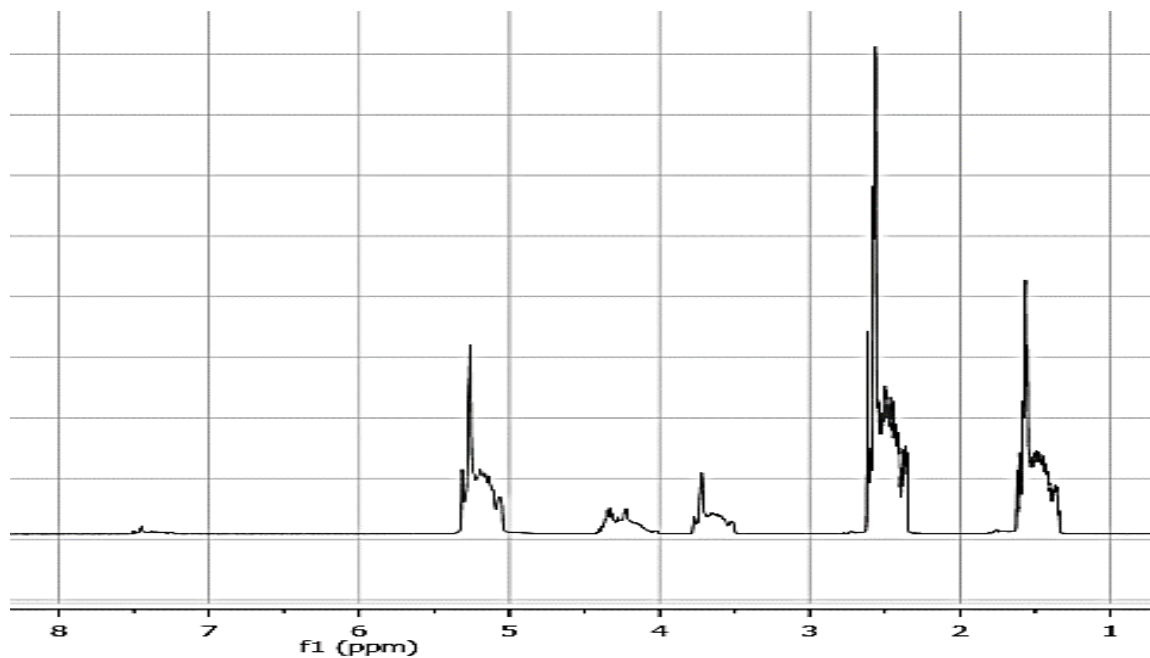
Espectro de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de A08RMN  $^1\text{H}$ RMN  $^{13}\text{C}$ 

## DEPT 135

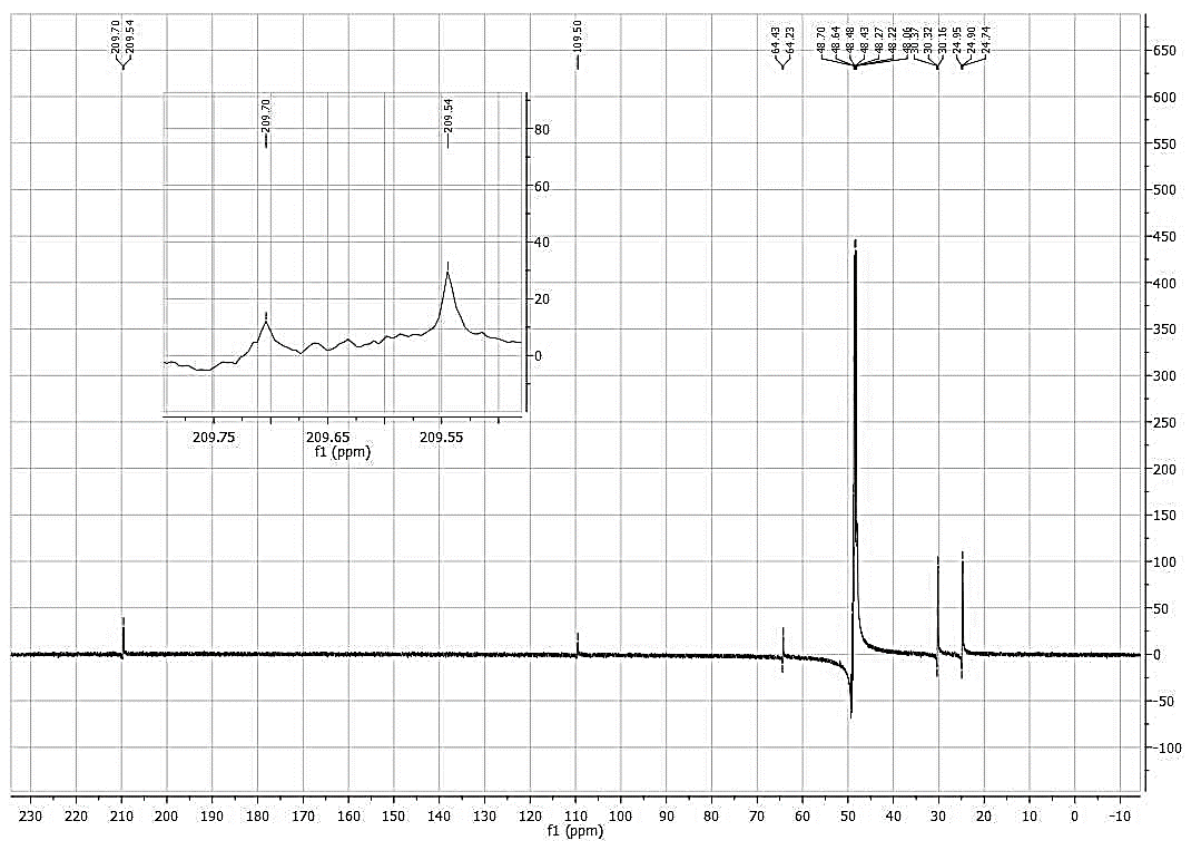
Mapa de contorno gCOSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de A08

