



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VALÉRIA LIMA SILVA

Atividades farmacológicas da guatterioipsiscina, composto isolado da espécie *Guatteria  
friesiana* (Annonaceae), na terapia da doença de Alzheimer

Teresina – Piauí  
2016

VALÉRIA LIMA SILVA

Atividades farmacológicas da guatterioipsiscina, composto isolado da espécie *Guatteria  
friesiana* (Annonaceae), na terapia da doença de Alzheimer

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade  
Federal do Piauí, como um dos requisitos para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Chistiane Mendes Feitosa

Teresina – Piauí

2016

**Universidade Federal do Piauí**  
**Serviço de Processamento Técnico**  
**Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde**

Silva, Valéria Lima.

S586a      Atividades farmacológicas da guatteriopticina, composto isolado da espécie *Guatteria friesiana* (Annonaceae), na terapia da doença de Alzheimer / Valéria Lima Silva. -- Teresina, 2016.  
138 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Chistiane Mendes Feitosa.

Bibliografia

1. Guatteriopticina. 2. Doença de Alzheimer. 3. Atividade anticolinesterásica. I. Título. II. Teresina – Universidade Federal do Piauí.

CDD 615.1

VALÉRIA LIMA SILVA

Atividades farmacológicas da guatterioipsiscina, composto isolado da espécie *Guatteria friesiana* (Annonaceae), na terapia da doença de Alzheimer

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Aprovada em 29/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Christiane Mendes Feitosa

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Chistiane Mendes Feitosa – (Orientadora)  
Departamento de Química – CCN/UFPI

Edigenia Cavalcante da Cruz Araújo

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Edigenia Cavalcante da Cruz Araújo – (Examinador Externo)  
Departamento de Química – UNIVASF

Lidiane da Silva Araújo

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lidiane da Silva Araújo – (Examinador Externo)  
Departamento de Química – USP

Paulo Michel P. Ferreira

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira – (Examinador Interno)  
Departamento de Biofísica e Fisiologia – UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Hélder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Ferraz Mendes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcília Pinheiro da Costa

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais, Silvanira e Wilson, por todo amor e dedicação com que sempre cuidaram de mim e por terem me permitido viver com honestidade, dignidade e caráter.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por sempre estar ao meu lado e por ter permitido que eu chegasse até aqui, sempre me dando força e coragem para que eu atinja meus objetivos.

Aos meus pais, Silvanira e Wilson, por serem meu alicerce, por sempre me apoiarem em minhas decisões e por todos os cuidados dispendidos para minha educação e formação.

Aos meus irmãos, Viviane e Victor, pelo amor, alegrias, compreensão e companheirismo durante essa jornada. É muito bom ter vocês ao meu lado todos os dias!

Ao meu noivo, Diego Veras, pelo amor, paciência e compreensão, sempre me apoiando em minhas decisões.

À minha orientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Chistiane Mendes Feitosa pela confiança em mim durante a realização deste trabalho, pela amizade e pela paciência e disponibilidade para me orientar.

Ao prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa pela importante contribuição neste trabalho.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Mônica Regina Silva de Araújo pelos experimentos de RMN.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidiane da Silva Araújo pelas contribuições dadas no exame de qualificação e por, mais uma vez, avaliar este trabalho participando da banca de defesa.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edigenia Cavalcante da Cruz Araújo e ao prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira por, gentilmente, disponibilizarem-se a participar da banca de defesa deste trabalho.

Ao médico veterinário Felipe Cardoso de Brito por todo o acompanhamento dado nos experimentos com animais.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI pelos conhecimentos transmitidos.

Aos laboratórios da UFPI, Laboratório de Pesquisas em Neuroquímica Experimental – LAPNEX, Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV, Laboratório de

RMN – LAUREMN, Laboratório de Pesquisas em Cosméticos e Medicamentos – LAPCOM,  
Laboratório de Genética Toxicológica – LAPGENIC.

Ao Laboratório de Materiais – LABMAT, do Instituto Federal do Piauí, pelas análises feitas.

À Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo incentivo financeiro.



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

Ezequiel (47:12)

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\beta$ A	Beta-amiloide
$\beta$ -CD	Beta-ciclodextrina
®	Marca registrada
ABTS	2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico)
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
ATCI	Iodeto de acetiltiocolina
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAT	Colina acetiltransferase
CI	Complexo de inclusão
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória em cinquenta por cento
CoA	Coenzima A
DA	Doença de Alzheimer
D.P	Desvio padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DRX	Difração de raios-X
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
FT-IR	Infravermelho com transformada de Fourier
IV	Infravermelho
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
m/m	Razão massa/ massa
NPS	Nitroprussiato de sódio
RMN	Ressonância magnética nuclear
TGA	Análise termogravimétrica
Trolox	Ácido 6-hidróxi-2,5,8,7-tetrametilcromano-2-carboxílico
v/v	Razão volume/ volume

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Frutos de algumas espécies de Anonáceas.....	23
Figura 2 - Estrutura química do alcaloide Guatterriopsiscina.....	26
Figura 3 - Estrutura química dos esqueletos dos alcaloides dehidroaporfínicos (Tipo IX).....	26
Figura 4 - Estrutura química dos alcaloides galantamina e sanguinina.....	27
Figura 5 - Biossíntese da acetilcolina.....	30
Figura 6 - Hidrólise da acetilcolina.....	30

### CAPÍTULO I

Figura 1 - Fotografia da espécie <i>G.friesiana</i> .....	46
Figura 2 - Estrutura dos esqueletos dos alcaloides de Anonáceas.....	47

### CAPÍTULO II

Figura 1 - Estrutura química do alcaloide Guatterriopsiscina.....	70
Figura 2 - Placa de inibição qualitativa da enzima AChE para a guatterriopsiscina.....	75
Figura 3 - Capacidade antioxidante do alcaloide guatterriopsiscina na inibição da produção de radicais DPPH•.....	77
Figura 4 - Capacidade antioxidante do alcaloide guatterriopsiscina contra a produção do íon nitrito.....	78
Figura 5 - Potencial redutor ( $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ ) do alcaloide guatterriopsiscina.....	79
Figura 6 - Capacidade antioxidante da guatterriopsiscina na inibição do radical ABTS.	80

### CAPÍTULO III

Figura 1 - Aparato utilizado para o teste do campo aberto.....	91
Figura 2 - Fotografia do labirinto em cruz elevado.....	91
Figura 3 - Aparato utilizado para o teste do nado forçado.....	92
Figura 4 - Fotografia da caixa de esquiva-passiva.....	92
Figura 5 - Efeitos da guatterriopsiscina em camundongos no teste do campo aberto....	95
Figura 6 - Efeitos da guatterriopsiscina em camundongos no labirinto em cruz elevado.....	96
Figura 7 - Efeitos da guatterriopsiscina em camundongos no teste do nado forçado....	97

Figura 8 -	Efeitos da guatteriopticina em camundongos no teste da esquiva-passiva.	98
Figura 9 -	Inibição da AChE no cerebelo, córtex frontal e hipocampo, em camundongos.....	100
Figura 10-	Micrografias de fígados de camundongos tratados com salina, DMSO, guatteriopticina e rivastigmina .....	103

#### **CAPÍTULO IV**

Figura 1 -	Estrutura da $\beta$ -ciclodextrina.....	112
Figura 2 -	Espectros de absorção na região do IV para a guatteriopticina, a $\beta$ -CD e o complexo de inclusão.....	115
Figura 3 -	Curvas de TGA para a guatteriopticina, a $\beta$ -ciclodextrina e o complexo de inclusão.....	117
Figura 4 -	Perfil difratométrico da guatteriopticina, da $\beta$ -ciclodextrina e do complexo de inclusão da guatteriopticina com $\beta$ -CD.....	118
Figura 5 -	Eletromicrografias da $\beta$ -ciclodextrina, da guatteriopticina e do complexo de inclusão.....	120
Figura 6 -	Espectros de RMN $^1\text{H}$ da guatteriopticina, da $\beta$ -CD e do complexo de inclusão de guatteriopticina com $\beta$ -CD, em DMSO- $\text{d}_6$ .....	121
Figura 7 -	Regiões da guatteriopticina que tiveram maior variação de $T_1$ .....	124
Figura 8 -	Leitura espectrofotométrica da guatteriopticina.....	124
Figura 9 -	Curva de calibração da guatteriopticina.....	125
Figura 10-	Perfil de dissolução da guatteriopticina e do complexo GUA: $\beta$ -CD.....	125

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO I

Quadro 1 - Atividades biológicas de compostos extraídos da espécie <i>Guatteria</i> <i>friesiana</i> .....	63
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1 - Quantidade de publicações encontradas em cada base de dados para cada descritor de busca.....	43
Tabela 2 - Descrição resumida dos estudos sobre a espécie <i>G. friesiana</i> .....	44
Tabela 3 - Principais constituintes químicos de <i>G. friesiana</i> .....	50

### CAPÍTULO II

Tabela 1 - Atividade inibitória da AChE sobre alguns compostos.....	76
---------------------------------------------------------------------	----

### CAPÍTULO III

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos ao tratamento com guatterriopsiscina, por via intraperitoneal (i.p).....	101
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

### CAPÍTULO IV

Tabela 1 - Valores de $T_1$ (s) e de deslocamentos químicos de prótons medidos para a molécula de guatterriopsiscina, na ausência e na presença de $\beta$ -ciclodextrina.....	123
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

**Atividades farmacológicas da guatterioipsiscina, composto isolado da espécie *Guatteria friesiana* (Annonaceae), na terapia da doença de Alzheimer.** SILVA, V.L. Orientadora: Chistiane Mendes Feitosa. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2016.

## RESUMO

A guatterioipsiscina é um alcaloide que pode ser isolado das folhas ou do caule da espécie *Guatteria friesiana* (W.A. Rodrigues) Erkens & Maas (Annonaceae), uma planta nativa do Brasil, conhecida popularmente como “envireira” e encontrada particularmente na região Amazônica. Em um *screening* fitoquímico realizado com alcaloides, a guatterioipsiscina apresentou significativa atividade inibidora da acetilcolinesterase (AChE), enzima que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses nervosas; que sugere a possível aplicação desse alcaloide em doenças que apresentam, em seu processo fisiopatológico, uma redução dos níveis de acetilcolina, como é o caso da doença de Alzheimer (DA). A DA é neurodegenerativa, irreversível e progressiva e um dos tipos de demência que mais atinge a população mundial, principalmente os idosos e, apesar de não ter cura, o uso de fármacos inibidores da AChE é um tratamento que tem sido bastante eficaz em diminuir os sintomas dessa doença. Nesse contexto, este estudo objetivou avaliar os efeitos da guatterioipsiscina sobre o sistema nervoso central de camundongos, com ênfase na atividade anticolinesterásica, além de propor a complexação deste alcaloide com  $\beta$ -ciclodextrina, a fim de melhorar a solubilidade da guatterioipsiscina em água. Assim, esta pesquisa se iniciou com uma prospecção científica e tecnológica sobre a espécie *G. friesiana*. Em seguida, realizaram-se ensaios *in vitro* para verificação das atividades anticolinesterásica e antioxidantes. A guatterioipsiscina apresentou  $CI_{50}=0,3 \mu\text{g/ml}$  para inibição da AChE *in vitro* e mostrou resultados significativos para atividade antioxidante *in vitro* no sequestro de óxido nítrico e na eliminação de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil nas concentrações 100; 50; 25; 12,5 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ . A atividade anticolinesterásica *ex vivo* foi avaliada nas seguintes áreas cerebrais de camundongos *Swiss*: córtex frontal, hipocampo e cerebelo, e a guatterioipsiscina reduziu a atividade da enzima AChE, principalmente, no córtex frontal e no hipocampo, na dose de 5,0  $\text{mg.Kg}^{-1}$ . Outros efeitos verificados sobre o sistema nervoso central foram: efeito sobre a atividade locomotora, ansiolítico, antidepressivo e sobre a memória; através de testes comportamentais em camundongos tratados com guatterioipsiscina nas doses de 0,1; 1,0 e 5,0  $\text{mg.Kg}^{-1}$ . Os resultados mostraram que a administração aguda do alcaloide não afetou a atividade locomotora, não possui efeitos ansiolítico/ansio gênico e antidepressivo, mas mostrou atividade sobre a memória de curto prazo nas três doses testadas. Para a complexação da guatterioipsiscina com  $\beta$ -ciclodextrina utilizou-se a técnica de malaxagem e a caracterização química foi feita por espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios X, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura e ressonância magnética nuclear. As interações supramoleculares envolvidas no processo de complexação foram estudadas através das medidas de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ). Também foram feitos estudos de dissolução. A análise dessas técnicas mostrou que houve a formação do complexo de inclusão entre a guatterioipsiscina e a  $\beta$ -ciclodextrina e esse complexo melhorou a solubilidade do alcaloide. Portanto, os resultados obtidos foram promissores para elaboração da formulação farmacêutica com o complexo e sua possível aplicação na terapia da doença de Alzheimer.

**Palavras-chave:** Guatterioipsiscina; Doença de Alzheimer; Atividade anticolinesterásica; Complexo de inclusão.

**Pharmacological activities of guatteriopticine, isolated compound of specie *Guatteria friesiana* (Annonaceae), in Alzheimer's disease therapy.** SILVA, V.L. Advisor: Chistiane Mendes Feitosa. Master's Dissertation. Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2016.

