



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO ALCALOIDE PALMATINA ISOLADO DE
Guatteria friesiana NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

SOANE KALINE MORAIS CHAVES

Teresina – Piauí

2016

SOANE KALINE MORAIS CHAVES

ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO ALCALOIDE PALMATINA ISOLADO DE
Guatteria friesiana NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa

Teresina – Piauí

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

C512a Chaves, Soane Kaline Morais.

Atividades farmacológicas do alcaloide palmatina isolado de *guatteria friesiana* na terapia da doença de Alzheimer / Soane Kaline Morais Chaves. – 2016.

121 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

“Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Chistiane Mendes Feitosa”.

1. Atividades Farmacológicas. 2. Alcaloide Palmatina Isolado. 3. *Guatteria Friesian*. 4. Alzheimer. I. Título.

SOANE KALINE MORAIS CHAVES

ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO ALCALOIDE PALMATINA ISOLADO DE
Guatteria friesiana NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa (Orientadora)
Departamento de Química – UFPI

Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante (Examinador interno)
PPGCF – UFPI

Profa. Dra. Lidiane da Silva Araújo (Examinador externo)
Departamento de Química – UFPI

Profa. Dra. Hilris Rocha e Silva (Examinador externo)
Curso de Farmácia – UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

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

Profa. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, Jesus e Nossa
Senhora e à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Jesus e Nossa Senhora pela força e fé que sempre me concederam em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais que são um exemplo de dedicação para com a família e que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, prezaram pela minha educação e desenvolvimento pessoal.

À minha irmã pelo companheirismo e apoio.

Aos meus avós Maizinha e Paizinho, Vó Conceição, tios e tias, primos e primas que sempre me incentivam.

À minha orientadora Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa pela disponibilidade, orientação, apoio e dedicação a mim e ao nosso trabalho.

A todos do grupo de pesquisa do LPPNEX, LAPGENIC, LAPNEX, LAPCOM que de várias formas contribuíram e tornaram possível a construção desse trabalho.

A todos do Programa de Pós-graduação em nome do Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira e todos do NTF em nome do Prof. Dr. Luciano Silva Lopes.

Ao Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (*in memoriam*) pelo incentivo.

Ao prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa pela contribuição ao trabalho.

Aos amigos do colégio e da graduação em Farmácia, aos professores da graduação em Farmácia.

À Universidade Federal do Piauí pela oportunidade que me concedeu para desenvolver o trabalho e agregar conhecimentos e experiências para a minha vida profissional e pessoal.

|

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ATCI	Iodeto de acetiltiocolina
CI ₅₀	Concentração inibitória em cinquenta por cento
DA	Doença de Alzheimer
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
Trolox	Ácido 6-hidróxi-2,5,8,7-tetrametilcromano-2-carboxílico
DMSO	Dimetilsulfóxido
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
PPA	Proteína precursora amiloide
SPCD	Sintomas psicológicos e comportamentais da demência
CCD	Cromatografia em camada delgada
BHA	3-t-butil-4-hidroxianisola
ROS	Espécies reativas de oxigênio
ADF	Adjuvante completo de Freud
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
PAL	Palmatina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
L-DOPA	Levodopa
CT	Colesterol
TG	Triglicerídeos
LPS	Lipopolissacarídeos
GaLN	Galactosamina
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
AA	Ácido ascórbico
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase

ONOO ⁻	Radical peroxinitrito
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
CADD	“Computer-Assisted Drug Design”
FDA	“Food and Drug Administration”

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 -	Esquema representativo dos fatores relacionados à Doença de Alzheimer.....	18
------------	--	----

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 -	Fotografia da espécie <i>G. friesiana</i> . com destaque para: (A) árvore; (B) cascas e caule; (C) folhas e frutos.....	22
Figura 2 -	Placas β -amiloides e emaranhados neurofibrilares.....	23
Figura 3 -	Esquema da reação para formação neurotransmissor acetilcolina....	24
Figura 4 -	Degradação enzimática do neurotransmissor acetilcolina.....	27

CAPÍTULO I

Figura 1 -	Alcaloides que demonstraram atividade anticolinesterásica.....	38
Figura 2 -	Alcaloides que demonstraram atividade antioxidante.....	40
Figura 3 -	Alcaloides que demonstraram atividade ansiolítica.....	42
Figura 4 -	Alcaloides que demonstraram atividade anti-inflamatória.....	44
Figura 5 -	Alcaloides que demonstraram atividade antidepressiva.....	46

CAPÍTULO II

Figura 1 -	Estrutura molecular do alcaloide palmatina.....	54
------------	---	----

CAPÍTULO III

Figura 1-	Estrutura química do alcaloide palmatina.....	69
Figura 2 -	Posição das linhagens na placa de Petri.....	75
Figura 3 -	Análise qualitativa da atividade inibitória da palmatina, nas concentrações de 1 mg/mL a 0,0625 mg/mL, frente à AChE com base no ensaio de Ellman.....	78
Figura 4 -	Análise qualitativa da atividade inibitória do ácido ascórbico e do trolox ambos na concentração de 50mmol/L com base no ensaio de Ellman.....	79

Figura 5 -	Percentuais antioxidantes da palmatina e de sua interação com ácido ascórbico e com trolox frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95
------------	---	----

CAPÍTULO IV

Figura 1 -	Diagrama de energia correlacionada com conformação obtida ao fim do cálculo Funcional de densidade.....	109
Figura 2 -	Estrutura computacional da enzima acetilcolinesterase.....	112
Figura 3 -	Primeira conformação para a interação computacional entre palmatina e acetilcolinesterase.....	112
Figura 4 -	Segunda conformação para a interação computacional entre palmatina e acetilcolinesterase.....	112
Figura 5 -	Terceira conformação para a interação computacional entre palmatina e acetilcolinesterase.....	113
Figura 6 -	Primeira conformação para a interação computacional entre galantamina e acetilcolinesterase.....	113
Figura 7 -	Segunda conformação para a interação computacional entre galantamina e acetilcolinesterase.....	113
Figura 8 -	Segunda conformação para a interação computacional entre galantamina e acetilcolinesterase.....	114
Figura 9 -	Comparação entre as interações de palmatina com acetilcolinesterase e de galantamina com acetilcolinesterase.....	114