Espectro de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de A02

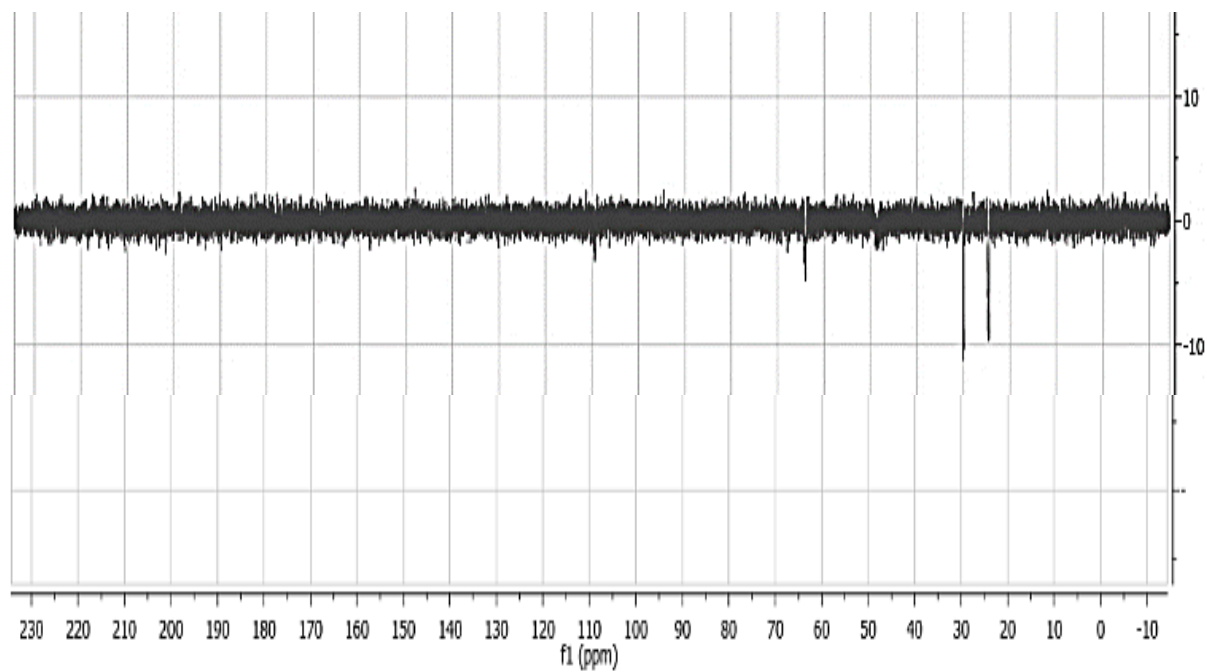
RMN  $^1\text{H}$