#### ABSTRACT

Guatteriopticine is an alkaloid that can be isolated from the leaves or stems of the species *Guatteria friesiana* (W. A. Rodrigues) Erkens & Maas (Annonaceae), a Brazil's native plant, popularly known as "envireira" and found particularly in the Amazon region. In a phytochemical screening done with alkaloids, the guatteriopticine showed significant inhibitory activity of acetylcholinesterase (AChE), the enzyme that degrades the neurotransmitter acetylcholine at synapses; suggesting the possible application of this alkaloid in diseases presenting in its pathophysiological process, a reduction of acetylcholine levels, such as Alzheimer's disease (AD). AD is a neurodegenerative, progressive and irreversible and types of dementia that affects more the world population, especially the elderly, although no cure, the use of AChE inhibitors drugs is a treatment method has been effective in reducing the symptoms of this disease. In this context, this study aimed to evaluate the effects of guatteriopticine on the central nervous system of mice with an emphasis on acetylcholinesterase activity, in addition to proposing the complexation of this alkaloid with  $\beta$ -cyclodextrin in order to improve the solubility of guatteriopticine in water. Thus, this research began with a scientific and technological foresight on the species *G. friesiana*. Then conducted *in vitro* tests to verify the anticholinesterase and antioxidant activities. The guatteriopticine showed  $IC_{50} = 0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$  to inhibition of AChE *in vitro* and showed significant results for *in vitro* antioxidant activity of nitric oxide sequestering and disposal of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl concentrations 100; 50; 25; 12.5 e 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The anticholinesterasic *ex vivo* activity was evaluated in the following areas of the brain of *Swiss* mice: frontal cortex, hippocampus and cerebellum, and guatteriopticine reduced the activity of AChE enzyme mainly in the frontal cortex and hippocampus at a dose of 5.0  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . Other observed effects on the central nervous system were: effect on locomotor activity, anxiolytic, antidepressant and the memory; by behavioral tests in mice treated with guatteriopticine at doses of 0.1; 1.0 and 5.0  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . The results showed that the acute administration of alkaloid did not affect locomotor activity, has no anxiolytic/anxiogenic and antidepressant effects, but showed activity on short-term memory at the three doses tested. Also the effects of guatteriopticine in hematological parameters and effects on the liver of mice by histopathological studies, and the results showed that alkaloid did not significantly alter these parameters were checked. For the complexation of guatteriopticine with  $\beta$ -cyclodextrin was used to kneading technique and chemical characterization carried out through the following analysis: spectroscopy in the infrared, X-ray diffraction, thermal analysis, scanning electron microscopy and magnetic resonance nuclear. The supramolecular interactions involved in the complexation process were studied by the longitudinal relaxation time measurements ( $T_1$ ). Also dissolution studies were made. The analysis showed that these techniques have the formation of the inclusion complex between guatteriopticine and  $\beta$ -cyclodextrin and the complex improved the solubility of alkaloid. Therefore, the results were promising for the preparation of pharmaceutical formulation with the complex and its possible application in the treatment of Alzheimer's disease.

**Keywords:** Guatteriopticine; Alzheimer's disease; Acetylcholinesterase activity; Inclusion complex.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	22
3.1 A família Annonaceae.....	22
3.2 O gênero <i>Guatteria</i> Ruiz & Pav.....	23
3.3 Alcaloides de <i>Guatteria</i> Ruiz & Pav.....	24
3.4 Alcaloides inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	27
3.5 A doença de Alzheimer.....	28
<b>Referências</b> .....	32
<b>4. CAPÍTULO I: Atividades biológicas de extratos e de substâncias isoladas de <i>Guatteria friesiana</i> (W. A. Rodrigues) Erkens &amp;Maas – prospecção científica e tecnológica</b> .....	39
<b>Resumo</b> .....	40
<b>Abstract</b> .....	40
<b>Introdução</b> .....	41
<b>Materiais e Métodos</b> .....	41
<b>Resultados e Discussão</b> .....	42
<b>Conclusão</b> .....	64
<b>Referências</b> .....	65
<b>5. CAPÍTULO II: Análise das atividades antioxidante e anticolinesterásica <i>in vitro</i> da guatterioipsiscina, alcaloide isolado das folhas de <i>Guatteria friesiana</i></b> .....	67
<b>Resumo</b> .....	68
<b>Abstract</b> .....	68
<b>Introdução</b> .....	69
<b>Materiais e Métodos</b> .....	70
<b>Resultados e Discussão</b> .....	74
<b>Conclusão</b> .....	81
<b>Referências</b> .....	82

<b>6. CAPÍTULO III: Avaliação dos efeitos da guatteriopsicina sobre o sistema nervoso central de camundongos.....</b>	<b>85</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>86</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>86</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>88</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>89</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>94</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>104</b>
<b>Referências.....</b>	<b>105</b>
<b>7. CAPÍTULO IV: Delineamento de uma formulação farmacêutica: Elaboração e caracterização do complexo de inclusão de guatteriopsicina com <math>\beta</math>-ciclodextrina.....</b>	<b>109</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>110</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>110</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>111</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>112</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>114</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>126</b>
<b>Referências.....</b>	<b>127</b>
<b>8. CAPÍTULO V: Pedido de patente: Substâncias úteis na terapia da doença de Alzheimer isolados de <i>Guatteria friesiana</i>, <i>Guatteria blepharophylla</i>, <i>Xylopi leavigata</i> e suas aplicações em formulações farmacêuticas.....</b>	<b>130</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>131</b>
<b>Reivindicações.....</b>	<b>132</b>
<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>134</b>
<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos e o maior número de espécies vegetais encontra-se nas regiões equatoriais da América do Sul, da África e da Ásia e o máximo de diversidade global encontra-se na flora da Colômbia, Equador e Peru, onde mais de 40.000 espécies ocorrem em uma área de apenas 2% da superfície terrestre. Considerando-se somente o Brasil, a magnitude de sua biodiversidade não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos, o que o torna o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (GUERRA E NODARI, 2010).

Essa diversidade vegetal se deve à grande extensão do território brasileiro abrangendo os mais variados tipos de clima e de solo, o que leva a formações vegetais adaptadas a cada tipo. Dentre essas formações, a Floresta Amazônica se destaca por ser a maior e mais diversa floresta tropical do mundo. Ela abrange mais de seis milhões de km<sup>2</sup> em nove países da América do Sul (DIRZO E RAVEN, 2003). Sua fisionomia e estrutura apresentam variações em função do ambiente em que ela se encontra. É mais exuberante nas áreas de baixadas com relevo ondulado do que nas áreas de interflúvios de relevo plano, com concentração de determinadas espécies. Destacam-se, em sua composição florística, entre outros, os gêneros *Xylopia*, *Guatteria* e *Bocageopsis*, pertencentes à família Annonaceae (IBGE, 2012).

A família Annonaceae compreende cerca de 120 gêneros e mais de 2000 espécies distribuindo-se, largamente, por toda a zona tropical e subtropical do planeta (LEBOEUF, 1982). No Brasil, são conhecidos 29 gêneros perfazendo um total de 392 espécies (MAAS, 2015). Dentre os gêneros da família Annonaceae, *Guatteria* é um dos maiores com 210 espécies reconhecidas (CHATROU, 2012). Uma dessas espécies, *Guatteria friesiana*, é uma árvore nativa do Brasil, conhecida, popularmente, como envireira. É encontrada na Região Norte, principalmente, no estado do Amazonas e no domínio fitogeográfico da Floresta Amazônica (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2015).

As espécies da família Annonaceae são conhecidas pelo seu conteúdo rico em alcaloides, os quais possuem relevância quimiotaxonômica (CASTEDO et al., 1991). Além disso, os alcaloides vegetais têm se mostrado especialmente efetivos em seus efeitos medicinais e se encontram amplamente distribuídos em muitas espécies de plantas tropicais. Exemplos elucidativos são os alcaloides vincristina e vimblastina, isolados da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, originária de Madagascar, que são efetivos no tratamento da leucemia infantil; a pilocarpina, isolada das folhas de jaborandi (*Pilocarpus* spp.), utilizada

no tratamento do glaucoma (GUERRA E NODARI, 2010); a galantamina, isolada de plantas da família Amaryllidaceae, utilizada no tratamento da doença de Alzheimer e a huperzina A, isolada da planta *Huperzia serrata*, e que também vem se mostrando eficaz no tratamento da doença de Alzheimer, porém ainda não é comercializada como medicamento (ZHANG et al., 2002). Os alcaloides galantamina e huperzina A são efetivos no tratamento da doença de Alzheimer por apresentarem potente ação inibidora da enzima acetilcolinesterase.

A doença de Alzheimer (DA) afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Estimativas apontam que sejam 24 milhões, e que, em trinta anos, este número chegará a 81 milhões (FERRI et al., 2005). O tratamento para a DA é sintomático e consiste na tentativa de restaurar a função colinérgica, uma vez que a elevação dos níveis do neurotransmissor acetilcolina tem se mostrado útil na melhora da deficiência da aprendizagem, um dos sinais da doença; por isso, substâncias inibidoras da enzima acetilcolinesterase (AChE) são amplamente usadas no tratamento dessa doença (SERENIKI et al., 2008).

Dentre essas substâncias, a rivastigmina (Exelon<sup>®</sup>) é uma das mais utilizadas no tratamento da DA, entretanto esse medicamento apresenta efeitos gastrointestinais adversos, associados ao aumento de peso dos pacientes (GROSSBERG, 2003); já a tacrina (Cognex<sup>®</sup>), primeiro inibidor reversível da AChE utilizado no tratamento da DA, apresentou hepatotoxicidade, levando ao aumento das transaminases hepáticas e resultando em hepatite medicamentosa, o que provocou sua retirada do mercado (SHAO et al., 2004). A galantamina (Reminyl<sup>®</sup>), um alcaloide vegetal, é considerada um dos medicamentos mais efetivos no tratamento da DA por apresentar poucos efeitos colaterais (BOKDE et al., 2009) e as pesquisas mostram que a huperzina A, também um alcaloide de origem vegetal, melhora significativamente a memória de pessoas idosas e de pessoas com DA, associada a mínimos efeitos colinérgicos periféricos e ausência de hepatotoxicidade (ZHANG et al., 2002).

A busca por novos inibidores da enzima AChE, de origem vegetal, constitui-se em uma alternativa promissora e viável (FEITOSA, 2005) e as espécies de Anonáceas destacam-se pelas aplicações medicinais, algumas comprovadas e outras ainda empíricas, de extratos de partes da planta e de substâncias isoladas. Apenas para a espécie *G. friesiana*, podem-se citar as seguintes atividades biológicas já estudadas: antimicrobiana (COSTA et al., 2008), larvicida (ACIOLE et al., 2011), antitumoral (BRITTO et al., 2012) e citotóxica (COSTA et al., 2013)

Nesse contexto, em estudos preliminares comprovamos que alguns alcaloides isolados de espécies de Anonáceas mostraram atividade inibitória *in vitro* frente à enzima acetilcolinesterase, sendo que o alcaloide guatterriopsiscina, isolado das folhas da espécie *G. friesiana*, foi o que apresentou a melhor atividade de inibição. Diante disso, este trabalho teve

como objetivos avaliar os efeitos da guatterioipsiscina sobre o sistema nervoso central de camundongos, com ênfase na atividade anticolinesterásica, além de propor a complexação deste alcaloide com  $\beta$ -ciclodextrina visando sua aplicação na melhoria dos agravos causados pela doença de Alzheimer.

O presente trabalho foi estruturado em capítulos sendo que o primeiro capítulo consiste de uma prospecção científica e tecnológica sobre a espécie *G. friesiana* para analisar o estado da arte desta espécie; o segundo capítulo apresenta estudos *in vitro* para verificação das atividades antioxidante e anticolinesterásica do alcaloide guatterioipsiscina; o terceiro capítulo mostra estudos *ex vivo* para a atividade anticolinesterásica e os efeitos do alcaloide sobre o sistema nervoso central em camundongos; o quarto capítulo aborda o delineamento de uma formulação farmacêutica a partir da elaboração de um complexo de inclusão entre guatterioipsiscina e  $\beta$ -ciclodextrina. O último capítulo trata de um pedido de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Verificar a atividade anticolinesterásica da guatteriopsiscina e seu efeito sobre a memória de camundongos, além de obter complexos de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina, visando sua aplicação na terapêutica da doença de Alzheimer.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o estado da arte e da técnica das pesquisas envolvendo a espécie *Guatteria friesiana*;
- Estabelecer o valor da quantidade mínima de guatteriopsiscina capaz de inibir cinquenta por cento da atividade da enzima acetilcolinesterase (CI<sub>50</sub>);
- Quantificar os níveis de radicais ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), potencial redutor e conteúdo de nitrito em ensaios *in vitro*;
- Avaliar os efeitos ansiolítico, antidepressivo, sobre a atividade locomotora e efeitos sobre a memória de camundongos, usando testes comportamentais;
- Analisar possíveis alterações que a administração aguda de guatteriopsiscina poderia causar em parâmetros hematológicos e estudos histopatológicos do fígado dos camundongos;
- Preparar complexos de inclusão de guatteriopsiscina com  $\beta$ -ciclodextrina e caracterizá-los por espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e ressonância magnética nuclear.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A família Annonaceae

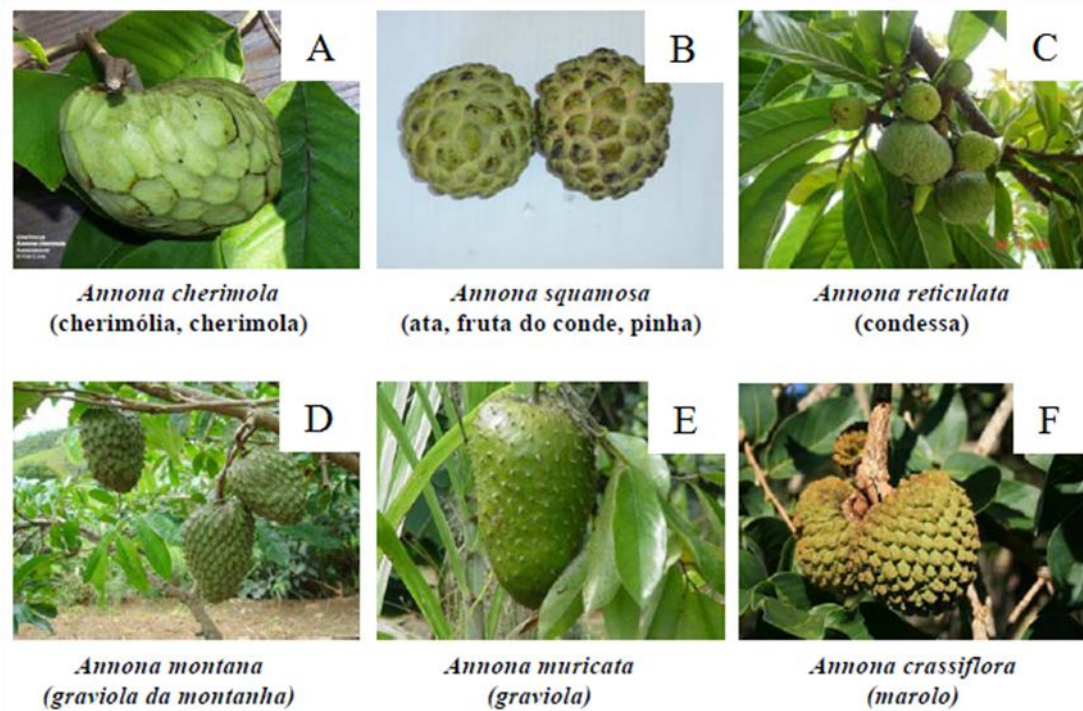
A família Annonaceae foi catalogada por Jussieu em 1789 (HUTCHINSON, 2004), é a maior da ordem Magnoliales (SAUQUET et al., 2003), compreende 135 gêneros distribuídos em 2500 espécies catalogadas e é encontrada predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, América Central, África, Ásia e Austrália (CHATROU; RAINER; MAAS, 2004).