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 -	Quantificação das publicações acerca do alcaloide palmatina encontradas em base de dados científicas para cada descritor de busca.....	55
Tabela 2 -	Resumo dos estudos das atividades <i>in vitro</i> da palmatina.....	57
Tabela 3 -	Resumo dos estudos das atividades <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> da palmatina.....	60

CAPÍTULO III

Tabela 1 -	Descrição das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas no estudo.....	74
Tabela 2 -	Avaliação quantitativa da atividade inibitória da palmatina com base no ensaio de Ellman.....	78
Tabela 3 -	Avaliação do potencial sequestrante da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico frente ao radical DPPH [•]	82
Tabela 4 -	Avaliação do potencial sequestrante da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico frente ao radical ABTS ^{•+}	83
Tabela 5 -	Avaliação do potencial sequestrante da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico frente ao radical OH [•]	84
Tabela 6 -	Avaliação do potencial sequestrante da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico frente ao radical NO [•]	85
Tabela 7 -	Avaliação antioxidante da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico frente ao ensaio de TBARS.....	86
Tabela 8 -	Avaliação da capacidade redutora da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico.....	87

Tabela 9 -	Avaliação do dano oxidante da palmatina nas concentrações de 50mg/mL, 25mg/mL, 10mg/mL, 5mg/mL, 1mg/mL, frente à diferentes linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
Tabela 10	Avaliação da atividade antioxidante da palmatina nas concentrações de 50mg/mL, 25mg/mL, 10mg/mL, 5mg/mL, 1mg/mL, frente aos danos oxidativos induzidos pelo H ₂ O ₂ em diferentes linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
Tabela 11 -	Avaliação da atividade antioxidante da palmatina nas concentrações de 50mg/mL, 25mg/mL, 10mg/mL, 5mg/mL, 1mg/mL em interação com o ácido ascórbico frente aos danos oxidativos induzidos pelo H ₂ O ₂ em diferentes linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	92
Tabela 12	Avaliação da atividade antioxidante da palmatina nas concentrações de 50mg/mL, 25mg/mL, 10mg/mL, 5mg/mL, 1mg/mL em interação com o trolox frente aos danos oxidativos induzidos pelo H ₂ O ₂ em diferentes linhagens de <i>Sccharomyces cerevisiae</i>	93

CAPÍTULO IV

Tabela 1 -	Energias das últimas conformações da molécula de palmatina.....	109
Tabela 2 -	Relação de resíduos de aminoácido da enzima acetilcolinesterase que apresentaram interação com a palmatina e a galantamina nas três melhores conformações obtidas pelo processo de docagem.....	111

Atividades farmacológicas do alcaloide palmatina isolado de *Guatteria friesiana* na terapia da Doença de Alzheimer. CHAVES, S. K. M. Orientadora: Dra. Chistiane Mendes Feitosa. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. UFPI, 2016

RESUMO

A busca por compostos com atividades farmacológicas promissoras torna os estudos acerca das plantas medicinais cada vez mais frequentes. Destaca-se nesse contexto a espécie *Guatteria friesiana* (W.A. Rodrigues) Erkens & Maas (Annonaceae), uma planta encontrada da bacia amazônica brasileira e colombiana e utilizada na medicina tradicional para várias finalidades. O alcaloide palmatina, isolado das folhas de *G. friesiana* vem demonstrando ações farmacológicas relevantes, no entanto, ainda existe um campo a ser pesquisado no que diz respeito à sua aplicação para a terapia de doenças neurodegenerativas, em especial a Doença de Alzheimer (DA). A DA é uma patologia multifatorial que acomete uma significativa parcela da população e vem crescendo ao longo dos anos devido ao aumento da proporção de idosos na população mundial. Fatores como formação de placas senis, emaranhados neurofibrilares, redução dos níveis de acetilcolina e fenômenos oxidativos estão relacionados ao desenvolvimento e/ou progressão da DA. O estudo objetivou avaliar as ações anticolinesterásica *in vitro*, antioxidante *in vitro*, frente a diversos radicais livres e antioxidante *in vivo* da palmatina, bem como avaliar o modo de interação da molécula com a enzima acetilcolinesterase (AChE) através da análise computacional. O estudo iniciou com uma revisão bibliográfica sobre os alcaloides que apresentavam ações de interesse para o tratamento da DA (ações anticolinesterásica, antioxidante, antidepressiva, ansiolítica e anti-inflamatória), posteriormente realizou-se uma prospecção científica e tecnológica sobre as ações farmacológicas da palmatina. Os ensaios *in vitro* foram realizados para avaliar a atividade anticolinesterásica da palmatina, ácido ascórbico e trolox e da associação palmatina + trolox. Foram ainda executados ensaios antioxidantes *in vitro* e *in vivo* com os mesmos compostos de forma isolada e em associação. A palmatina, o trolox e a associação desses apresentaram um $CI_{50} = 0,29 \mu\text{g/mL}$; $2,256 \mu\text{g/mL}$ e $1,534 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, em relação à inibição da AChE. A palmatina, o trolox e o ácido ascórbico isolados e em associação também apresentaram atividade antioxidantes significativa em vários testes *in vitro* e foram capazes de modular a oxidação promovida pelo peróxido de hidrogênio em diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. A análise computacional demonstrou que a ligação da palmatina com o sítio ativo da AChE apresenta semelhança espacial com a interação AChE e galantamina, um alcaloide extensamente utilizado na terapia da DA, corroborando com a atividade anticolinesterásica evidenciada nos estudos *in vitro*. Portanto, os resultados obtidos demonstram que a palmatina apresenta ações promissoras que possibilitam o desenvolvimento de uma nova alternativa terapêutica para a Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Palmatina. Tratamento. Farmacologia. Doença de Alzheimer.

Pharmacological activities of an alkaloid palmatine isolated from *Guatteria friesiana* in therapy of Alzheimer's Disease. CHAVES, S. K. M. Advisor: Chistiane Mendes Feitosa. Master's Dissertation. Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. UFPI, 2016.