RMN  $^{13}\text{C}$

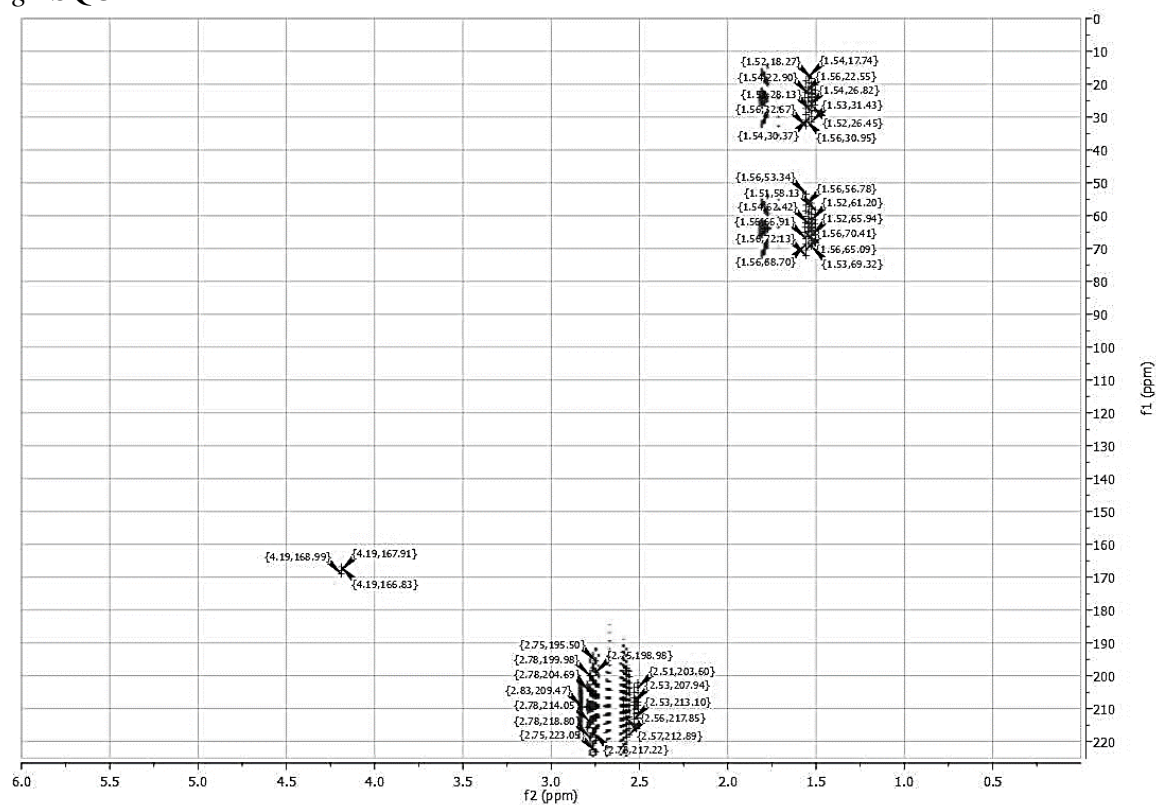


## DEPT 135



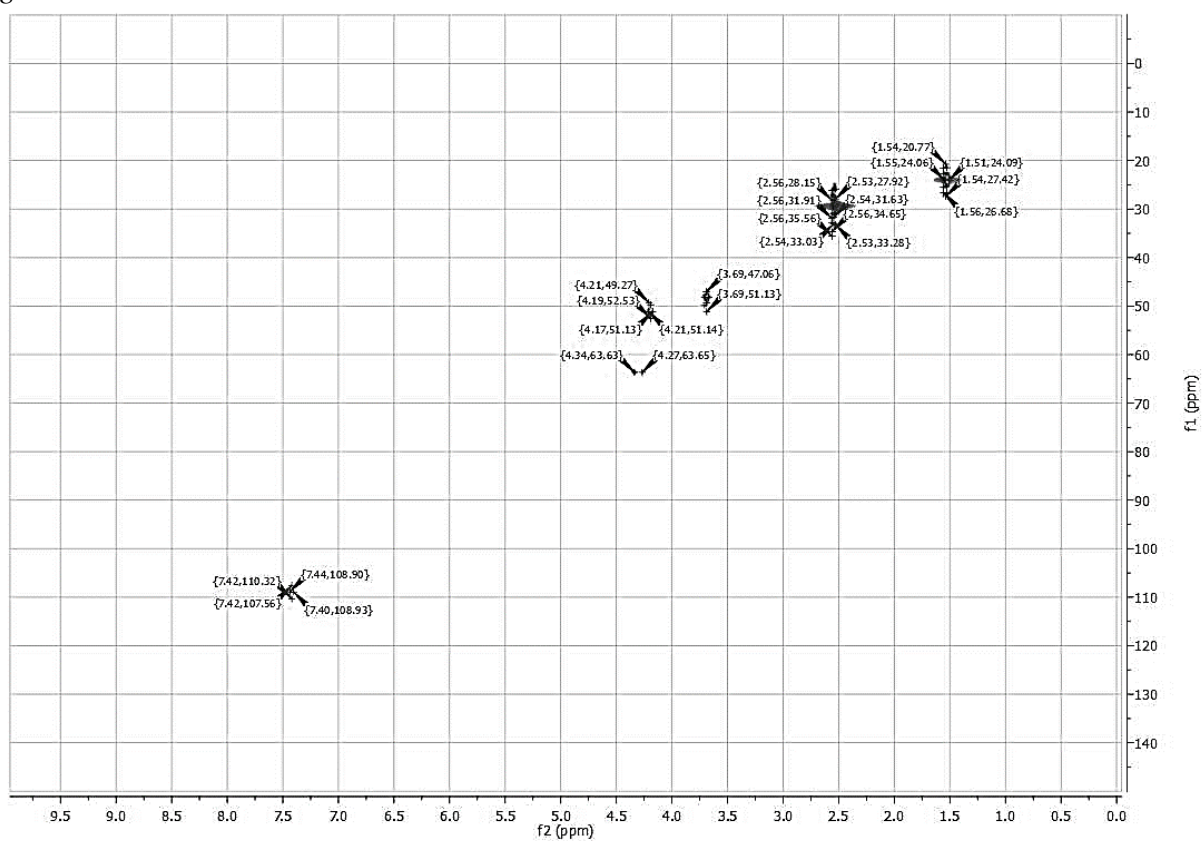