Na América do Sul, as Anonáceas são representadas por 39 gêneros (HOCQUEMILLER et al., 1981). No Brasil, são 29 gêneros perfazendo 392 espécies (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2015) distribuídas pela Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado (MAAS et al., 2013). As Anonáceas estão classificadas em quatro subfamílias: Anaxagoreoideae, Annonoideae, Ambavioideae e Malmeoideae (CHATROU et al. 2012), todas com espécies representadas no Brasil (MAAS; RAINER; LOBÃO, 2013). A maior subfamília, Annonoideae, é detentora dos gêneros de maior ocorrência no Brasil: *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia* (MAAS, 2009).

As espécies da família Annonaceae são caracterizadas pela presença de alguns aspectos morfológicos extremamente primitivos, tais como: flores com numerosas partes livres, estames dispostos em espiral, carpelos livres, etc. Por isso Darwin as chamou de "fósseis vivos" pois, através de alguma circunstância favorável, escaparam da extinção e sobreviveram até os dias atuais (TAKHTAJAN, 1969). Quimicamente, as Anonáceas são conhecidas pelo seu conteúdo rico em alcaloides, mas também possuem diversos constituintes não alcaloidais como carboidratos, lipídios, aminoácidos, proteínas, polifenóis, óleos essenciais, terpenos, compostos aromáticos, esteroides, saponinas e vitaminas (LEBOEUF et al., 1982).

Essas plantas possuem relevante papel econômico, em especial, nas indústrias alimentícia, madeireira, cosmética e farmacêutica. Os frutos de anonáceas são muito apreciados e consumidos frescos ou processados em preparações como sucos, sorvetes, geleias, compotas, licores e doces (PIMENTA et al., 2013; CORRÊA et al., 2011; BRAGA FILHO et al., 2009; SILVA et al., 2007). Os mais conhecidos são os dos gêneros *Annona* e *Rollinia*, a saber: *A. cherimolia* (cherimólia), *A. crassiflora* (marolo), *A. squamosa* (ata, fruta do conde ou pinha), *A. Montana* (graviola da montanha), *A. muricata* (guanabana, graviola), *A. Reticulata* (condessa), *R. mucosa* (biribá), *R. sylvatica* (araticum) e *R. deliciosa* (biribá) (KESSLER, 1993). A Figura 1 (p. 23) mostra os frutos de algumas dessas espécies.

Espécies como *Bocageopsis* spp., *Fusae longifolia*, *Guatteria megalophylla*, *G. stipitata*, *Oxandra polyantha*, *O. lanceolata*, *Xylopia aethiopia* e *X. villosa* possuem importância econômica em madeireiras (KESSLER, 1993; SÁNCHEZ, 1997; MURILO & RESTREPO, 2000). Outras espécies têm a madeira de seus caules empregada na produção de álcool e papel (LEBOEUF et al., 1982).



**Figura 1-** Frutos de algumas espécies de Anonáceas.

Fonte: (A, B, C, D, E) <http://picasaweb.google.com/Amezzomo2002/Fruits11> (F) <http://picasaweb.google.com/evandoflopes/Frutos>.

Na Ásia e África, as flores de *Cananga odorata* e *Artabotrys odoratissima* são usadas na fabricação de perfumes (óleo de “ylang-ylang”) (KESSLER, 1993) e um grande número de espécies de Anonáceas é utilizado na medicina tradicional.

### 3.2 O gênero *Guatteria* Ruiz & Pav.

O gênero *Guatteria* foi descrito, em 1794, por Ruiz Lopez e Pavón (ERKENS, 2007). É o maior gênero da família Annonaceae com cerca de 300 espécies e é o único membro da tribo Guatterieae (ERKENS E MAAS, 2008). É exclusivamente neotropical e está amplamente distribuído por toda a Mesoamérica (cerca de 30 espécies), Caribe (3 espécies) e América do Sul (cerca de 230 espécies) (ERKENS et al., 2007). No Brasil, ocorrem 88 espécies (MAAS; RAINER; LOBÃO, 2013).



O gênero apresenta problemas taxonômicos complexos pela dificuldade de delimitação das espécies e seu agrupamento em seções (FRIES, 1939). Isto ocorre em consequência da uniformidade dos caracteres florais (HEUSDEN, 1992) e da variabilidade intraespecífica dos caracteres vegetativos. Como agravante, há poucas coleções com flores maduras nos herbários e muitos materiais encontram-se duvidosamente identificados (LOBÃO E MELLO-SILVA, 2007).

As espécies de *Guatteria* são, em sua maioria, árvores, apenas duas espécies são lianas, característica pouco comum nas Annonaceae (KESSLER, 1993; LOBÃO, 2009). As flores de *Guatteria* são facilmente reconhecíveis, pois, quando imaturas, as pétalas são patentes, e os estames e carpelos ficam expostos. Quando maduras, as pétalas externas permanecem patentes, mas as internas tornam-se eretas, recobrando estames e carpelos (LOPES E MELLO-SILVA, 2012). Seus frutos possuem numerosos carpídios livres, estipitados e indeiscentes, cada um com uma única semente (LOPES E MELLO SILVA, 2013).

O gênero mostra uma ampla distribuição ecológica podendo ser encontrado na Amazônia em florestas de terra firme, campinas e florestas inundadas; na Mata Atlântica; em florestas de galerias e em florestas semi-decíduas (MORAWETZ E WAHA, 1985). No Cerrado, *Guatteria notabilis* Mello-Silva & Pirani e *G. rupestris* Mello-Silva & Pirani, ambas de Minas Gerais, e *Guatteria rigida* R.E.Fr, do Mato Grosso, estão entre os raros exemplos de *Guatteria* de ambientes secos e abertos (MELLO-SILVA; PIRANI, 1988, 1994; MAAS; RAINER; LOBÃO, 2013).

### **3.3 Alcaloides de *Guatteria* Ruiz & Pav.**

Alcaloides são compostos nitrogenados, farmacologicamente ativos e encontrados, principalmente, nas angiospermas. A maioria possui caráter alcalino, com poucas exceções, tais como: colchicina, piperina, oximas e alguns sais quaternários. Os alcaloides que possuem um átomo de nitrogênio (N) em um anel heterocíclico são denominados de alcaloides verdadeiros e são classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula; os que possuem N não pertencente a um sistema heterocíclico são chamados de protoalcaloides e os compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcaloides (SIMÕES et al., 2010).

Investigações fitoquímicas mostram que as espécies do gênero *Guatteria* são ricas em alcaloides. Entretanto, a revisão que se tem sobre os alcaloides deste gênero foi feita em 1989 por Cavé, Lebouf e Cassels e, de acordo com esse estudo, os alcaloides de *Guatteria* podem

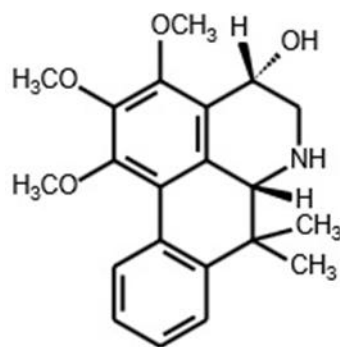
ser classificados segundo as características estruturais do esqueleto em oito principais tipos: benzilisoquinolínico, aminoetilbenzil, bisbenzilisoquinolínico, berbina, morfinandienona, proaporfínico, aporfínoides e aporfínoides miscelaneos. A maioria deles derivados da isoquinolina.

Os alcaloides do tipo bisbenzilisoquinolínico são agrupados em seis subtipos: dauricina, oxiacantina, apatelina, tiliageína, chondodendrina e isochondodendrina. Os aporfínoides são divididos em oito subtipos: aporfínico *sensu stricto*, dehidroaporfínico, hidroxí-aporfínico, oxoaporfínico, 4,5-di-oxoaporfínico, 7-alquil-aporfínico, 1,11-oximetileno-aporfínico e aminoetilfenantreno. E os aporfínoides miscelaneos são agrupados em quatro subtipos: cularinoide, azahomoaporfínico, azaantraceno e azafluoreno (CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989).

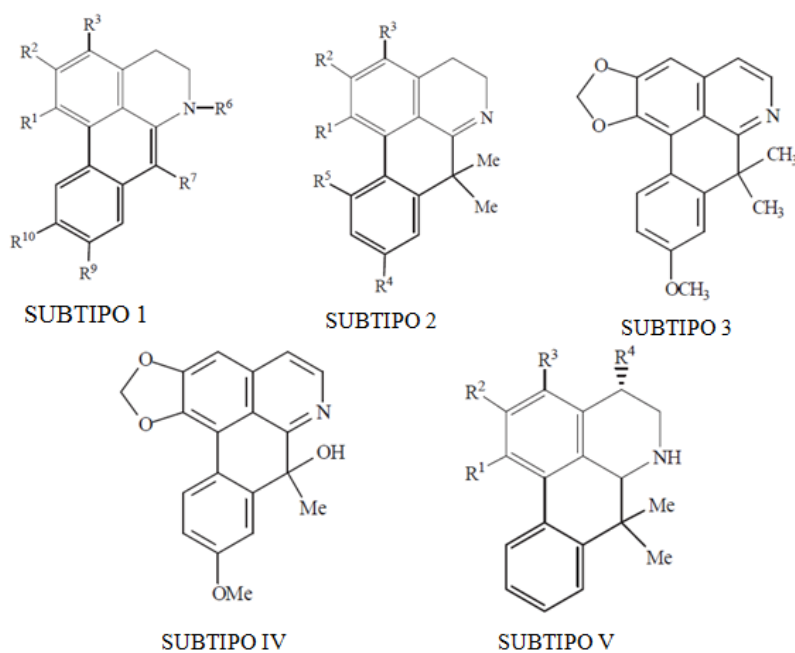
Desde a revisão de Cavé, Leboeuf e Cassels em 1989, muitos estudos sobre a química das espécies de Annonaceae já foram feitos e, atualmente, tem-se uma classificação para os alcaloides das Anonáceas e não, especificamente, uma classificação para os alcaloides do gênero *Guatteria*, como eles propuseram. De acordo com Lúcio et al. (2014), os alcaloides de Annonaceae podem ser classificados em quatorze tipos, a saber: isoquinolínicos simples, isoquinolonas e fenetilamônio (Tipo I); benziltetrahidroisoquinolínicos, benzilisoquinolínicos-*Seco* e benzilisoquinolínicos (Tipo II, subtipos 1–7); bisbenzilisoquinolínicos (Tipo III); bisbenziltetrahidroisoquinolínicos (Tipo IV, subtipos 1 – 22); protoberberinos (Tipo V, subtipos 1 – 5); tetrahidroprotoberberinos (Tipo VI, subtipo 1); proaporfínicos (Tipo VII); aporfínoides *sensu lato* (Tipo VIII, subtipos 1 – 8); dehidroaporfínicos (Tipo IX, subtipos 1 – 5); aporfínicos 4- ou 7- substituídos (Tipo X, subtipos 1 – 3); oxoaporfínicos (Tipo XI, subtipos 1 – 14); fenantrenos (Tipo XII, subtipo 1); alcaloides miscelaneos do tipo isoquinolínicos (Tipo XIII) e alcaloides não-isoquinolínicos (Tipo XIV).

Alguns desses alcaloides possuem atividades biológicas comprovadas. Os bisbenzilisoquinolínicos, por exemplo, têm atividade antiparasitária, especialmente contra *Leishmania* sp. (FOURNET et al., 1993; MUNSHI et al., 1972) *Trypanosoma cruzi* (ROJAS DE ARIAS et al., 1994) e *Plasmodium* sp. (LIKHITWITAYAWUID et al., 1993; VALENTIN et al., 1997; ANGERHOFER et al., 1999).

O alcaloide guatterioipsiscina pode ser isolado das folhas ou do caule de *Guatteria friesiana*. É um alcaloide dehidroaporfínico (Tipo IX, subtipo 5) e foi isolado pela primeira vez por Costa et al. (2009) e, até o momento, só foi encontrado nesta espécie. A Figura 2 (p. 26) mostra a estrutura do alcaloide Guatterioipsiscina e a Figura 3 (p. 26) mostra a estrutura dos esqueletos básicos dos dehidroaporfínicos.