ABSTRATC

The search for compounds with promising pharmacological activities make studies on medicinal plants increasingly frequent. It is noteworthy in this context the *Guatteria friesiana* species (W. A. Rodrigues) Erkens & Maas (Annonaceae), a plant found in Brazilian and Colombian Amazon basin and used in traditional medicine for various purposes. The alkaloid palmatine, isolated from *G. friesiana* leaves has shown interesting pharmacological actions, but there is still a field to be searched with respect to its application for neurodegenerative diseases therapy, in particular Alzheimer's disease (AD). AD is a multifactorial disease that affects a significant portion of the population and has grown over the years due to the increasing proportion of elderly people in the world population. Factors such as formation of senile plaques and neurofibrillary tangles, reduction of acetylcholine levels and oxidative phenomena are related to the development and/or progression of Alzheimer's disease. The study aimed to evaluate the anticholinesterasic actions *in vitro*, *in vitro* antioxidant, in relation to various free radicals and potential reducer and *in vivo* of the palmatine and to evaluate the molecule interaction mode with the enzyme acetylcholinesterase through computational analysis. The study began with a literature review about the alkaloids that presented relevant actions for the treatment of AD (anticholinesterase, antioxidant, antidepressant, anxiolytic and anti-inflammatory actions) and subsequently held a scientific and technological exploration of the pharmacological actions of palmatine. Then, *in vitro* assays were performed to assess acetylcholinesterase (AChE) activity of palmatine, ascorbic acid and trolox and palmatine + trolox association. They were also performed antioxidants assays *in vitro* and *in vivo* with the same compounds in isolation and in combination. The palmatine, trolox and the combination of these showed an $IC_{50} = 0.29 \mu\text{g/mL}$; $2.256 \mu\text{g/mL}$ and $1.534 \mu\text{g/mL}$, respectively, in relation to inhibition of AChE. The alkaloid, trolox and ascorbic acid alone and in combination also showed significant antioxidant activity in various *in vitro* tests and were able to modulate the oxidation promoted by hydrogen peroxide in different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Computational analysis showed that the binding of palmatine with the active site of AChE displays spatial resemblance to interaction AChE and galantamine, an alkaloid widely used in AD, corroborating the acetylcholinesterase activity demonstrated *in vitro* studies. Therefore, the results obtained demonstrate that palmatine presents promising actions that enabling the development of a new therapeutic approach to Alzheimer's Disease.

Keywords: Palmatine. Treatment. Pharmacological. Alzheimer's disease.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 A espécie <i>Guatteria friesiana</i>	21
3.2 A Doença de Alzheimer.....	22
3.3 O estresse oxidativo na Doença de Alzheimer.....	25
3.4 Tratamento da Doença de Alzheimer.....	26
REFERÊNCIAS	28
4. CAPÍTULO I: Propriedades farmacológicas de alcaloides como perspectivas para o desenvolvimento de fitofármacos para doenças neurodegenerativas	33
Resumo.....	34
Abstract.....	34
Introdução.....	35
Materiais e Métodos.....	36
Resultados e Discussão.....	36
Conclusão.....	46
Referências.....	47
5. CAPÍTULO II: Atividades farmacológicas do alcaloide palmatina, composto isolado de <i>Guatteria friesiana</i>, perspectivas para a elaboração de novos fármacos	51
Resumo.....	52
Abstract.....	52
Introdução.....	53
Materiais e Métodos.....	54
Resultados e Discussão.....	55
Conclusão.....	61
Referências.....	62

6. CAPÍTULO III: Atividades anticolinesterásica <i>in vitro</i> e antioxidante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da palmatina, alcaloide isolado de <i>Guatteria friesiana</i>.....	65
Resumo.....	66
Abstract.....	66
Introdução.....	67
Materiais e Métodos.....	68
Resultados e Discussão.....	76
Conclusão.....	98
Referências.....	99
7. CAPÍTULO IV: Análise computacional da interação palmatina/galantamina e acetilcolinesterase com uso de ferramentas de modelagem e docking molecular.....	103
Resumo.....	104
Abstract.....	104
Introdução.....	105
Materiais e Métodos.....	107
Resultados e Discussão.....	108
Conclusão.....	114
Referências.....	115
ANEXOS.....	119

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse de países desenvolvidos em fitoterápicos é uma conjuntura propícia para o estímulo à pesquisa de plantas medicinais e seu uso terapêutico pela comunidade e o desenvolvimento de medicamentos através de seus derivados. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população nos países em desenvolvimento acreditam em medicamentos à base de plantas (ALMEIDA, et al.,1998; MACIEL, et al, 2002; FEITOSA et al., 2015).

Uma grande proporção dos medicamentos modernos são derivados de plantas, frequentemente inspirados pelo uso tradicional das espécies vegetais. No entanto, apesar de promissor esse campo ainda é bastante vasto no que diz respeito aos estudos físico-químicos, biológicos e/ou farmacológicos. Muitas classes de princípios ativos têm sido isoladas de plantas medicinais. O Brasil apresenta a maior biodiversidade do mundo, o que o torna uma fonte inestimável na pesquisa de compostos para o desenvolvimento de novos fármacos que possam atuar nas desordens que acometem vários sistemas do organismo (LÓPEZ-RUBALCAVA; ESTRADA-CAMARENA, 2016; SHER et al., 2016).