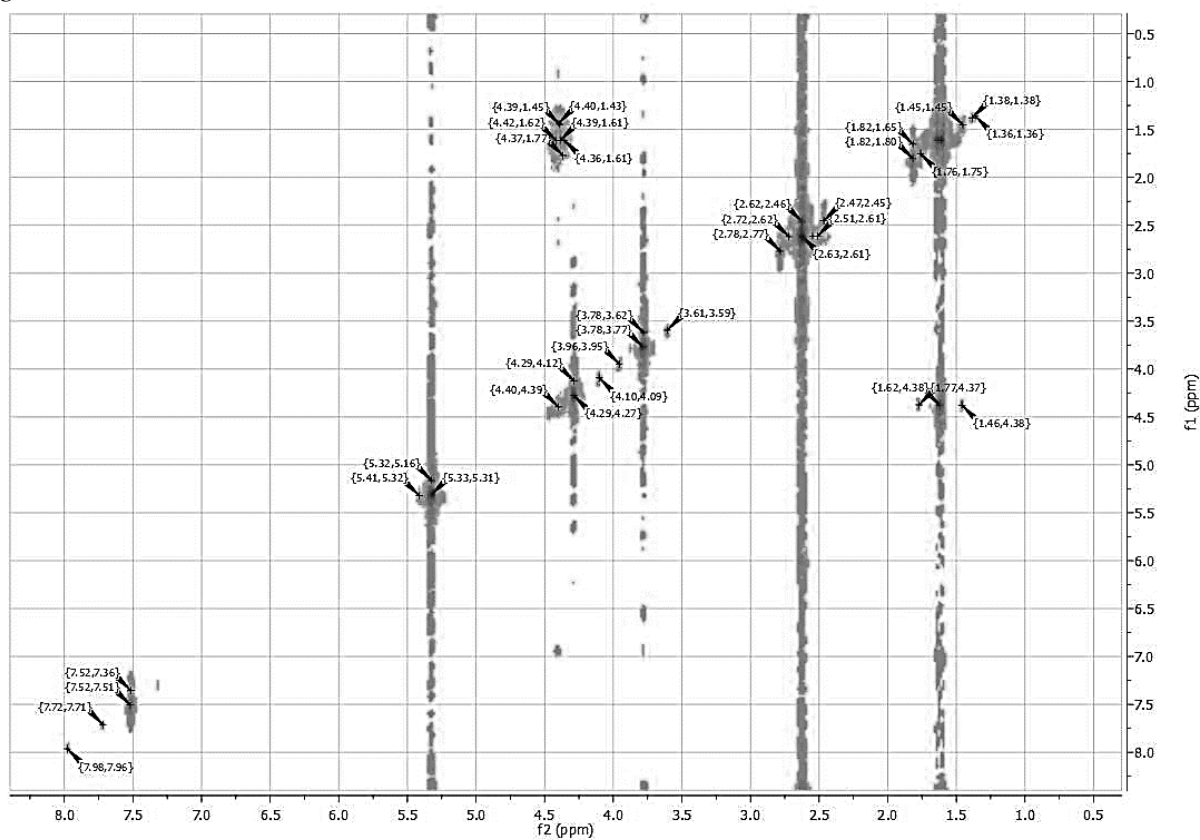
Mapa de contorno gHSQC, gHMBC e gCOSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de A02