**Figura 2-** Estrutura química do alcaloide guatterioscina.

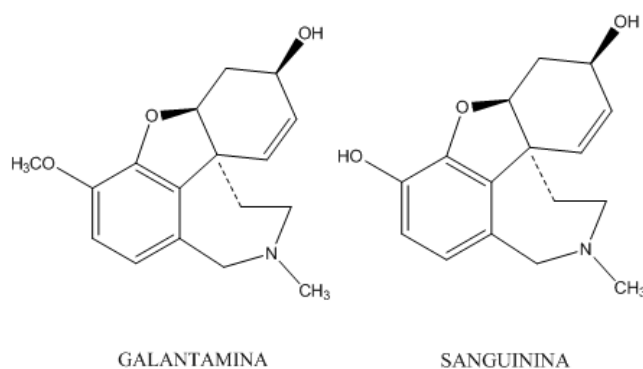


**Figura 3-** Estrutura química do esqueleto dos alcaloides dehidroaporfínicos (Tipo IX).

Em um *screening* previamente realizado utilizando-se vários alcaloides, a guatterioscina apresentou significativa atividade inibitória frente à enzima acetilcolinesterase. Esta enzima é responsável por hidrolizar a acetilcolina nas sinapses; portanto, este achado possui relevância clínica uma vez que a maior parte das doenças neurodegenerativas apresenta em seu mecanismo fisiopatológico uma redução de neurotransmissores, dentre eles, a acetilcolina. Dessa forma, uma substância capaz de inibir a ação da acetilcolinesterase, após pesquisas mais aprofundadas incluindo estudos *in vivo*, aumentaria as opções de medicamentos utilizados na terapêutica dessas doenças, incluindo a doença de Alzheimer.

### 3.4 Alcaloides inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Um número significativo de compostos que ocorrem naturalmente têm sido pesquisados como inibidores da AChE (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006; FILHO et al., 2006). Os que apresentam os resultados mais promissores são o alcaloides da família Amaryllidaceae, galantamina (Figura 4) e sanguinina (Figura 4) (HEINRICH E LEE, 2004), bem como os alcaloides huperzina A e huperzina B (HALL-DORSDOTTIR; JAROSZEWSKI; OLAFSDOTTIR, 2010), que podem ser isolados de espécies de *Lycopodium* e de outras espécies. Dentre os alcaloides citados, o bromidrato de galantamina (Reminyl<sup>®</sup>) já é aprovado como um medicamento para o tratamento da doença de Alzheimer, embora o alcaloide sanguinina seja um inibidor mais potente da AChE do que a galantamina (BORES et al., 1996; LOPES et al., 2002), sua baixa abundância natural tem impedido o seu desenvolvimento. A Figura 4 mostra a estrutura dos alcaloides galantamina e sanguinina.



**Figura 4** - Estrutura química dos alcaloides galantamina e sanguinina.

Os alcaloides isoquinolínicos hippeastrina, pretazettina e montanina, isolados das espécies de Amaryllidaceae *Hippeastrum psittacinum* e *H. vittatum*, tiveram sua atividade inibitória da AChE testada em estudo feito por Pagliosa et al. (2010). A hippeastrina e a pretazettina não apresentaram efeito significativo, já a montanina mostrou significativa atividade anticolinesterásica, quando comparada com a galantamina. Dong et al. (2015) verificaram a atividade frente à AChE de alguns alcaloides aporfínicos e proaporfínicos, também derivados da isoquinolina, isolados das raízes da espécie vegetal *Stephania epigaea* (Menispermaceae). Os alcaloides testados foram: epigasina A, epigasina B, pronuciferina, dehidrodicentrina, romerina, romelina, N-metilcalycinina, fanostenina, dicentrina e N-metillaurotetanina. Os compostos epigasina B e dehidrodicentrina mostraram forte atividade inibitória da AChE, com  $CI_{50}$  4,46 e 2,98  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente. Os compostos romerina,

romelina, *N*-metilcalicinina, fanostenina, dicentrina também exibiram potente atividade anticolinesterásica (DONG et al., 2015).

Alcaloides do tipo oxoaporfínicos e oxoisoaporfínicos, assim como os seus derivados, apresentam potente atividade inibitória da AChE. Estes alcaloides podem ser obtidos de plantas da família Annonaceae (LEVRIER et al., 2013). Estudos demonstraram que os derivados de oxoisoaporfino geralmente exibem melhores atividades inibidoras da acetilcolinesterase do que os derivados de oxoaporfino, e as suas atividades inibidoras foram intimamente relacionadas com os grupos terminais e as posições substituídas. Compostos com nitrogênio quaternário foram encontrados por ter atividades inibidoras mais elevadas tanto para AChE quanto para deposição do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A), outra alteração fisiopatológica que ocorre na DA (LI et al., 2011).

Feitosa et al. (2011) estudaram em um *screening* a atividade anticolinesterásica de extratos de dezoito plantas medicinais brasileiras das seguintes famílias: Convolvulaceae, Crassulaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Malvaceae, Moraceae, Nyctaginaceae e Rutaceae. As espécies mais ativas foram *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) (CI<sub>50</sub> de 0,12 mg/mL), *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) (CI<sub>50</sub> de 0,25 mg/mL), *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) (CI<sub>50</sub> de 0,05 mg/mL), *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) (CI<sub>50</sub> de 0,16 mg/mL) e *Senna alata* (Leguminosae) (CI<sub>50</sub> de 0,08 mg/mL), estes resultados comprovaram a grande importância de um *screening* na busca de inibidores da AChE.

Nesse contexto, vê-se que as pesquisas pela busca de substâncias naturais inibidoras da enzima AChE é constante e são muitos os alcaloides de origem vegetal que possuem essa propriedade, muitos deles derivados da isoquinolina, característica da grande maioria dos alcaloides da família Annonaceae e do alcaloide guatterio-psiscina, foco deste estudo. No entanto, até o momento o único produto natural comercializado como medicamento para o tratamento da DA é o alcaloide galantamina.

### 3.5 A doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pela perda de memória e aprendizado, seguida por déficits cognitivos e distúrbios comportamentais que, progressivamente, tornam-se mais severos (DASTMALCHI, 2007).

De acordo com a *Alzheimer's Disease International Organization* (2013), atualmente a doença de Alzheimer (DA) afeta mais de 44 milhões de pessoas no mundo e as estimativas apontam que serão cerca de 75 milhões de casos em 2030 e 135,5 milhões em 2050. No Brasil, essa doença acomete mais de 1,2 milhão de pessoas, segundo dados da Associação

Brasileira de Alzheimer (ABRAZ, 2012). É o tipo mais frequente de demência, correspondendo a aproximadamente 70% dos casos e afeta, principalmente, a população geriátrica (SPIRES-JONES E HYMAN, 2014).

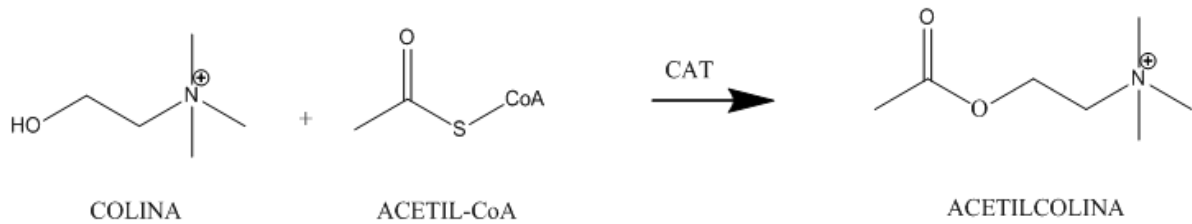
A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que a população mundial deva atingir 9,6 bilhões em 2050, isto somado ao aumento da expectativa de vida que aponta que até o final do século, as pessoas que moram nos países desenvolvidos poderão viver, em média, 89 anos, e as que moram nas regiões em desenvolvimento deverão viver cerca de 81 anos. É importante o aprimoramento no diagnóstico e na terapêutica da DA, uma vez que 90% dos casos têm início após os 65 anos de idade (LEITE et al., 2014).

Geralmente, a DA dura cerca de 8 a 10 anos, desde os primeiros sintomas até a morte. Nos Estados Unidos, a DA é considerada um dos principais problemas de saúde devido ao enorme impacto causado ao indivíduo, famílias, sistema de saúde e a sociedade como um todo, uma vez que metade dos pacientes é internada em instituições de saúde e a outra metade recebe tratamento em casa, envolvendo, em seus cuidados, familiares e amigos. Com isso, o acompanhamento do paciente traz um enorme estresse emocional, psicológico e financeiro às famílias, já que o tratamento é caro e o paciente perde gradativamente suas funções motoras e de aprendizando (VIEGAS JÚNIOR et al., 2004).

Apesar de a fisiopatologia da DA ainda não estar totalmente elucidada, algumas das principais características histopatológicas da DA são a redução considerável no número de células corticais e presença de placas amiloides extracelulares e de emaranhados neurofibrilares intracelulares. O principal componente dos depósitos amiloides é o peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) o qual é originado através da proteólise da proteína precursora amiloide (PPA), uma proteína transmembrana (KANG et al., 1987). Os emaranhados neurofibrilares são constituídos por formas fragmentadas e hiperfosforiladas de proteína tau, uma proteína associada aos microtúbulos (HERNANDEZ E AVILA, 2007). Na DA também ocorre redução na quantidade de acetilcolina (ACh), neurotransmissor do sistema colinérgico. A ACh se liga a duas famílias de receptores, receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) e receptores muscarínicos da acetilcolina (mAChRs) e ambas as famílias de receptores regulam os processos cognitivos, afetados na DA (SARTER E PAOLONE, 2011).

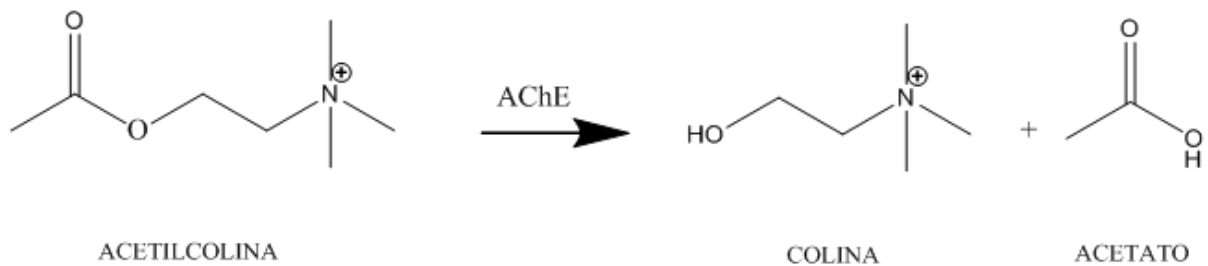
Diante dessas alterações, algumas hipóteses têm tentado explicar a causa da DA, a saber: hipótese amiloide e hipótese colinérgica. A hipótese amiloide propõe que a doença de Alzheimer seja deflagrada por excesso de produção, deposição e agregação da proteína  $\beta$ -amiloide, levando à disfunção neuronal, oxidação, excitotoxicidade e neuroinflamação, responsáveis pela apoptose. O resultado final, decorrido da morte neuronal, é o déficit na neurotransmissão colinérgica, serotoninérgica, dopaminérgica e noradrenérgica, com

predomínio da disfunção colinérgica (KARRAN; MERCKEN; STROOPER, 2011). Já a hipótese colinérgica é fundamentada na deficiência de ACh que ocorre na DA devido à atrofia dos neurônios colinérgicos, os quais são fontes produtoras da enzima colina acetiltransferase (CAT). Essa enzima é transportada para estruturas-alvo no sistema nervoso central: hipocampo, córtex cerebral e amígdala, dentre outras. Nessas regiões, ela catalisa a reação de síntese da ACh a partir da colina e da acetil-coenzima A (Figura 5).



**Figura 5-** Biossíntese da acetilcolina.

Depois de formada, a ACh é liberada na fenda sináptica, onde poderá ser acoplada a dois tipos de receptores, muscarínico e nicotínico. A ACh restante é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) na fenda sináptica em colina e acetato (Figura 6), que são as bases de sua formação. Como na DA, existe uma atrofia dos neurônios colinérgicos, isso resulta na diminuição da síntese da CAT e, conseqüentemente, da ACh (CRAIG; HONG; MCDONALD, 2011).



**Figura 6 -** Hidrólise da acetilcolina.

Pela hipótese amiloide, verifica-se que o estresse oxidativo tem papel relevante na patofisiologia da DA, pois os peptídeos  $\beta$ -amiloides facilitam a geração de radicais livres, os quais provocam peroxidação da membrana lipídica e aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em dano celular e apoptose (MOONGKARNDI et al., 2010). Isso leva a um aumento na ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) o qual está associado com a degeneração neuronal que ocorre na DA (LEE et al., 2005). Por isso, a  $\beta$ A é um dos alvos no desenvolvimento de terapias para a doença de Alzheimer.

Observa-se, também, que, ambas as hipóteses, culminam com a deficiência de acetilcolina. Por esse motivo, a estratégia adotada no desenvolvimento de fármacos para aplicação na DA é aprimorar a função colinérgica. Hoje, os principais medicamentos utilizados no tratamento da DA são os inibidores da AChE, rivastigmina, donezepil e galantamina; os dois primeiros são sintéticos e o último e mais eficaz, é um alcaloide natural.