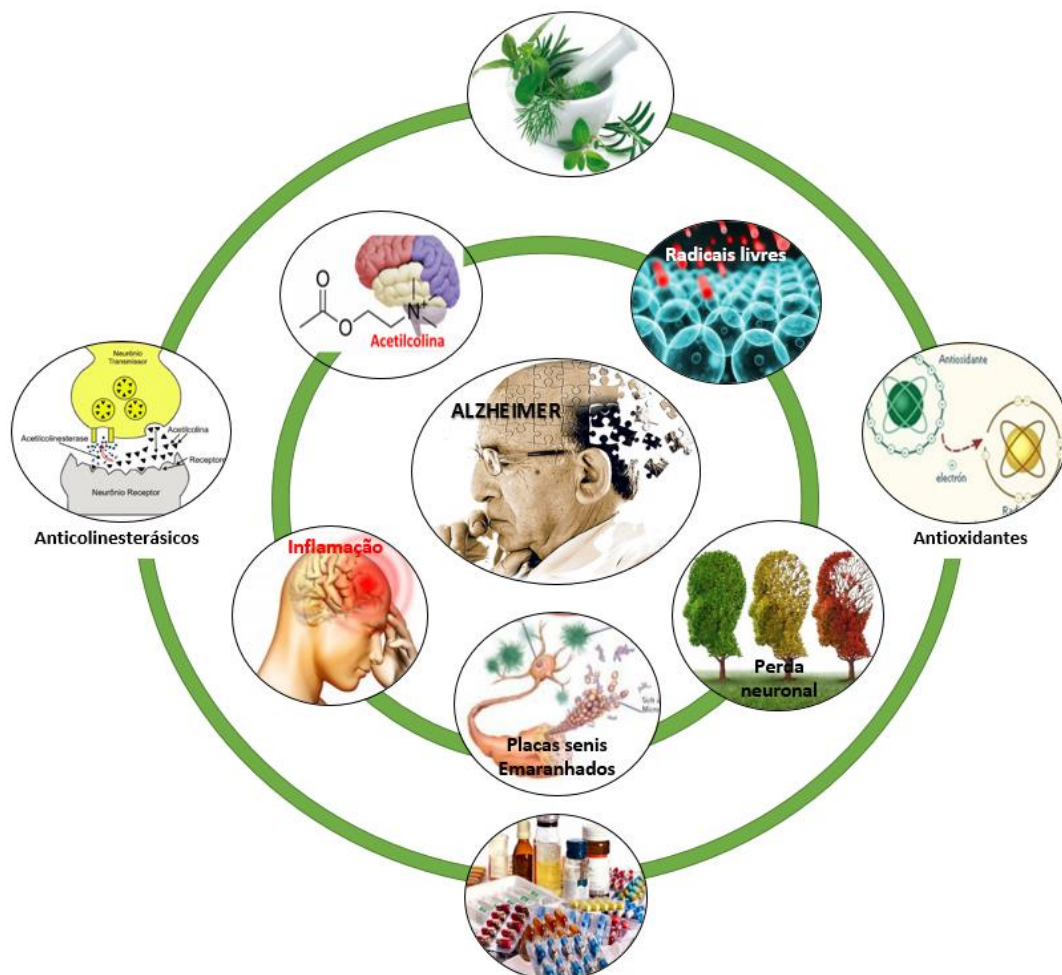
Entre esses sistemas, destaca-se o sistema nervoso central, um dos mais complexos e responsável pela coordenação e regulação das principais atividades do corpo. Esse sistema é vulnerável a uma gama de desordens como as infecções (meningites); desordens funcionais (epilepsia), vasculares (acidente vascular cerebral, hemorragias), neuromusculares (doença do neurônio motor), bem como desordens neurodegenerativas, como por exemplo, a Doença de Alzheimer (DUTRA et al., 2016).

A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurológica progressiva que resulta na perda de memória, comportamento incomum, mudanças de personalidade, perda da habilidade de pensamento e de realização de atividades cotidianas, dentre outras alterações. Essa patologia está estritamente relacionada com o processo de envelhecimento, sendo esse o principal fator de risco. Com o crescente envelhecimento da população mundial há uma tendência de que a proporção de portadores da Doença de Alzheimer seja cada vez maior com o passar dos anos. Cerca de 35,6 milhões de pessoas convivem com a doença e a estimativa é de que esse número praticamente dobre a cada 20 anos, chegando a 65,7 milhões em 2030 (TEIXEIRA et al., 2015). A principal abordagem para pacientes portadores da DA é o tratamento farmacológico, muitas vezes utilizando a polifarmácia (JIVAD; RABIEI, 2014).

As estratégias terapêuticas da DA são baseadas na patogênese e desenvolvimento da doença que estão relacionados à redução de neurotransmissores (principalmente a

acetilcolina), atuação de fenômenos oxidativos, inflamatórios, dentre outros. Além disso, aplicam-se ao tratamento medicamentos utilizados para tratar determinados sintomas que podem ocorrer durante o curso da patologia como depressão, ansiedade e insônia. Dessa forma, a terapia consiste no uso principalmente de inibidores da acetilcolinesterase (AChE), mas também inibidores glutamatérgicos, compostos antioxidantes, assim como fármacos antidepressivos e/ou ansiolíticos. No entanto, às limitações decorrentes da terapia atual, como eficácia moderada e reações adversas, não contribuem para um sucesso total do tratamento o que justifica a busca constante por compostos com ações farmacológicas propícias para serem aplicadas na terapia (Figura 1) (CURRAIS et al., 2014; YAHIAOUI et al., 2016; TEIPEL et al., 2016).

Figura 1 – Esquema representativo dos fatores relacionados à Doença de Alzheimer



As espécies vegetais figuram como uma fonte valiosa na pesquisa de novos medicamentos. Estudos relacionados às plantas medicinais estão sendo realizados na busca por compostos capazes de atuar no tratamento da DA. O gênero *Guatteria*, por exemplo,

pertencente à família Annonaceae, possui variadas espécies que já demonstram ações farmacológicas comprovadas ou ainda empíricas de extratos, frações e até mesmo substâncias isoladas. Pesquisas realizadas com a espécie *Guatteria friesiana* descrevem importantes atividades farmacológicas já estudadas, a saber: antimicrobiana, larvicida, antitumoral e citotóxica. Algumas pesquisas também demonstram que alcaloides isolados de espécies da família Annonaceae mostraram atividade inibitória frente à enzima AChE, além de atividade antioxidante, ações significativas no âmbito da terapia da DA (COSTA et al., 2008; ACIOLE et al., 2011; BRITTO et al., 2012; COSTA et al., 2013).