## gHSQC





## gHMBC

gCOSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ 

# **PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

- *Artigos Publicados*

**FEITOSA, C.M.;** Costa, E.V. ; MELO, C. H. S. ; BARBOSA, A. R. ; FREITAS, R.M. ; FONTES, J. E. N. ; Rashed, K.N.Z. ; CHAVES, S. K. M. . Antioxidant and anticholinesterase activities of the essential oil of *Eugenia dysenterica* DC.. THE PHARMA RESEARCH, v. 14, p. 53-56, 2016.

- *Artigos Aceitos*

**FEITOSA, C.M.;** OLIVEIRA, G. L. S. ; Cardoso, K.M.F. ; Sá, C. G. ; Melo, C.H.S. ; RASHED, K. N. . Antioxidant and anticholinergic properties of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae) essential oil in mice hippocampus.. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2016

- *Artigos Submetidos*

**Revisão da literatura: *Annona crassiflora* Mart. (Araticum)** - Artigo submetido na revista Revista brasileira de plantas medicinais. Submetido em Março de 2015.

- *Apresentações de Trabalho Científicos*

Participação no IV Workshop de Projetos e Dissertações do Programa de Pós-graduação em Ciência Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, na modalidade: Pôster, apresentando o trabalho intitulado: **ESTUDO FITOQUÍMICO DO FRUTO DA *Annona crassiflora* Mart (ARATICUM) NA BUSCA DE UM POTENCIAL FARMACOLÓGICO NA DOENÇA DE ALZHEIMER** de autoria: **Felipe Pereira da Silva Santos; Adenilson Felipe Sousa Silva; Cassio Hebert Santos de Melo; Chistiane Mendes Feitosa** (Este trabalho recebeu Menção Honrosa).

Participação no 2º Simpósio Nordestino de Química na Universidade Federal do Piauí, na modalidade: Pôster, apresentando o trabalho intitulado: **ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE *Annona crassiflora* Mart** de autoria **Felipe Pereira da Silva Santos; Cassio Hebert Santos de Melo; Chistiane Mendes Feitosa.**

Participação na V Semana Acadêmica de Química na Universidade Federal do Piauí, na modalidade: Pôster, apresentando o trabalho intitulado: **ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SOBRE A ARTEMIA SALINA EM EXTRATOS DE *Annona crassiflora* Mart** de autoria **Adenilson Felipe Sousa Silva; Felipe Pereira da Silva Santos; Carla Lorena Silva Ramos; Cassio Hebert Santos de Melo; Chistiane Mendes Feitosa.**

Participação no 2º Simpósio Nordestino de Química na Universidade Federal do Piauí, na modalidade: Pôster, apresentando o trabalho intitulado: **ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO *Annona crassiflora* Mart E SEU POTENCIAL FITOTERÁPICO** de autoria **Felipe Pereira da Silva Santos; Adenilson Felipe Sousa Silva; Cassio Hebert Santos de Melo; Chistiane Mendes Feitosa.**

Participação no VII SBQ Nordeste e IV Escola de Química Prof. Ricardo Ferreira, na modalidade: Pôster, apresentando o trabalho intitulado: **ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *ANNONA CRASSIFLORA* MART**, autoria de **Felipe Pereira da Silva Santos; Cassio Hebert Santos de Melo; Valéria Lima Silva; Katrícia Maria Feitosa Cardoso; Chistiane Mendes Feitosa.**

Participação no I workshop da Pós graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, na modalidade: Pôster, apresentando o trabalho intitulado: **ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DAS ESPÉCIES *Eugenia dysenterica* DC. E *Annona crassiflora* Mart. DIRECIONADOS PARA DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**, de autoria de **Felipe Pereira da Silva Santos; Cassio Hebert Santos de Melo; Chistiane Mendes Feitosa.**