## REFERÊNCIAS

- ABRAZ. Doença de Alzheimer. 2012. <Disponível em: <http://abraz.org.br/abraz-na-midia/release-institucional-doenca-de-alzheimer>>. Acesso em: 20 jul. 2015.
- ACIOLE, S.D.G.; PICCOLI, C.F.; DUQUE, J.E.L.; COSTA, E.V.; NAVARRO-SILVA, M.A.; MARQUES, F.A.; SALES MAIA, B.H.L.N.; PINHEIRO, M.L.B.; REBELO, M.T. Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomología**. v. 37, n. 2, p. 262-268, 2011.
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. World Alzheimer report 2013: Journey of caring. 2013. Disponível em: <<http://www.alz.co.uk/research/world-report-2013>>. Acesso em: 20 jul. 2015.
- ANGERHOFER, C.K.; GUINAUDEAU, H.; WONGPANICH, V.; PEZZUTO, J.M.; CORDELL, G.A. Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 59-66, 1999.
- 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's disease: a functional magnetic resonance imaging study. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v.29, n.2, p.147-156, 2009.
- BORES, G. M.; HUGER, F.P.; PETKO, W.; MUTLIB, A.E.; CAMACHO, F.; RUSH, D.K.; SELK, D.E.; WOLF, V.; KOSLEY, R.W.; DAVIS, L.; VARGAS, H.M. Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, p. 728-738, 1996.
- BRAGA FILHO, J.R.; NAVES, R.V.; VELOSO, V.R.S.; CHAVES, L.J.; NASCIMENTO, J.L. AGUIAR A.V. Fruit production and environment characterization of the occurrence of native plants of araticum the cerrado of Goiás state. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 461-473, 2009.
- BRITTO, A.C.S.; OLIVEIRA, A.C.A.; HENRIQUES, R.M.; CARDOSO, G.M.B.; BOMFIM, D.S.; CARVALHO, A.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; PINHEIRO, M.L.B.; COSTA, E.V.; BEZERRA, D.P. *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Médica**. v. 78, p. 409-414, 2012.
- CASTEDO, L.; GRANJA, J.A.; LERA, A.R.; VILLAVERDE, M.C. Alkaloids from *Guatteria goudotiana*. **Phytochemistry**. v. 30, p. 2781-2783, 1991.
- CAVÉ, A.; LÉBOUEF, M.; CASSELS, B.K. Alkaloids from *Guatteria*. **The Alkaloids**, v. 35, p. 1-76, 1989.
- CHATROU, L.W.; PIRIE, M.D.; ERKENS, R.H.J.; COUVREUR, T.L.P.; NEUBIG, K.M.; ABBOTT, J.R.; MOLS, J.B.; MAAS, J.W.; SAUNDERS, R.M.K.S.; CHASE, M.W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 169, p. 5-40, 2012.

CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae (Soursop Family). In **Flowering Plants of the Geotropism**; Smith, N., et al., Ed. New York Botanical Garden: New York, 2004, p. 18-20.

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 Research International**, v. 44, p. 2385-2390, 2011.

COSTA, E.V.; CRUZ, P.E.O.; PINHEIRO, M.L.B.; MARQUES, F.A.; RUIZ, A.L.T.G.; MARCHETTI, G.M.; CARVALHO, J.E.; BARISON, A.; MAIA, B.H.L.N.S. Aporphine and tetrahydroprotoberberine alkaloids from the leaves of *Guatteria friesiana* (Annonaceae) and their cytotoxic activities. **Journal Brazilian Chemical Society**. v. 24, n. 5, p. 788-796, 2013.

COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; MARQUES, F.A.; BRAGA, R.M.; SALES MAIA, B.H.L.N. First report of alkaloids in the genus *Guatteropsis* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 43-45, 2009.

COSTA, E.V.; TEIXEIRA, S.D.; MARQUES, F.A.; DUARTE, M.C.T.; DELARMELINA, C.; PINHEIRO, M.L.B.; TRIGO, J.R.; SALES MAIA, B.H.L.N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteropsis* species. **Phytochemistry**. v. 69, p. 1895-1899, 2008.

CRAIG, L.A.; HONG, N.S.; MCDONALD, R.J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 1397-1409, 2011.

DASTMALCHI, K.; DAMIEN, D.H.J.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R. Plants as potential sources for drug development against Alzheimer's disease. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 83-104, 2007.

DIRZO, R.; RAVEN, P. H. Global state of biodiversity and loss. **Annual Review of Environment and Resources**. v.28, p. 137-167, 2003.

DONG, J-W.; CAI, L.; FANG, Y-S.; XIAO, H.; LI, Z-J.; DING, Z-T. Proaporphine and aporphine alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Stephania epigaea*. **Fitoterapia**, v. 104, p. 102-107, 2015.

ERKENS, R. H. J.; MAAS, P. J. M. The *Guatteria* group disentangled: sinking *Guatteropsis*, *Guatteriella*, and *Heteropetalum* into *Guatteria*. **Rodriguésia**, v. 59, p. 401-406, 2008.

ERKENS, R.H.J. **From morphological nightmare to molecular conundrum: phylogenetic, evolutionary and taxonomic studies on *Guatteria* (Annonaceae)**. 2007. 276f. Netherlands. Enschede.

ERKENS, R.H.J.; CHATROU, L.W.; KOEK-NOORMAN, J.; MAAS, J.W.; MAAS, P.J.M. Classification of the large widespread genus of Neotropical trees, *Guatteria* (Annonaceae) and its three satellite genera *Guatteriella*, *Guatteropsis* and *Heteropetalum*. **Taxon**, v. 56, p. 757-774, 2007.

FEITOSA, C. M. Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste do Brasil: Monitorado por ensaios de atividade anticolinesterásica de *Kalanchoe brasiliensis* Camb.;

*Senna siamea* (Lam.) Irwin & Barneby (Sin. *Cássia Siamea* Lamarck) e *Anacardium occidentale* L. (**Tese de Doutorado**), Universidade Federal do Ceará, 2005.

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**, v. 71, p.783-789, 2011.

FERRI, C. P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C.; BRODATY, H.; FRATIGLIONI, L.; GANGULI, M. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **Lancet**. v. 366, n. 9503, p. 2112-2117, 2005.

FILHO, J.M.B.; MEDEIROS, K.C.P.; DINIZ, M.F.M.; BATISTA, L.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; DA-CUNHA, E.V.L.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Produtos naturais inibidores da enzima acetilcolinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 258-285, 2006.

FOURNET, A.; ANGELO, B.A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American *Leishmaniasp*. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 281-284, 1993.

FRIES, R. E. Revision der arten einiger Anonaceen-Gattungen V. **Acta Horti Bergiani**, v. 12, p. 289-540, 1939.

GROSSBERG, GT. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. **Current Therapeutic Research**. v. 64, n. 4, p. 216-35, 2003.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2010. cap. 1, p. 13-16.

HALL-DORSODOTTIR, E.S.; JAROSZEWSKI, J.W.; OLAFSDOTTIR, E.S. Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the Icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. *alpestre*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 149-157, 2010.

HEINRICH, M.; LEE, T.H. Galanthamine from snowdrop--the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 147-162, 2004.

HERNANDEZ, F.; AVILA, J. Tauopathies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 2219-2233, 2007.

HEUSDEN, E.C.H. Flowers of Annonaceae: Morphology, classification, and evolution. **Blumea**, v. 7, p. 1-218, 1992.

HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY, S.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H.; CAVÉ, A. Anaxagoreine, a new aporphine alkaloid, isolated from two species of the genus *Anaxagorea*. **Planta Médica**, v. 41, p. 48-50, 1981.

HOUGHTON, P.J.; REN, Y.; HOWES, M.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 181-199, 2006.

HUTCGINSON, J. **The Genera of Flowering Plants**. University Press: Oxford, 1964.  
 CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. In **Annonaceae (Soursop Family)**; Smith, N. et al. (Eds). Flowering Plants of Neotropics; New York Botanical Garden, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Manuais técnicos em geociências**: manual técnico da vegetação brasileira. 2 ed. Rio de Janeiro, 2012.

KANG, J.; LEMAIRE, H.G.; UNTERBECK, A.; SALBAUM, J.M.; MASTERS, C.L.; GRZESCHIK, K.H. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. **Nature**, v. 325, p. 733-736, 1987.

KARRAN, E.; MERCKEN, M.; STOOPER, B.D. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 698-712, 2011.

KESSLER, P.J.A. Annonaceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J.G.; BITTRICH, V. (Ed.). **The families and genera of vascular plants. II. Flowering plants. Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families**. Berlin: Springer Verlag, p. 93-129, 1993.

LEBOEUF, M; CAVÉ, A; BHAUMIK, P.K; MUKHERJEE, B; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LEE, S.Y.; HA, T.Y.; SON, D.J.; KIM, S.R.; HONG J.T. Effect of sesaminol glucosides on  $\beta$ -amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms. **Neuroscience Research**, v.52, p. 330-341, 2005.

LEITE, C.D.S.M.; MENEZES, T.L.M.; LYRA, E.V.V.; ARAÚJO, C.M.T. Conhecimento e intervenção do cuidador na doença de Alzheimer: uma revisão da literatura. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 63, p. 48-56, 2014.

LEVRIER, C.; BALASTRIER, M.; BEATTIE, K.D.; CARROLL, A.R.; MARTIN, F.; CHOOMUENWAI, V.; DAVIS, R.A. Pyridocoumarin, aristolactam and aporphine alkaloids from the Australian rainforest plant *Goniothalamus australis*. **Phytochemistry**, v. 86, p. 121-126, 2013.

LI, Y-P.; NING, F-X.; YANG, M-B.; LI, Y-C.; NIE, M-H.; OU, T-M.; TAN, J-H.; HUANG, S-L.; LI, D.; GU, L-Q.; HUANG, Z-S. Syntheses and characterization of novel oxoisoaporphine derivatives as dual inhibitors for cholinesterases and amyloid beta aggregation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 1572-1581, 2011.

LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C.K.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 30-38, 1993.

LOBÃO, A.Q. **Filogenia de *Guatteria* (Annonaceae) e revisão taxonômica das espécies da Floresta Atlântica**. 2009.156f. Tese (Doutorado) - Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

LOBÃO, A.Q.; MELLO-SILVA, R. *Guatteria* (Annonaceae) do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, p. 859-884, 2007.

LOPES, J.C.; MELLO-SILVA, R. Annonaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 157-164, 2012.

LOPES, J.C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonacea do Brasil. In: V CONGRESSO INTERNACIONAL E ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ANNONACEAE: DO GENE À EXPORTAÇÃO, 36, 2013. **Edição especial**, Botucatu, 2013, p. 125-131.

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

LÚCIO, A.S.S.C.; ALMEIDA, J.R.G.S.; DA-CUNHA, E.V.L.; TAVARES, J.F.; BARBOSA FILHO, J.M. Alkaloids of the Annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. **The Alkaloids**, v. 74, p. 1-177, 2014.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. *Annonaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110399>>. Acesso em: 03 Mar. 2015. Última edição por Lobão, A. em 13/09/2014 - 12:57:51.

MAAS, P.J.M. Neotropical Annonaceae. In: MILLIKEN, W.; KLITGARD, B.; BACARAT, A. **Neotropikey**: interactive key and information resources for flowering plants of the neotropics. 2009. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Annonaceae.htm>>. Acesso em : 11 mar. 2014.

MAAS, P.J.M.; RAINER, H.; LOBÃO, A.Q. Annonaceae **In Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110572>>. Acesso em: 26 jul. 2015.

MELLO-SILVA, R.; PIRANI, J.R. *Guatteria notabilis* Mello-Silva & Pirani, nova espécie de Annonaceae da Cadeia do Espinhaço, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 10, p. 43-50, 1988.

MELLO-SILVA, R.; PIRANI, J.R. *Guatteria rupestris* (Annonaceae), a new species from Minas Gerais, Brazil. **Novon**, Washington, v. 4, n. 2, p. 146-150, 1994.

MOONGKARNDI, P.; SRISAWAT, C.; SAETUN, P.; JANTARAVINID, J. PEERAPITTAYAMONGKOL, C.; SOIAMPORNKUL, R. Protective effect of mangosteen extract against  $\beta$ -amyloid-induced cytotoxicity, oxidative stress and altered proteome in SK-N-SH cells. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2076-2086, 2010.

MORAWETZ, W.; WAHA, M. A new pollen type, C-banded and fluorochrome counterstained chromosomes, and evolution in *Guatteria* and related genera (*Annonaceae*). **Plant Systematics and Evolution**, v. 150, p. 119-141, 1985.

MUNSHI, C.P.; VAIDYA, P.M.; BURANPURI, J.J.; GULATI, O.D. Kala-azar in Gujarat. **Journal of the Indian Medical Association**, v. 59, p. 287-293, 1972.

MURILO, J.; RESTREPO, D. **Las anonáceas de la región de Araracuara**: estudios en La Amazonía Colombiana XX. Soporte Editorial: Bogotá, 2000.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA (UNESCO). **Culture and Health: Orientation Texts: World Decade for Cultural Development 1988-1997**, Document CLT/DEC/PRO. Paris, 1996. 129 p.

PAGLIOSA, L.B.; MONTEIRO, S.C.; SILVA, K.B.; ANDRADE, J.P.; DUTILH, J.; BASTIDA, J.; CAMMAROTA, M.; ZUANAZZI, J.A.S. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. **Phytomedicine**, v. 17, p. 698-701, 2010.

PIMENTA, A.C.; REGO, S.S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; NOGUEIRA, A.C.; KOELHER, H.S. Morphological characterization of fruits, seeds and seedlings of araticum plant (*Annona crassiflora* Mart - Annonaceae). **Journal of Seed Science**, v. 35, p. 524-531, 2013.

ROJAS DE ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; ASCURRAT, M.; FLEITAS, N.; RODRIGUEZ, E.; FOURNET, A. *In vitro* activity and mutagenicity of bisbenzylisoquinolines and quinones against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 141-144, 1994.

SÁNCHEZ, M. **Catálogo preliminar comentado de la flora Del Medio Coquetá: estudios en la Amazônia Colombiana XII**. Impreandes Presencia: Bogotá, 1997.

SARTER, M.; PAOLONE, G. Deficits in attentional control: cholinergic mechanisms and circuitry-based treatment approaches. **Behavioral Neuroscience**, v. 125, p. 825-835, 2011.