O presente trabalho foi estruturado em quatro capítulos sendo que o primeiro capítulo consiste de uma revisão bibliográfica sobre as atividades farmacológicas dos alcaloides encontrados em espécies vegetais; o segundo capítulo visa analisar o estado da arte e da técnica da substância palmatina; o terceiro capítulo apresenta estudos *in vitro* para verificação das atividades anticolinesterásica da palmatina e estudos *in vitro* e *in vivo* para verificar a atividade antioxidante. O quarto capítulo avalia a interação das substâncias galantamina e palmatina com a enzima AChE através da docagem molecular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar as atividades anticolinesterásica e antioxidante da palmatina, isolado da espécie vegetal *Guatteria friesiana*, bem como avaliar a interação computacional entre as moléculas de palmatina e galantamina e a enzima acetilcolinesterase.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o estado da arte e da técnica das pesquisas envolvendo alcalóides promissores para a terapêutica da Doença de Alzheimer.
- Estabelecer a concentração mínima de palmatina, ácido ascórbico, trolox e associações capaz de inibir cinquenta por cento da atividade da enzima acetilcolinesterase (CI₅₀) em ensaios *in vitro*;
- Estabelecer a concentração mínima de palmatina, ácido ascórbico, trolox e associações capaz de inibir em cinquenta por cento os radicais ABTS^{•+} (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]), DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), nitrito (NO[•]) e hidroxila ([•]OH), o TBARS, bem como determinar o seu potencial redutor em ensaios *in vitro*;
- Avaliar a capacidade oxidante e antioxidante da palmatina, ácido ascórbico, trolox e associações em diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Verificar os sítios de ligação entre a palmatina e a enzima AChE e a galantamina e AChE e comparar esses sítios de ligação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A espécie *Guatteria friesiana*

As Annonaceae constituem uma família de árvores e arbustos de regiões tropicais e subtropicais compreendendo cerca de 120 gêneros e mais de 2000 espécies de plantas. É inteiramente tropical, com 39 gêneros localizados na América tropical. Economicamente tem grande relevância como fonte de frutas, bem como matérias-primas para a indústria cosmética e perfumaria. Dentre os 120 gêneros, *Guatteria* Ruiz et Pav. é o maior da família Annonaceae com cerca de 307 espécies distribuídas do México ao Brasil. No Brasil, 88 espécies são descritas e 47 delas são endêmicas (COSTA et al., 2008; SANTOS et al., 2015).

Esse gênero é representado por arbustos e árvores pequenas distribuídas ao longo da Mesoamérica (cerca de 30 espécies), Caribe (3 espécies) e América do Sul (cerca de 230 espécies), principalmente nas planícies da Amazônia brasileira, e é conhecido por conter um grande número de alcaloides. As espécies são popularmente conhecidas como “enviveiras” devido a presença de fibras longas na casca. Algumas espécies desse gênero são conhecidas por suas fragrâncias aromáticas e suas propriedades medicinais. Em investigações fitoquímicas e farmacológicas em espécies do gênero *Guatteria*, muitas das funções biológicas estudadas foram atribuídas à presença de compostos bioativos como terpenos e alcalóides, incluindo, entre essas funções, citotoxicidade contra células tumorais humanas, atividade antioxidante, antimicrobiana e antiparasitária contra *Leishmania* sp., *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi* (LIMA et al., 2003; LIMA et al., 2004; ERKENS et al., 2007; COSTA et al., 2013; RABELO et al., 2014; ANDREAZZA et al., 2016).

Dentre as espécies do gênero destaca-se a *Guatteria friesiana* (W.A. Rodrigues) Erkens & Maas (sinônimo *Guatteriopsis friesiana* W.A. Rodrigues), Figura 1, uma planta medicinal de pequeno porte, variando de 3 a 10 m de altura e 4 a 10 cm de diâmetro, utilizada na medicina tradicional com diversas finalidades. Estudos acerca da composição dos óleos essenciais e constituintes da casca, do caule e folhas têm sido realizados e demonstram que um dos principais constituintes da espécie são os alcaloides aporfinóides e protoberberínicos. Os óleos essenciais e os alcaloides já exibiram atividades antitumorais e antimicrobianas, assim como atividade larvicida contra as larvas de *Aedes aegypti*. Um dos alcaloides isolados das folhas de *G. friesiana* é a palmatina que já demonstrou atividade citotóxica seletiva contra células tumorais, efeito antioxidante, além de atividade antidepressiva em camundongos, atividades essas que podem ser benéficas no tratamento de determinadas doenças

neurodegenerativas (BEZERRA et al., 2012; COSTA et al., 2013; DHINGRA & BHANKHER 2014).

Figura 1 – Fotografia da espécie *G. friesiana*. com destaque para: (A) árvore; (B) cascas e caule; (C) folhas e frutos.



Fonte: COSTA, 2009.

3.2 A Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva caracterizada pelo desenvolvimento de demência, alterações cognitivas, neuropsiquiátricas e comportamentais que resultam na progressiva incapacidade do indivíduo. Constitui-se como a principal causa de demência na população idosa, levando ao declínio da memória, linguagem e outras habilidades cognitivas que afetam a habilidade do indivíduo de realizar até mesmo atividades do cotidiano. Além dos danos ao indivíduo, com a progressão da doença, o portador passa a necessitar de cuidados por tempo integral, o que exige uma carga tanto emocional quanto econômica da família, bem como da sociedade em geral (ELISHA et al., 2013; CHUONG et al., 2014; RIDGE et al., 2016).

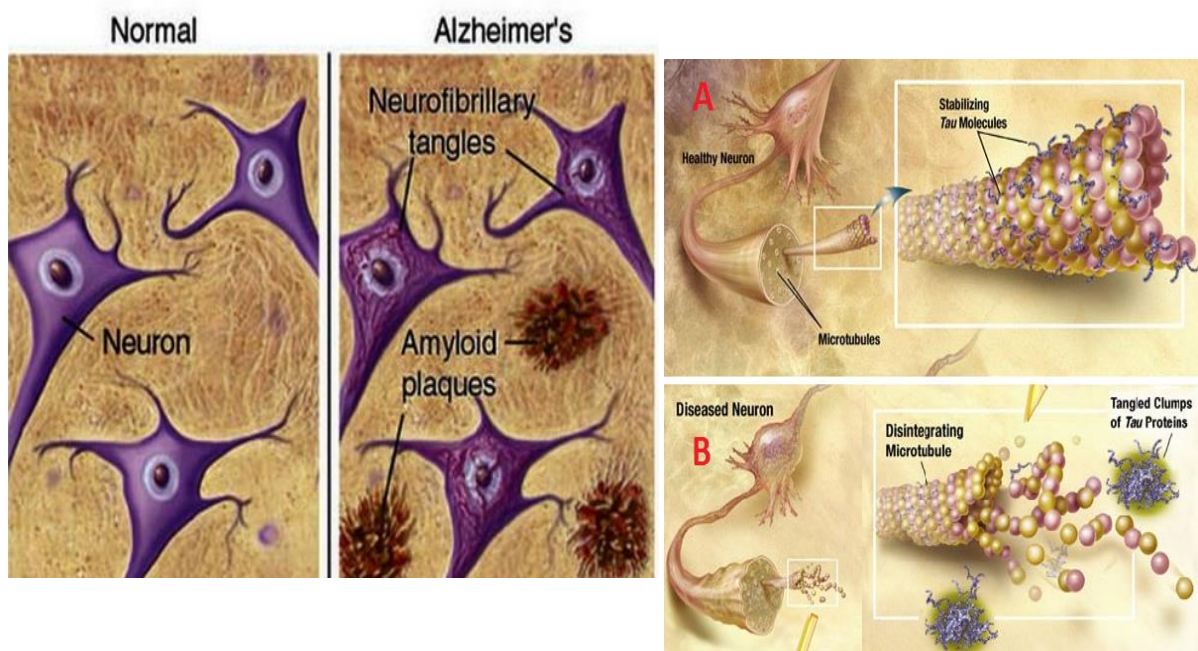
O principal fator de risco para o desenvolvimento da DA é a idade, com aumento da prevalência de 0,7% na faixa etária de 60 a 64 anos para cerca de 40% nos grupos etários de 90 a 95 anos. Com o aumento da expectativa de vida da população, tanto a nível nacional