- **Capítulo de livro publicados**

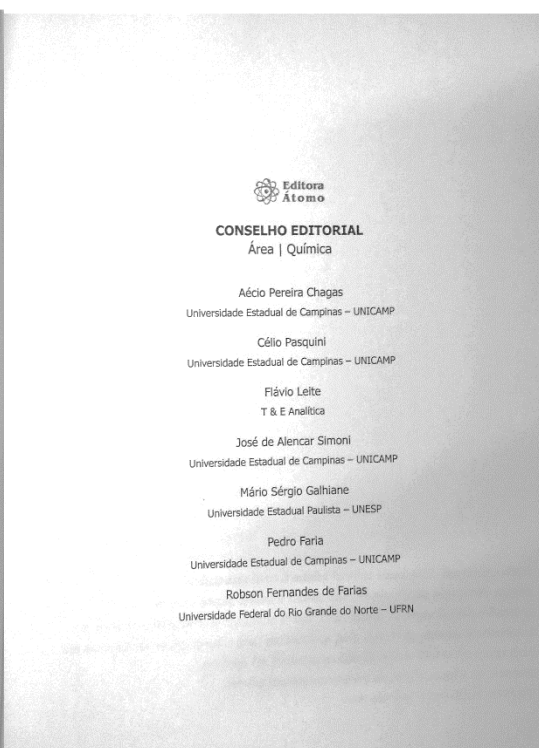
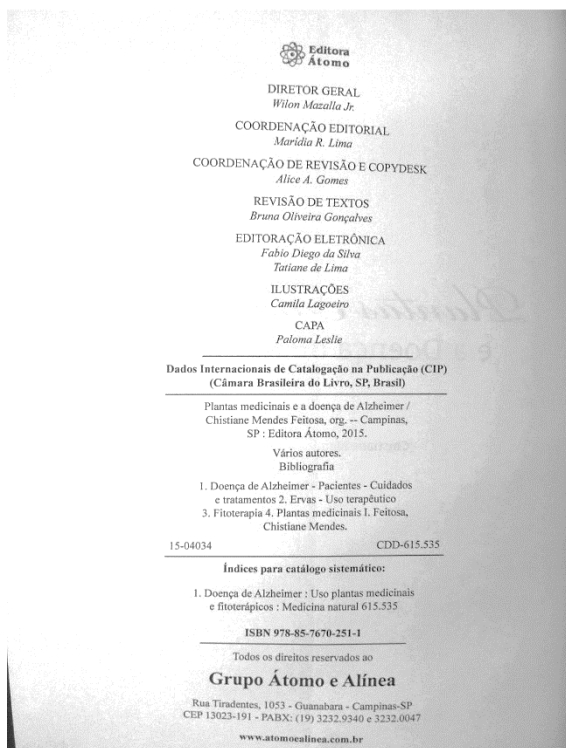
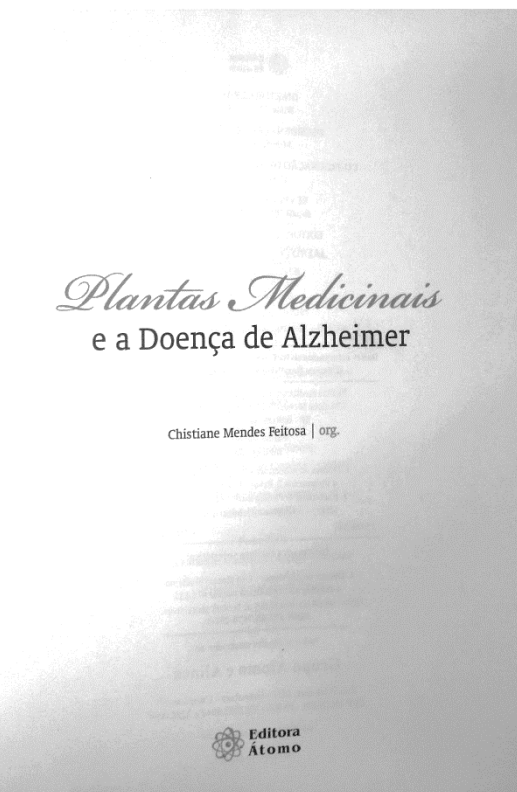
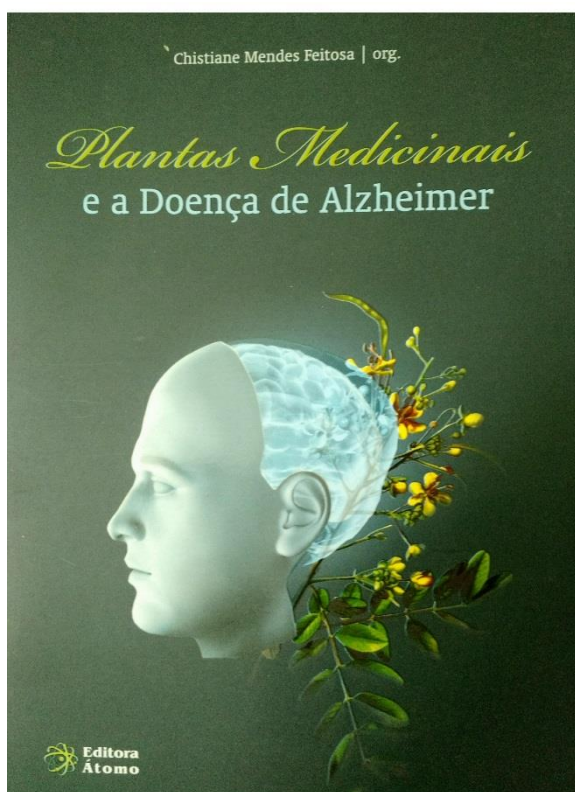
**FEITOSA, C.M.;** Melo, C.H.S.; CHAVES, S. K. M.; FEITOSA, D.M. Considerações sobre a Doença de Alzheimer. In: Feitosa, C.M. (Org.). Plantas Medicinais e a Doença de Alzheimer. 1ed.Campinas: Editora Átomo, 2015, v. 1, p. 57-72.