SAUQUET, H.; DOYLE, J.A.; SCHARASCHKIN, T.; BORSCH, T.; HILU, K.; CHATROU, L.W.; LE THOMAS, A. Phylogenetic analysis of Magnoliales and Myristicaceae based on multiple data sets: implications for character evolution. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 142, p. 125-186, 2003.

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.

SHAO, D.; ZOU, C.; LUO, C.; TANG, X.; LI, Y. Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, n. 18, p. 4639-4642, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed, Porto Alegre, editor da UFRGS, 2010.

SILVA, E.A.A.; MELO, D.L.B.; DAVIDE, A.C.; BODE, N.; ABREU, G.B.; FARIA, J.M.R.; HILHORST, H.W.M. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, v. 99, p. 823-830, 2007.

SPIRES-JONES, T.L.; HYMAN, B.T. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 82, p. 756-771, 2014.

TAKHTAJAN, A. **Flowering plants, origin and dispersal**. Oliver & Boyd: Edinburgh, 1969.

VALENTIN, A.; BENOIT-VICAL, F.; MOULIS, C.; STANISLAS, E.; MALLIÉ, M.; FOURASTE, I.; BASTIDE, J.-M. *In vitro* antimalarial activity of penduline, a bisbenzylisoquinoline from *Isopyrum thalictroides*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2305-2307, 1997.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

ZHANG, Z.; WANG, X.; CHEN, Q.; SHU, L.; WANG, J.; SHAN, G. Clinical efficacy and safety of huperzine Alpha in treatment of mild to moderate Alzheimer disease, a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**. v. 82, n. 14, p. 941-944, 2002.

**CAPÍTULO II: Análise das atividades antioxidante e anticolinesterásica *in vitro* da guatterioipsiscina, alcaloide isolado das folhas de *Guatteria friesiana***



**Análise das atividades antioxidante e anticolinesterásica *in vitro* da guatterioipsiscina, alcaloide isolado das folhas de *Guatteria friesiana***

**SILVA, V.L.<sup>1</sup>; FEITOSA, C.M.<sup>1</sup>; COSTA, E.V.<sup>2</sup>**

1. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550: Teresina, Brasil.

2. Programa de pós-graduação em Química – Universidade Federal do Amazonas, CEP 69.077-000: Manaus, Brasil.

**RESUMO:** Este estudo objetivou verificar a atividade antioxidante e anticolinesterásica *in vitro* do alcaloide guatterioipsiscina, composto isolado das folhas da espécie *Guatteria friesiana*. Para tal estudo, foi realizado ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase seguindo a metodologia de Elmman et al. (1961) e os seguintes testes antioxidantes: DPPH, nitrito, potencial redutor e ABTS. O alcaloide guatterioipsiscina apresentou significativa atividade anticolinesterásica, quando comparada ao medicamento padrão utilizado no tratamento da doença de Alzheimer, a rivastigmina. A guatterioipsiscina também apresentou potencial antioxidante no sequestro de óxido nítrico e de radicais ABTS. Portanto, este estudo sugere que este composto apresenta-se como potente candidato para pesquisas de substâncias anticolinesterásicas para o tratamento do mal de Alzheimer.

**Palavras-chave:** *Guatteria*, Alzheimer, Acetilcolinesterase, Estresse Oxidativo.

**ABSTRACT:** Analysis of the *in vitro* acetylcholinesterase and antioxidant activities of guatterioipsiscine, an alkaloid isolated of leaves *Guatteria friesiana*. This study aimed to verify the antioxidant activity and acetylcholinesterase *in vitro* guatterioipsiscine alkaloid, compound isolated from the leaves of the species *Guatteria friesiana*. For this study was conducted inhibition of acetylcholinesterase assay following the methodology Elmman et al. (1961) and the following antioxidants tests: DPPH, nitrite, reducing potential and ABTS. The alkaloid guatterioipsiscine showed significant anticholinesterase activity, when compared to the standard drug used for the treatment of Alzheimer's disease, rivastigmine. The guatterioipsiscina also presented antioxidant potential in the kidnapping of nitric oxide and ABTS radical. So the guatterioipsiscine showed itself as powerful candidate in studies of anticholinesterase substances for the treatment of Alzheimer's disease.

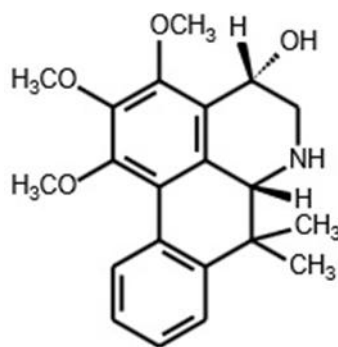
**Keywords:** *Guatteria*, Alzheimer, Acetylcholinesterase, Oxidative Stress.

## 1. Introdução

A doença de Alzheimer (DA) afeta mais de 44 milhões de pessoas no mundo atualmente e as estimativas apontam que serão cerca de 75 milhões de casos em 2030 e 135,5 milhões em 2050, de acordo com a *Alzheimer's Disease International Organization* (ADI, 2013). No Brasil, essa doença acomete mais de 1,2 milhão de pessoas, segundo dados da Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAZ, 2012). É o tipo mais frequente de demência, correspondendo a aproximadamente 70% dos casos e afeta, principalmente, a população geriátrica (SPIRES-JONES E HYMAN, 2014).

A DA é caracterizada pelo acúmulo neuronal de peptídeo  $\beta$ -amiloide em placas extracelulares, depósitos intracelulares de proteína tau, perda neuronal e perda sináptica (BRAAK E BRAAK, 1991; SELKOE, 1991; MASLIAH et al., 2001; SPIRES-JONES E HYMAN, 2014; VILLEGAS, 2015). Estudos anatômicos em pessoas com DA mostraram uma perda maciça de massa branca do cérebro e uma redução específica de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal (COYLE et al., 1983; AULD et al., 2002; KIM et al., 2013). Entretanto, os processos fisiopatológicos que desencadeiam essas alterações ainda não estão bem elucidados e não se sabe se tais alterações são causas ou consequências da DA, em virtude disso a terapêutica da doença consiste em tratar os sintomas.

Os medicamentos atualmente aprovados para esse tratamento incluem as substâncias que agem no sistema colinérgico (inibidores da enzima acetilcolinesterase - AChE) e as que promovem neuroproteção (STAHL, 2000; WILKINSON, 2011). Um dos medicamentos considerados mais eficazes na DA é a galantamina (Reminyl<sup>®</sup>), um alcaloide isolado de plantas da família Amaryllidaceae, que atua como um potente inibidor da AChE (GUPTA E GUPTA, 1997; GORDON; LILIENFIELD; GAENS, 2000; BOKDE et al., 2009). A espécie *Guatteria friesiana* (W.A. Rodrigues) Erkens & Maas, é uma planta da família Annonaceae, nativa do Brasil, encontrada na bacia Amazônica brasileira e colombiana (COSTA et al., 2013). A partir das folhas e do caule dessa planta podem ser extraídos diversos alcaloides, dentre eles a guatterioipsiscina (Figura 1 p. 70) (COSTA, 2009; COSTA et al., 2009; COSTA et al., 2013).



**Figura 1-** Estrutura química do alcaloide guatterioscina

Nesse contexto, este estudo objetivou verificar as atividades anticolinesterásica e antioxidante do alcaloide guatterioscina.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Material vegetal

As folhas de *G. friesiana* foram coletadas em Janeiro de 2005, na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), localizada no Km 38 da BR-174, na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. A identificação do material botânico foi feita pelo taxonomista Dr. Antônio Carlos Weber, do Departamento de Biologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFAM, e a exsiccata foi depositada no herbário da UFAM sob o número de registro 7341.

### 2.2 Químicos

Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico; iodeto de acetiltiocolina; ácido 6-hidróxi-2,5,8,7-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), placas de gel de sílica e enzima acetilcolinesterase foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 2.3 Extração e Isolamento do alcaloide guatterioscina

As folhas de *G. friesiana* (1300 g) foram secas à temperatura ambiente, moídas e pesadas e submetidas à extração a frio com hexano e metanol. A análise em cromatografia em camada delgada analítica, através da utilização do reagente de Dragendorff, mostrou alta

concentração de alcaloides no extrato metanólico. Foram obtidos 21 alcaloides, entre os quais o alcaloide guatterioscicina (122,9 mg). Este alcaloide foi identificado através das técnicas de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D, espectroscopia nas regiões do infravermelho e do ultravioleta, espectrometria de massas, bem como comparação com os dados da literatura (COSTA, 2009).

O isolamento e a identificação da guatterioscicina utilizada neste estudo foram descritos por Costa et al. (2013).

## 2.4 Ensaio *in vitro* para atividade AChE

### 2.4.1 Inibição qualitativa da AChE

O ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AChE foi realizado com o alcaloide dissolvido em metanol em uma concentração de 1 mg/mL, então 1,5-2,5  $\mu\text{L}$  da amostra foi aplicada em placa de gel de sílica e eluída em clorofórmio: metanol (9:1). Após o desenvolvimento da placa, a atividade inibitória da guatterioscicina eluída foi detectada utilizando revelador baseado no método de Ellman et al. (1961). A placa foi pulverizada com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico)/ATCI (Iodeto de acetiltiocolina) (1 mmol/L DTNB e 1 mmol/L ATCI em tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8) até a saturação com o reagente, evitando escorrer. As placas foram secas em temperatura ambiente durante 3-5 minutos e posteriormente pulverizadas com 5 U/mL da enzima acetilcolinesterase (AChE). A cafeína, um alcaloide isolado da espécie *Paulinia cupana* Kunth e que possui conhecida atividade anticolinesterásica, foi utilizada como padrão positivo. O teste positivo foi observado através da formação, na placa, de manchas brancas em um campo amarelo.

### 2.4.2 Inibição quantitativa da AChE

O efeito inibitório da guatterioscicina sobre atividade da AChE foi avaliado por uma adaptação do método espectrofotométrico de Ellman et al. (1961). Em um tubo de ensaio, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da amostra (concentração de 0,1% em solução de tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8, e 10% de metanol), misturou-se com 100  $\mu\text{L}$  de AChE 0,22 U/mL (22 U de enzima diluída em 100 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8, 0,1% BSA) e 200  $\mu\text{L}$  de tampão (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8, 0,1% BSA). Incubou-se a mistura por 5 min a 30°C. Posteriormente, adicionou-se, 500  $\mu\text{L}$  de DTNB (na concentração de 3 mmol/L em tampão Tris-HCl, pH 8, e NaCl 0,1 mol/L,  $\text{MgCl}_2$  0,02 mol/L) e 100  $\mu\text{L}$  de ATCI (4 mmol/L em água). Preparou-se o branco por substituição de AChE por 100  $\mu\text{L}$  de tampão (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8, 0,1% BSA). A reação foi monitorada em espectrofotômetro por 5 min em 412

nm e a absorbância inicial ( $V_0$ ) gravada. A atividade anticolinesterásica (I%) foi calculada através da seguinte equação:

$$I (\%) = [1 - (V_{o \text{ amostra}} / V_{o \text{ branco}})] \times 100$$

Onde,  $V_{o \text{ amostra}}$  e  $V_{o \text{ branco}}$  representam as absorbâncias iniciais da amostra e do branco. Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos por intermédio de plotagem Log-Probit.

## 2.5 Ensaios *in vitro* para atividade antioxidante

### 2.5.1 Atividade de eliminação do radical DPPH

Para avaliação da capacidade antioxidante contra o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi utilizada a metodologia descrita por Oliveira et al. (2014). Resumidamente, foram preparadas misturas reacionais do alcaloide guatterio-psiscina em cinco concentrações diferentes em triplicata (100; 50; 25; 12,5 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) e o radical DPPH (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Foram agitadas vigorosamente e incubadas à temperatura ambiente na ausência de luz, durante 30 minutos. Os valores das absorbâncias foram lidos em espectrofotômetro a  $\lambda = 517$  nm. Esses valores foram expressos como porcentagem de inibição do radical DPPH pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100] / A_{\text{controle}}$$

Onde,  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância da solução etanólica de DPPH e  $A_{\text{mistura reacional}}$  é a absorbância da mistura reacional contendo radical DPPH e as concentrações do alcaloide. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para o controle positivo Trolox nas mesmas concentrações.

### 2.5.2 Atividade de produção de íons nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )

O óxido nítrico (NO) foi gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 10 mmol/L (pH 7,4). Uma vez gerado NO, ele interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidos pela reação de Griess (FERREIRA et al., 2008). As misturas reacionais contendo nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 10 mmol/L, pH 7,4 e o composto avaliado nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , em triplicata, foram incubadas a 37 °C durante 1h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess (2,3% de sulfanilamida; 0,12% de dicloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,5 mol/L). A absorbância do cromóforo foi medida a  $\lambda = 540$  nm. A porcentagem de inibição do óxido nítrico gerado foi medida por meio da comparação dos valores de absorbância dos controles negativos [10

mmol/L de nitroprussiato de sódio e veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%)] e das preparações para ensaio, através da seguinte equação:

$$\% \text{ de produção de nitrito} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100] / A_{\text{controle}}$$

Onde,  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância do controle negativo e  $A_{\text{mistura reacional}}$  é a absorbância da mistura reacional contendo NPS, reagente de Griess e as concentrações do alcaloide. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para o controle positivo Trolox nas mesmas concentrações.

### 2.5.3 Potencial redutor

Para avaliação do potencial redutor foi utilizada a metodologia descrita por Singhal et al. (2011), com modificações. Resumidamente, foram preparadas misturas reacionais contendo cinco concentrações, em triplicata, de guatterriopsiscina (100; 50; 25; 12,5 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ), 0,5mL de ferricianeto de potássio 1% e 0,5 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 6,6). As misturas reacionais foram incubadas a 50 °C durante 20 minutos, seguidas pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 15%, 0,5 mL de água destilada e 0,250 mL de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 0,1%. As absorbâncias das misturas reacionais foram mensuradas a 700 nm. Foi preparado um branco que continha apenas tampão fosfato. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para o controle positivo Trolox nas mesmas concentrações.