quanto mundial, estima-se que cada vez mais pessoas sejam acometidas com o Mal de Alzheimer. Todos esses fatores contribuem para considerar a DA um importante problema de saúde pública (TEIXEIRA, 2015; ASSOCIATION, 2016).

A DA foi primeiramente descrita por Alois Alzheimer no ano de 1907. Esse neuropatologista alemão relatou o caso de uma paciente de 51 anos que apresentava declínio da memória, além de vários déficits cognitivos e distúrbios de comportamento. A necropsia cerebral revelou extensas lesões com perda neuronal, placas senis e emaranhados neuronais denominados fusos neurofibrilares. As modificações cerebrais características encontradas em pacientes portadores da DA levaram ao levantamento das hipóteses acerca das causas para o surgimento e/ou evolução dessa patologia (MARTELLI; PALERMO, 2012).

A hipótese amiloide descrita na DA sugere que a formação de placas β -amiloides (insolúveis), a partir do metabolismo anormal da proteína precursora amiloide (PPA) e a deposição dessas placas, em várias áreas do cérebro, desencadeia a disfunção e morte neuronal (Figura 2). Esse fenômeno promove uma cascata que inclui injúrias neuronais, formação de emaranhados neurofibrilares e até mesmo o estresse oxidativo. Além disso, a hiperfosforilação da proteína Tau, uma proteína estabilizadora do citoesqueleto neuronal, leva à formação dos emaranhados neurofibrilares promovendo uma desestabilização dos microtúbulos dos neurônios e, conseqüentemente, a um colapso do citoesqueleto que também pode contribuir no desenvolvimento de disfunções sinápticas, alterações morfológicas e neurodegeneração (Figura 2) (BALLARD et al., 2011; DRACHMAN, 2014).

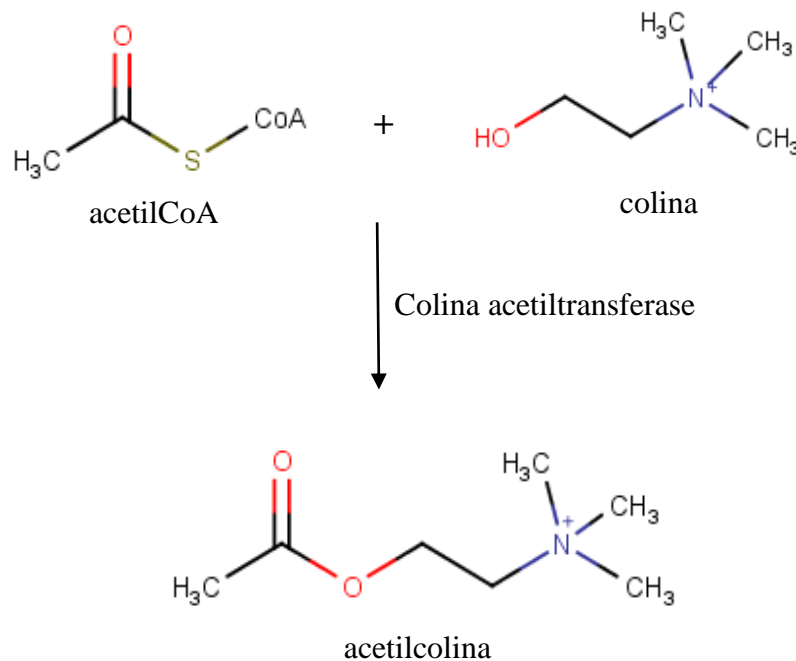
Figura 2 – Placas β -amiloides e emaranhados neurofibrilares.



Em 1976, dois grupos de pesquisa independentes relataram a associação da DA com a severa perda de marcadores colinérgicos no córtex cerebral. Posteriormente, a descoberta da ocorrência de redução da atividade de colina acetiltransferase (enzima que atua na síntese da acetilcolina) (Figura 3) e perda de neurônios colinérgicos em pacientes com DA avançada estabeleceram a hipótese colinérgica. A hipótese colinérgica baseia-se no fato de que a redução dos níveis de acetilcolina, devido à diminuição da síntese e/ou de sua neurotransmissão influencia no desenvolvimento das alterações características de portadores de Alzheimer. O resultado da deficiência cerebral de acetilcolina leva a perda de memória e o aparecimento de sintomas cognitivos. Estudos *in vitro* mostram ainda que os peptídios β -amiloides inibem a neurotransmissão colinérgica, acentuando mais ainda os baixos níveis cerebrais dessa neurotransmissão (PINTO; LANCTÔT; HERRMANN, 2011).

Outras alterações como fenômenos inflamatórios ocorrem nas periferias durante a maturação das placas senis exacerbando os danos causados aos neurônios. Estudos com camundongos transgênicos sugeriram que a indometacina e o ibuprofeno podem reduzir a formação das placas β -amilóides (BARAGE; SONAWAN, 2015).

Figura 3 – Esquema da reação para formação neurotransmissor acetilcolina.