**FEITOSA, C.M.;** ARAUJO, L. S.; Melo, C.H.S. Citrus, a perspective for developing phytomedicines for neurodegenerative diseases. In: PhD Harsimran Gill, Cornell University, Ithaca, NY, USA PhD Harsh Garg University of Sydney, Australia. (Org.). Citrus Pathology. 1ed. Science, Technology and Medicine open access publisher. Publish, read and share novel research, 2016, v. 1, p. 1-250

- **Deposito de Patente**

**FEITOSA, C.M.;** Cardoso, K.M.F. ; Freitas, R.M. ; Sá, C. G. ; MELO, C. H. S. ; Rocha, M.S. . Obtenção de uma formulação farmacêutica a partir do complexo de inclusão do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com  $\beta$ -ciclodextrina e suas aplicações na terapia da doença de Alzheimer. 2016, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201600185, título: "Obtenção de uma formulação farmacêutica a partir do complexo de inclusão do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com  $\beta$ -ciclodextrina e suas aplicações na terapia da doença de Alzheimer", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 27/01/2011.



INTECH
open science | open minds
World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher.  
Publish, read & share novel research.


DASHBOARD
YOUR PROFILE ▾
YOUR PANELS ▾
YOUR AUTHOR PANEL ▾

🔍

**AUTHOR PANEL**

Dashboard

## Citrus Pathology



CITRUS PATHOLOGY

ISBN 978-953-51-5121-0

Book edited by:

PhD Harsimran Gill,

Cornell University,  
Ithaca, NY, USA

PhD Harsh Garg

University of Sydney, Australia

**ON THIS PAGE**

Topics

---

Publishing process and dates

---

Indexing

**ACTIVE PUBLICATIONS**

CHAPTER TITLE:  
Citrus, a perspective for developing phytomedicine

BOOK TITLE:  
Citrus Pathology

CURRENT STEP:  
[Full Chapter Review](#)

ACTIONS:  
[Add/edit co-authors](#)  
[Edit chapter title](#)

BOOK INFO:  
[About the book](#)  
[Publishing process steps and](#)

Citrus, a Perspective for Developing Phytomedicines for Neurodegenerative diseases.

Christiane Mendes Feitosa<sup>1,2</sup>, Rivelilson Mendes de Freitas *(in memoriam)*<sup>3</sup>, Valéria Lima Silva<sup>2</sup>, Lidiane da Silva Araújo<sup>3</sup>, Cassio Herbert Santos de Melo<sup>3</sup>, Felipe Pereira Da Silva Santos<sup>1,2</sup><sup>Pos graduation in Pharmacy, Federal University of Piauí, Campus Minister Petrônio Portela, Ininga, 64049-550, Teresina, Piauí, Brazil</sup> <sup>2</sup>Pos graduation in Chemistry, Federal University of Piauí, Campus Minister Petrônio Portela, Ininga, 64049-550, Teresina, Piauí, Brazil.