### 2.5.4 Atividade de eliminação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$

Para avaliação da capacidade antioxidante contra o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico]) foi utilizada a metodologia descrita por Oliveira et al. (2014), com algumas modificações. Inicialmente foi formado o cátion radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mmol/L de ABTS com 88  $\mu\text{L}$  de uma solução 2,45 mmol/L de persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  foi diluída em etanol até obter uma solução com absorbância de 1,00 ( $\pm 0,05$ ), a  $\lambda = 732$  nm. Em ambiente escuro à temperatura ambiente, foram feitas misturas reacionais contendo guatterriopsiscina (100; 50; 25; 12,5 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) e 2,2  $\mu\text{L}$  do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . O experimento foi realizado em triplicata e as leituras das absorbâncias foram realizadas após 6 minutos em um espectrofotômetro a  $\lambda = 732$  nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  pela seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100] / A_{\text{controle}}$$

Onde,  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância inicial da solução etanólica de ABTS<sup>•+</sup> e  $A_{\text{mistura reacional}}$  é a absorbância da mistura contendo o radical ABTS<sup>•+</sup> e as concentrações do alcaloide. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para o controle positivo Trolox nas mesmas concentrações.

## 2.6 Análises estatísticas

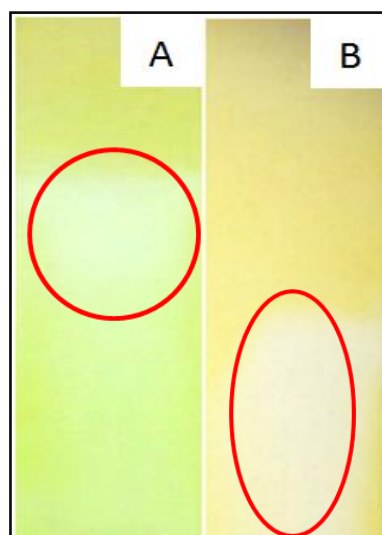
O valor da  $CI_{50}$  para a atividade inibitória AChE foi obtido por intermédio de plotagem Log-Probit, utilizando o programa SPSS Statistics. Os resultados para os ensaios antioxidantes foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (D.P). A análise estatística foi realizada utilizando *one way* ANOVA, seguida pelo teste *Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* 5.01 (San Diego, CA, USA).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Inibição da enzima AChE

O uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase é amplamente aceito como a farmacoterapia de primeira linha para o alívio sintomático da doença de Alzheimer, por promover um aumento nos níveis de acetilcolina nas sinapses cerebrais, melhorando os deficits cognitivos e de memória dos doentes (GIACOBINI, 2003; LOIZZO et al., 2008).

O alcaloide guatterriopsiscina apresentou resultado positivo de inibição qualitativa frente à AChE comprovado através da formação de uma mancha branca em um campo amarelo na placa de cromatografia em camada delgada. A Figura 2 (p. 75) mostra o resultado do teste qualitativo da guatterriopsiscina para atividade anticolinesterásica, segundo o método de Ellman.



**Figura 2** - Placa de inibição qualitativa da guatterioscina frente à AChE. A = guatterioscina; B = cafeína (controle positivo).

O teste quantitativo permitiu calcular a quantidade mínima de guatterioscina capaz de inibir a atividade da enzima AChE em 50%. A  $CI_{50}$  encontrada foi de  $0,3 \mu\text{g/mL}$ , um valor menor do que aquele da  $CI_{50}$  da rivastigmina ( $1,87 \mu\text{g/mL}$ ), um medicamento inibidor da AChE muito utilizado no tratamento de pessoas com Alzheimer. A galantamina ( $CI_{50} 0,37 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ ), outro inibidor da AChE, é um alcaloide obtido de plantas da família Amaryllidaceae, comercializado como medicamento e possui um duplo mecanismo de ação, o qual, além de inibir a enzima acetilcolinesterase, também é capaz de modular os receptores nicotínicos (BOKDE et al., 2009; GORDON, 2000; GUPTA et al., 1997). Porém, o papel desses receptores no tratamento da doença de Alzheimer ainda não está completamente elucidado. Sabe-se que os receptores nicotínicos pré-sinápticos controlam a liberação de neurotransmissores, os quais são importantes para a memória e para o humor. Nesse sentido Levin e Rezvani (2000) e Maelicke e Albuquerque (2000) verificaram que o bloqueio dos receptores nicotínicos prejudicou a cognição, mas a ligação da galantamina com os subtipos de receptores nicotínicos melhorou a função cognitiva e a memória.

A huperzina A, um alcaloide extraído da planta *Huperzia serrata*, também atua como inibidor da acetilcolinesterase ( $CI_{50} 74,5 \text{ nmol/L}$ ), cuja administração demonstrou melhora significativa na memória de pessoas idosas e de pessoas com DA, associada a mínimos efeitos colinérgicos periféricos (ZHANG et al., 2002). Lai et al. (2013) estudaram o extrato alcaloidal e os alcaloides isolados das raízes da espécie vegetal *Stemona sessilifolia*. Sendo assim, dos cinco alcaloides testados, dois deles, estenina e estenina B, e o extrato alcaloidal apresentaram atividade anticolinesterásica significativa ( $CI_{50} 19,8 \mu\text{mol/L}$ ;  $2,1 \mu\text{mol/L}$  e  $102,6 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Assim, percebeu-se que alguns inibidores potentes da AChE são produtos



naturais derivados de plantas. A Tabela 1 mostra a atividade inibitória AChE de alguns compostos.

**Tabela 1-** Atividade inibitória AChE sobre alguns compostos.

Substância	*CI <sub>50</sub> (µg/mL)
Guatterriopsiscina	0,30
Rivastigmina	1,87
Galantamina	0,37x10 <sup>-3</sup>

\* CI<sub>50</sub>=concentração capaz de inibir cinquenta por cento da atividade da enzima acetilcolinestraxe.

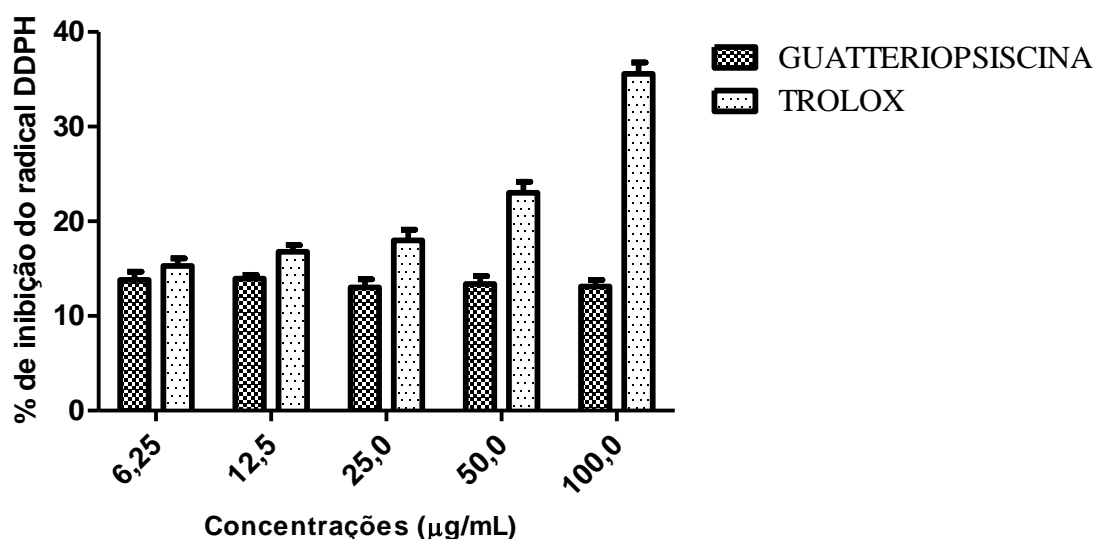
### 3.2 Atividades antioxidantes

Evidências mostram que o estresse oxidativo acelera os processos patológicos da DA, tais como diminuição da memória e deposição de placas amiloides, sugerindo que substâncias antioxidantes possam ser reconhecidas como uma alternativa de tratamento para essa doença (LLÉO et al., 2006; KANAMARU et al., 2015).

No método que envolve o sequestro do radical livre estável DPPH<sup>•</sup>, a capacidade antioxidante é analisada pela diminuição da absorvância da solução de DPPH<sup>•</sup> a  $\lambda = 517$  nm, na qual o radical DPPH<sup>•</sup> de cor púrpura é reduzido para formar DPPH<sub>2</sub> de cor amarela (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012).

Os valores da capacidade antioxidante de guatterriopsiscina contra o radical DPPH nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL foram de 13,10 ± 1,24; 13,38 ± 1,44; 13,01 ± 1,51; 13,94 ± 0,69 e 13,82 ± 1,49%, respectivamente, os quais reduziram a concentração de radicais DPPH na solução. Nas mesmas condições experimentais e nas mesmas concentrações, o trolox também reduziu o radical DPPH apresentando valores de 35,58 ± 2,09; 23,01 ± 2,05; 17,99 ± 1,92; 16,77 ± 1,22 e 15,28 ± 1,39%, respectivamente, de capacidade antioxidante. Esses resultados mostraram que a atividade antioxidante do controle positivo trolox foi superior a da guatterriopsiscina, nas concentrações de 100; 50 e 25 µg/mL, uma vez que as diferenças foram estatisticamente significativas (p<0,05) e as médias do trolox foram superiores a aquelas da guatterriopsiscina, nessas concentrações. Em 12,5 e 6,25 µg/mL, não houve diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre a porcentagem de inibição promovida pelo alcaloide e pelo trolox, portanto, em baixas concentrações, o

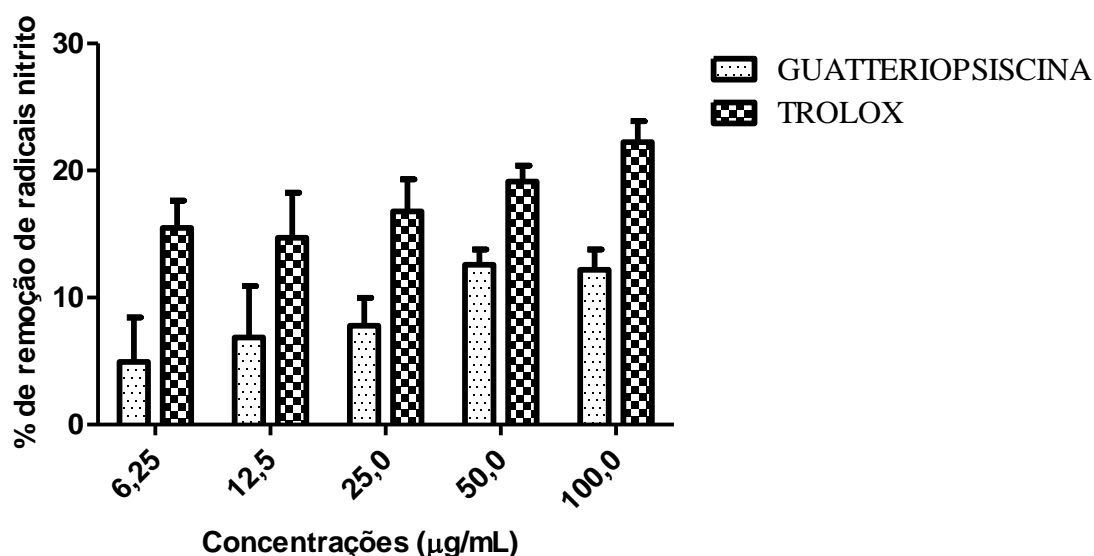
alcaloide foi capaz de remover o conteúdo de nitrito formado de maneira semelhante ao controle positivo (Figura 3).



**Figura 3** - Capacidade antioxidante do alcaloide guatterioipsiscina na inibição da produção de radicais DPPH•.

Capacidade antioxidante do alcaloide guatterioipsiscina e do controle positivo trolox, em diferentes concentrações (6,25 – 100 µg/mL), na inibição da produção de radicais DPPH•. Os valores representam a média ± D.P, n=3 para cada concentração, (ANOVA seguida de *Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste; p<0,05).

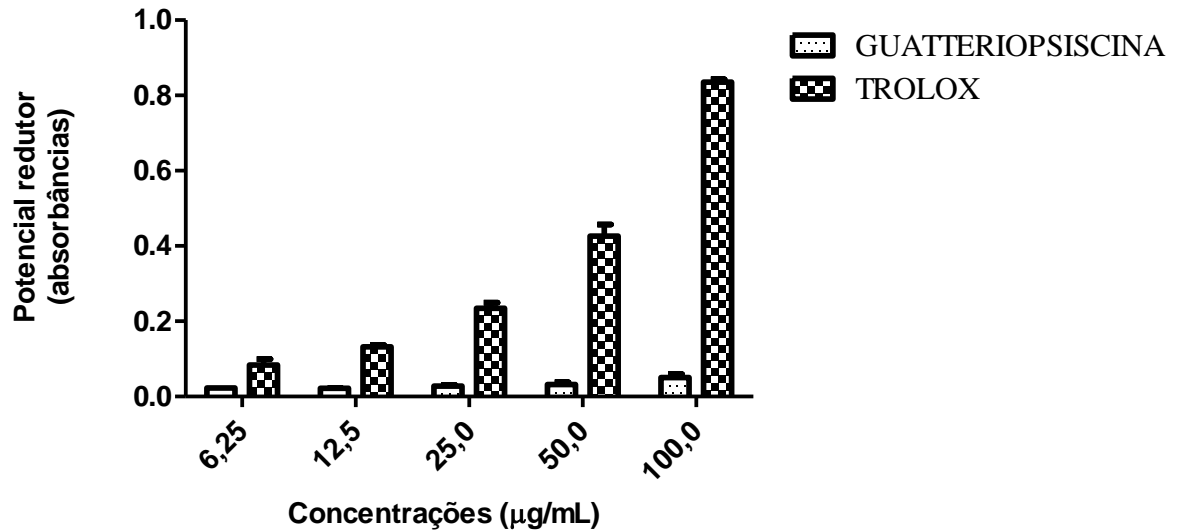
A avaliação da guatterioipsiscina como substância sequestradora de NO foi testada por sua capacidade de remoção do íon nitrito pelo método de Griess. Os valores da capacidade antioxidante de guatterioipsiscina contra a produção do íon nitrito nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL foram de  $12,19 \pm 2,78$ ;  $12,58 \pm 2,08$ ;  $7,78 \pm 3,79$ ;  $6,87 \pm 6,99$  e  $4,92 \pm 6,08\%$ , respectivamente. Nas mesmas condições experimentais e nas mesmas concentrações, o trolox apresentou valores de  $22,24 \pm 2,85$ ;  $19,13 \pm 2,19$ ;  $16,79 \pm 4,37$ ;  $14,72 \pm 6,14$  e  $15,50 \pm 3,70\%$ , respectivamente, de capacidade antioxidante. Não houve diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre a porcentagem de inibição promovida pelo alcaloide e pelo trolox na mesma concentração, portanto os resultados apresentados demonstram que o alcaloide foi capaz de remover o conteúdo de nitrito formado de maneira semelhante ao controle positivo (Figura 4, p.78).