A deposição de placas amiloides, formação dos emaranhados neurofibrilares e processos inflamatórios, que levam às perdas neuronais, disfunções sinápticas e neuroquímicas atingem principalmente os neurônios colinérgicos contribuindo ainda mais

com a redução dos níveis de acetilcolina no cérebro de portadores da DA. Portanto, percebe-se que a fisiopatologia da DA é um processo complexo e multifatorial e que as alterações estão relacionadas, principalmente, aos danos neuronais e à diminuição dos níveis de acetilcolina (ACh) (FORLENZA, 2005; HWANG et al., 2015; SCHWARZ; WEINER; NEUROIMAGING, 2016).

3.3 O estresse oxidativo e a Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer apresenta etiopatogênese multifatorial e a associação desses fenômenos culminam com o desenvolvimento dos sinais e sintomas dos portadores da neuropatologia. Vários estudos têm identificado alterações que contribuem para o início, degeneração e morte neuronal. Dentre essas alterações destaca-se o estresse oxidativo (PRASAD, 2016).

O cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo, devido a relativa falta de ação antioxidante, alta concentração de ácidos graxos insaturados e alta taxa de consumo de oxigênio. O estresse oxidativo leva a danos ao DNA, proteínas e lipídios que podem levar a disfunção em várias proteínas e enzimas, assim como à danos na integridade das células nervosas, que não são completamente reparados e resultam em modificações como a perda neuronal e disfunção sináptica na DA (OPII et al., 2008).

O estresse oxidativo, que representa esse desequilíbrio entre a formação de agentes oxidantes no organismo e as defesas protetivas antioxidantes, vem sendo considerado em alguns estudos como um evento inicial na patogênese da DA sustentado pelo fato de que em alguns modelos de pesquisa, como modelos de cultura de células e modelos de animais transgênicos com DA, os níveis de marcadores de danos oxidativos se encontram elevados. Esse fenômeno também vem sendo considerado um fator que contribui para a progressão da DA (SINHA et al., 2010; MECOCCI; CRISTINA, 2012).

Produtos de oxidação de DNA, proteínas e lipídios têm sido encontrados no sangue e cérebro (pós-morte) de pacientes portadores de DA em comparação com controles. Em estudos acerca dessas hipóteses foram observados em pacientes com DA, em fases iniciais e finais, elevados níveis de malondialdeído, um dos produtos da peroxidação lipídica, bem como baixos níveis de enzimas antioxidantes, como glutathione redutase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase no soro e eritrócitos. A própria toxicidade da proteína β -amiloide tem sido relacionada com a formação de radicais livres (RINALDI et al., 2003).

Dessa forma, é possível considerar que a melhora nas defesas antioxidantes poderia contribuir para a proteção e/ou redução dos danos causados por produtos do estresse oxidativo, envolvidos na fisiopatologia da DA (WANG et al., 2016).

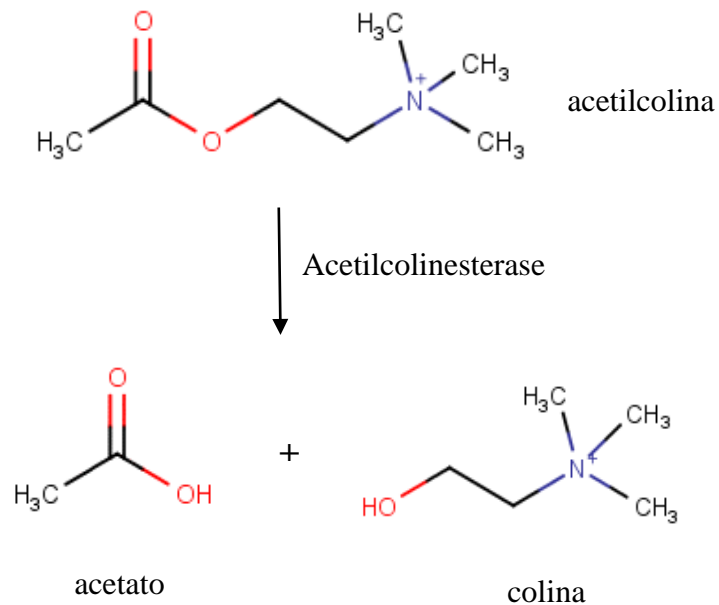
3.4 Tratamento da Doença de Alzheimer

O tratamento farmacológico da DA é pautado na utilização da polifarmácia que tem como objetivos a terapêutica específica, abordagem profilática, tratamento sintomático e terapêutica complementar. No campo farmacológico várias substâncias psicoativas têm sido propostas para preservar ou restabelecer a cognição, o comportamento e as habilidades funcionais do paciente com demência (FORLENZA, 2005).

Os inibidores da acetilcolinesterase, enzima responsável pela degradação da acetilcolina (Figura 4) a saber: tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina são os principais medicamentos utilizados para o tratamento específico da DA. A sua utilização baseia-se na hipótese de que a redução dos níveis de acetilcolina está relacionada à progressão da DA. Dessa forma, a utilização de compostos capazes de inibir a enzima responsável pela degradação da ACh prolonga o tempo de permanência do neurotransmissor na fenda sináptica atenuando os danos promovidos pela sua redução no cérebro de portadores do Mal de Alzheimer (SERENIKI; VITAL, 2008).

A galantamina, por exemplo, utilizada no tratamento dos sintomas da demência, é um alcaloide que foi inicialmente isolado dos bulbos e flores de *Galanthus caucasicus*, *Galanthus woronowii* e gêneros afins e atualmente é um dos fármacos mais utilizados na terapia. No entanto, esses medicamentos ainda possuem uma eficácia limitada, apresentando melhores resultados para a DA leve a moderada, além de poderem causar efeitos adversos como hepatotoxicidade e efeitos gastrointestinais (INDEN et al., 2016; WAHBA; DARWISH; KAMAL, 2016).

Figura 4 – Degradação enzimática do neurotransmissor acetilcolina



A memantina, um antagonista não-competitivo de receptores NMDA é outro medicamento utilizado no tratamento e sua aplicação é sustentada pelo fato de que altos níveis do neurotransmissor glutamato, que atua através desses receptores, age como excitotoxina causando a morte neuronal. Os efeitos desse neurotransmissor, assim como a AChE encontram-se alterados na DA (ENGELHARDT et al., 2005).