TOPICS COVERED IN THIS BOOK INCLUDE BUT ARE NOT LIMITED TO:

The authors are given the liberty of choosing a topic which best suits their current research efforts. In other words, we do not limit you in terms of the topic but encourage you to present your work. Later, when all



Full Length Research Paper

## Antioxidant and anticholinesterase activities of the essential oil of *Eugenia dysenterica* DC.

Chistiane Mendes Feitosa<sup>1\*</sup>, Alisson dos Reis Barbosa<sup>1</sup>, Cassio Herbert Santos de Melo, Rivelilson Mendes Freitas<sup>1</sup>, José Eraldo do Nascimento Fontes<sup>2,3</sup>, Emmanoel Vilaça Costa<sup>4,5</sup> and Khaled Nabih Zaki Rashed<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Piauí Federal University, 'Campus Universitário Ministro Petrônio Portela', Bloco 06-Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brazil.

<sup>2</sup>Chemistry Institute, University of Campinas (UNICAMP), CP 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Sergipe Federal University, Av. Marechal Rondon, S/N, Jardim Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Amazonas Federal University, Bloco 08, Setor Norte do Campus Universitário Sen. Arthur Virgílio Filho, Av. Rodrigo Otávio, 6.200, Coroado, 69077-000 Manaus, AM, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Chemistry, Sergipe Federal University, Av. Vereador Olímpio Grande, S/N, Centro, 49500-000, Itabaiana, SE, Brazil.

<sup>6</sup>National Research Centre, Pharmacognosy Department, Dokki, Giza, Egypt.

Received 28 August, 2015; Accepted 5 November, 2015

This paper describes the anticholinesterase and antioxidant activities of *Eugenia dysenterica* DC. (O. Berg. (Myrtaceae) essential oils from leaves (EOED). EOED were obtained by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus and the products were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID). The main constituents of EOED were caryophyllene oxide (66.3%), isolekene (3.9%), 1,3,8-*p*-menthatriene (3.5%), mustakone (3.46%),  $\beta$ -phellandrene (1.7%), and selin-11-en-4- $\alpha$ -ol (1.7%). The antioxidant assay was performed based on the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), hydroxyl radical, and nitric oxide production. By performing the Ellman assay, it was observed that EOED was able to inhibit the enzyme acetylcholinesterase (AChE) with an  $IC_{50} = 0.92 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  promising better value when compared with the drug rivastigmine ( $IC_{50} = 1.87 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), used in the treatment of Alzheimer's disease. The caryophyllene oxide (the main compound) was tested after purification on the AChE with an  $IC_{50} = 0.31 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Caryophylleneoxide (the majority compound) was tested on the AChE and presented the  $IC_{50} = 0.31 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . At concentrations of 0.9, 1.8, 3.6, 5.4, and 7.2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , it was found out that EOED prevented lipid peroxidation inhibiting amount of TBARS formed in a similar manner to ascorbic acid. In addition, there was a reduction in the production of hydroxyl radical as well as the production of nitric oxide. To the best of our knowledge, this is the first report on compounds from this species that have activity for potentially preventing neurodegenerative disorders.

**Key words:** *Eugenia dysenterica*, essential oil, antioxidant, anticholinesterase.

### INTRODUCTION

A variety of essential oil of plants has shown

acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity and may be

## Fwd: Decision Letter to Authors - Acceptance - (JAPS-2016-09-759)

Chistiane Feitosa <[chistiane@ufpi.edu.br](mailto:chistiane@ufpi.edu.br)>

ter 25/10/2016 08:31

Para: GEORGE LAYLSON GEORGE <[georgenota10@hotmail.com](mailto:georgenota10@hotmail.com)>; Cassio Herbert <[cassio\\_102@hotmail.com](mailto:cassio_102@hotmail.com)>;  
katicia.cardoso@ifma.edu.br <[katicia.cardoso@ifma.edu.br](mailto:katicia.cardoso@ifma.edu.br)>; Ciro Gonçalves Sá <[cirogsa@hotmail.com](mailto:cirogsa@hotmail.com)>;

----- Mensagem encaminhada -----

De: "Journal of Applied Pharmaceutical Science" <[japs@ejmanager.com](mailto:japs@ejmanager.com)>

Data: 25/10/2016 03:00

Assunto: Decision Letter to Authors - Acceptance - (JAPS-2016-09-759)

Para: <[chistiane@ufpi.edu.br](mailto:chistiane@ufpi.edu.br)>

Cc:

Dear Dr. Chistiane Mendes Feitosa,

I am pleased to inform you that your manuscript titled as "Antioxidant and anticholinergic properties of Citrus sinensis (L.) Osbeck (Rutaceae) essential oil in mice hippocampus." (Manuscript Number: JAPS-2016-09-759) was accepted for publication in the Journal of Applied Pharmaceutical Science. You are required to submit article processing charges USD 85 within next three days of receiving this mail through Banking/Paypal. Payment details are as follows;