**Figura 4** - Capacidade antioxidante do alcaloide guatterioipsiscina contra a produção do íon nitrito.

Capacidade antioxidante do alcaloide guatterioipsiscina e do controle positivo trolox, em diferentes concentrações (6,25 – 100 µg/mL), contra a produção do íon nitrito. Os valores representam a média ± D.P, n=3 para cada concentração, (ANOVA seguida de *Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste;  $p < 0,05$ ).

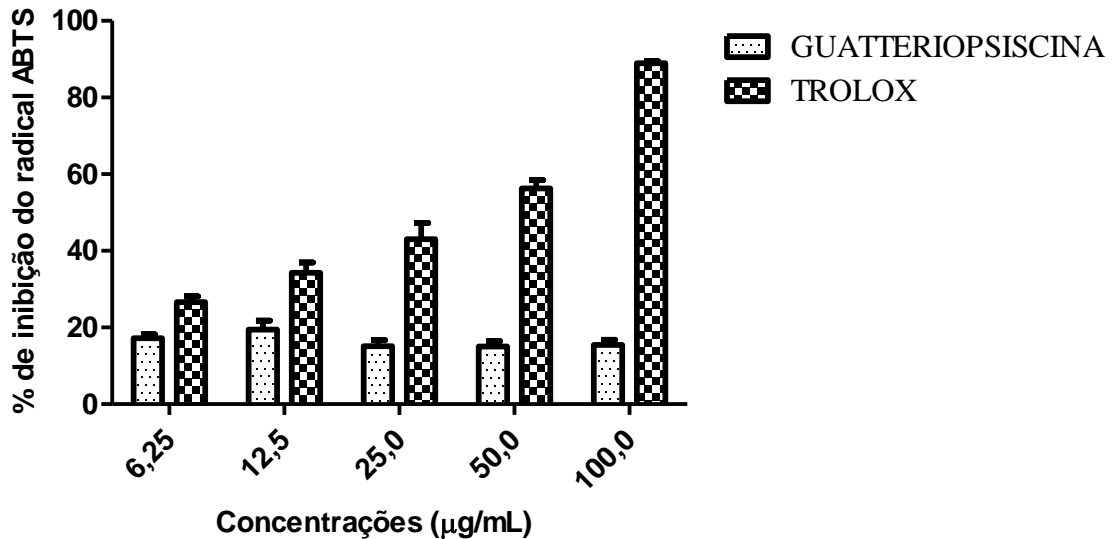
O poder redutor da guatterioipsiscina foi avaliado pela transformação do ferricianeto de potássio ( $C_6N_6FeK_3$ ) de cor amarela a ferrocianeto de potássio ( $C_6N_6FeK_4$ ) de cor verde. A capacidade antioxidante do alcaloide e do controle positivo através da avaliação do potencial redutor em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL) está representada na Figura 5, p.79. As diferenças apresentadas pela guatterioipsiscina e pelo trolox em cada concentração são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) e mostraram, portanto, que o alcaloide não possui poder redutor ( $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ ) nas concentrações testadas.



**Figura 5** - Potencial redutor ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ) do alcaloide guatterioipsiscina

Potencial redutor ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ) do alcaloide guatterioipsiscina e do controle positivo trolox, em diferentes concentrações (6,25 – 100 µg/mL). Os valores representam a média  $\pm$  D.P das absorbâncias em 700 nm,  $n=3$  para cada concentração, (ANOVA seguida de *Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste;  $p<0,05$ ).

Os resultados antioxidantes correspondentes à inibição do radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  pela guatterioipsiscina e pelo trolox em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL) estão representados na Figura 6. Os valores da capacidade antioxidante da guatterioipsiscina nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL foram de  $15,49 \pm 2,20$ ;  $15,06 \pm 2,45$ ;  $15,09 \pm 2,80$ ;  $19,43 \pm 4,05$  e  $17,23 \pm 1,73\%$ , respectivamente. Nas mesmas condições experimentais e concentrações, os valores da capacidade antioxidante do trolox foram de  $88,96 \pm 0,83$ ;  $56,29 \pm 3,72$ ;  $43,05 \pm 7,30$ ;  $34,33 \pm 4,50$  e  $26,60 \pm 2,68$ , respectivamente. As diferenças apresentadas pela guatterioipsiscina e pelo trolox em cada concentração foram estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) e mostraram que a capacidade antioxidante do trolox foi superior a do alcaloide (Figura 6, p. 80).



**Figura 6** - Capacidade antioxidante da guatterriopsiscina na inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>.

Capacidade antioxidante da guatterriopsiscina e do controle positivo trolox, em diferentes concentrações (6,25 – 100 µg/mL), na inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>. Os valores representam a média ± D.P, n=3 para cada concentração, (ANOVA seguida de *Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste; p<0,05).

Estes testes *in vitro* revelaram que a guatterriopsiscina tem baixa atividade antioxidante contra a formação de radicais ABTS<sup>•+</sup> e baixo potencial redutor, mas foi mais potente na diminuição da concentração de nitrito após decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio, indicando que o alcaloide guatterriopsiscina pode ser capaz de sequestrar radicais livres do nitrogênio; já na eliminação do DPPH, a guatterriopsiscina apresentou atividade antioxidante melhor em baixas concentrações (12,5 e 6,25 µg/mL) do que nas concentrações mais elevadas (100; 50 e 25 µg/mL). Portanto, pode-se dizer que a guatterriopsiscina possui capacidade antioxidante, porém menos potente do que a substância padrão, trolox.

Howes e Houghton (2003) revisaram as bases farmacológicas de algumas plantas e de seus constituintes ativos que têm sido usados na medicina tradicional asiática para melhorar distúrbios cognitivos, tais como ocorrem na DA. Estes pesquisadores sugeriram que os extratos e as substâncias isoladas que melhoravam significativamente a memória e o comportamento apresentavam propriedades anticolinesterásicas ou antioxidantes comprovadas, através de estudos científicos *in vitro* ou *in vivo*. Isso mostra o importante papel de substâncias, com essas propriedades, na terapêutica da doença de Alzheimer.

#### **4. Conclusões**

A guatteriopticina apresentou-se como potente inibidor da enzima acetilcolinesterase quando comparada ao medicamento padrão, a rivastigmina. Também mostrou atividade antioxidante quando foi capaz de sequestrar radicais livres do nitrogênio de maneira significativa e de eliminar o radical DPPH. Portanto, este estudo aponta este alcaloide como um candidato em estudos de substâncias anticolinesterásicas para futura aplicação na terapêutica de doenças neurodegenerativas que dependem da modulação da enzima AChE, dentre essas a doença de Alzheimer.

## REFERÊNCIAS

- ABRAZ. Doença de Alzheimer. 2012. <Disponível em: <http://abraz.org.br/abraz-na-midia/release-institucional-doenca-de-alzheimer>>. Acesso em: 20 jul. 2015.
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. World Alzheimer report 2013: Journey of caring. 2013. Disponível em: <<http://www.alz.co.uk/research/world-report-2013>>. Acesso em: 20 jul. 2015.
- AULD, D.S.; KORNECOOK, T.J.; BASTIANETTO, S.; QUIRION, R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to b-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. **Progress in Neurobiology**, v. 68, p. 209-245, 2002.
- BOKDE, A.L.; KARMANN, M.; TEIPEL, S.J.; BORN, C.; LIEB, M.; REISER, M.F.; MÖLDER, H.J.; HAMPEL, H. 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**, v. 29, p. 147-156, 2009.
- BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathology**, v. 82, p. 239-259, 1991.
- COSTA, E.V.; CRUZ, P.E.O.; PINHEIRO, M.L.B.; MARQUES, F.A.; RUIZ, A.L.T.G.; MARCHETTI, G.M.; CARVALHO, J.E.; BARISON, A.; MAIA, B.H.L.N.S. Aporphine and tetrahydroprotoberberine alkaloids from the leaves of *Guatteria friesiana* (Annonaceae) and their cytotoxic activities. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 788-796, 2013.
- COSTA, E.V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatteriaopsis blepharophylla*, *Guatteriaopsis friesiana* e *Guatteriaopsis hispida* (Annonaceae). 2009. 380f. Tese (Doutorado – Área Química). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Paraná.
- COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; MARQUES, F.A.; BRAGA, R.M.; SALES MAIA, B.H.L.N. First report of alkaloids in the genus *Guatteriaopsis* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 43-45, 2009.
- COYLE, J.T.; PRICE, D.L.; DE LONG, M.R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. **Science**, v. 219, p. 1184-1190, 1983.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES-JUNIOR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 431-437, 2008.
- GIACOBINI, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. **Neurochemical Research**, v. 28, p. 512-522, 2003.

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.

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

HOWES, M-J.R.; HOWGHTON, P.J. 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.

KANAMARU, T.; KAMIMURAA, N.; YOKOTA, T.; IUCHI, K.; NISHIMAKI, K.; TAKAMI, S.; AKASHIBA, H.; SHITAKA, Y.; KATSURA, K.; KIMURA, K.; OHTA, S. Oxidative stress accelerates amyloid deposition and memory impairment in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 587, p. 126-131, 2015.

KIM, H.J.; MOON, W.J.; HAN, S.H. Differential cholinergic pathway involvement in Alzheimer's disease and subcortical ischemic vascular dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 35, p. 129-136, 2013.

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

LEVIN, E.D.; REZVANI, A.H. Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 393, p. 141-146, 2000.

LLEÓ, A.; GREENBERG, S.M.; GROWDON, J.H. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. **Annual Review of Medicine**, v. 57, p. 513-533, 2006.

LOIZZO, M.R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; MENICHINI, F. Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1209-1228, 2008.

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

MASLIAH, E.; MALLORY, M.; ALFORD, M; DE TERESA, R.; HANSEN, L.A.; MCKEEL, D.W.J.; MORRIS, J.C.. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 56, p. 127-129, 2001.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1036-1043, 2012.

OLIVEIRA, G.L.S.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; ALENCAR, M.V.O.B.; JUNIOR, A.L.G.; ARAUJO, A. S.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; FREITAS, R.M. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) *in vitro* and *in Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, p. 136-147, 2014.



SELKOE, D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 6, p. 487-498, 1991.

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H.P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 1, p. 644-650, 2011.

SPIRES-JONES, T.L.; HYMAN, B.T. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 82, p. 756-771, 2014.

STAHL, SM. The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, Part 2: illustrating their mechanisms of action. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61, p. 813-814, 2000.

VILLEGAS, S. Enfermedad de Alzheimer: nuevas estrategias terapéuticas. **Medicina Clinica**, v. 145, p. 76-83, 2015.

WILKINSON D. A review of the effects of memantine on clinical progression in Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 27, p. 769-776, 2011.

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

**ANEXOS**

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM  
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceepi@ufpi.edu.br



Teresina, 13 de Março de 2015.

Ilma.

**Profa. Dra. CHISTIANE MENDES FEITOSA.**  
**Departamento: Farmácia/CCS/UFPI.**

Senhora Pesquisadora,

Em reunião na presente data (13 de Março de 2015), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **005/15**, o projeto de pesquisa intitulado "**Atividade farmacológica de um alcaloide isolado de *Gutteria friesiana* na terapia da doença de Alzheimer**", sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Abril/2015 à Julho/2015, e serão usados 90 Camundongos heterogênicos (Machos). Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

  
**Profa. Ivete L. de Mendonça**  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

## ANEXO B – SUBMISSÃO DE ARTIGO

---

### Your recent submission to JEP

---

De: [ees.jep.0.371792.bef04578@eesmail.elsevier.com](mailto:ees.jep.0.371792.bef04578@eesmail.elsevier.com) em nome de **Journal of Ethnopharmacology** ([jethnoph@chem.leidenuniv.nl](mailto:jethnoph@chem.leidenuniv.nl))  
Enviada: quinta-feira, 4 de fevereiro de 2016 23:59:05  
Para: [valeriafisiobr@hotmail.com](mailto:valeriafisiobr@hotmail.com)

Dear Dr. Valéria Lima Silva Silva,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Journal of Ethnopharmacology  
Corresponding Author: Chistiane Feitosa  
Co-Authors: Valéria Lima Silva L Silva, Master; Soane Kaline M Chaves, Marter  
Title: Biological activities of extracts and substances isolated from *Guatteria friesiana* (W. A. Rodrigues) Erkens & Maas - prospects for development of new phytomedicines.

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at [chistiane@ufpi.edu.br](mailto:chistiane@ufpi.edu.br); [chisfeitosa@gmail.com](mailto:chisfeitosa@gmail.com); do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/jep/l.asp?i=161066&l=B9395MEH>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/2210/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923)

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,