Além das alterações cognitivas e da memória os portadores da DA podem apresentar distúrbios comportamentais e neuropsiquiátricos também denominados sintomas psicológicos e comportamentais da demência (SPCD) tais como agressão física, inquietação, ansiedade, depressão, apatia, agitação, comportamento motor aberrante, distúrbios de sono e apetite, entre outros. A identificação dos SPCD é relevante, uma vez que ocorrem na maioria das pessoas com demência durante o curso da doença causal (35-75% dos pacientes). Por conseguinte, a inserção de medicamentos neurolépticos e psicóticos quando do aparecimento desses sintomas podem trazer benefícios na melhoria de qualidade de vida dos pacientes. Medicamentos como, antidepressivos e benzodiazepínicos podem ser usados em casos de depressão, ansiedade ou insônia (PINTO; LANCTÔT; HERRMANN, 2011; VALE et al., 2011).

A associação dos fenômenos oxidativos com a patogênese e a progressão da DA sustenta a utilização de compostos antioxidantes no tratamento. Estudos apontam a possibilidade de utilização, por exemplo, da vitamina E como adjuvante na terapia, sendo útil no retardo da evolução natural da doença, exercendo um efeito neuroprotetor. Já a associação

dos danos neuronais à processos inflamatórios que ocorrem nas adjacentes às placas amiloides tem levado a estudos acerca da utilização de medicamentos anti-inflamatórios na terapêutica do Alzheimer (SERENIKI ; VITAL, 2008; MECOCCI; CRISTINA, 2012).

Apesar da existência de algumas alternativas terapêuticas, os efeitos das drogas hoje aprovadas para o tratamento da DA limitam-se ao retardo na evolução natural da doença, permitindo apenas uma melhora temporária do estado funcional do paciente e apresentam eficácia limitada. Nenhum dos tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente retarda ou interrompe os danos e a destruição neuronal que causa os sintomas da Doença de Alzheimer e a torna fatal, além disso, a efetividade dessas drogas varia de pessoa para pessoa (FORLENZA, 2005).

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION, A. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 12, n. 4, p. 459–509, 2016.

BALLARD, C.; GAUTHIER, S.; CORBETT, A.; BRAYNE, C.; AARSLAND, D.; JONES, E. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 377, n. 9770, p. 1019–1031, 2011.

BARAGE, S. H.; SONAWANE, K. D. Amyloid cascade hypothesis : Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. **Neuropeptides**, v. 52, p. 1–18, 2015.

BEZERRA, D. P.; BRITTO, A. C. S.; OLIVEIRA, A. C. A.; HENRIQUES, R. M.; CARDOSO, G. M. B.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, A. A.; PESSOA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; COSTA, E. V. Assessment of Antitumor Properties of the Essential Oil From the Leaves of *Gutteria friesiana*. **European Journal of Cancer**, v. 48, p. S241, 2012.

CHUONG, N. N.; HUONG, N. T. T.; HUNG, T. M.; LUAN, T. C. Anti-Cholinesterase Activity of Lycopodium Alkaloids from Vietnamese *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis. v. 9, p. 19172–19179, 2014.

COSTA, E. V.; TEIXEIRA, S. D.; MARQUES, F. A.; DUARTE, M. C.; DELARMELINA, C.; PINHEIRO, M. L.; TRIGO, J. R.; SALES MAIA, B. H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Gutteriopsis* species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1895–1899, 2008.

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

CURRAIS, A.; CHIRUTA, C.; GOUJON-SVRZIC, M.; COSTA, G.; SANTOS, T.; BATISTA, M. T.; PAIVA, J.; DO CÉU MADUREIRA, M.; MAHER, P. Screening and identification of neuroprotective compounds relevant to Alzheimer's disease from medicinal plants of S. Tomé e Príncipe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 830–840, 2014.

DRACHMAN, D. A. The amyloid hypothesis, time to move on : Amyloid is the downstream result , not cause , of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, n. 3, p. 372–380, 2014.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, p. 1–25, 2016.

ELISHA, I. L.; ELGORASHIA, E. E.; HUSSEINC, A. A.; DUNCAND, G.; ELOFFA, J. N. Acetylcholinesterase inhibitory effects of the bulb of *Ammocharis coranica* (Amaryllidaceae) and its active constituent lycorine. **South African Journal of Botany**, v. 85, p. 44–47, 2013.

ERKENS, R. H. J.; CHATROU, L. W.; MAAS, J. W. A rapid diversification of rainforest trees (*Guatteria*; Annonaceae) following dispersal from Central into South America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 399–411, 2007.

FEITOSA, et al., Plantas medicinais inibidoras da enzima acetilcolinesterase in: **Plantas medicinais e a doença de Alzheimer**, editora Átomo, 1a ed., 2015.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, n. 3, p. 137–148, 2005.

HWANG, J.; , KIM, C. M.; JEON, S.; LEE, J. M.; HONG, Y. J.; ROH, J. H.; LEE, J. H.; KOH, J. Y.; NA, D. L. Prediction of Alzheimer's disease pathophysiology based on cortical thickness patterns. **Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring** n. 2, p. 1–10, 2015.

INDEN, M.; TAKATA, K.; YANAGISAWA, D.; ASHIHARA, E.; TOOYAMA, I.; SHIMOHAMA, S.; KITAMURA, Y. $\alpha 4$ nicotinic acetylcholine receptor modulated by galantamine on nigrostriatal terminals regulates dopamine receptor-mediated rotational behavior. **Neurochemistry International**, v. 94, p. 74–81, 2016.

JIVAD, N.; RABIEI, Z. Study on medicinal plants used in the treatment of learning and memory impairments. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 10, p. 780–789, 2014.

LIMA, M. A.; FECHINEA, I. M.; SILVA, M. S.; MAIAC, J. G. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria juruensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 423–425, 2003.

LIMA, M. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MERLIC, C. A.; DOROH, B. C.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria poeppigiana*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 347–349, 2004.

LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; ESTRADA-CAMARENA, E. Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 377–391, 2016.

LUIZA, N.; CARAMANO DE LOURENÇO, C.; HERNANDEZ-TASCO, Á. J.; PINHEIRO, M. L.; ALVES STEFANELLO, M. É.; VILAÇA COSTA, E.; SALVADOR, M. J. Antimicrobial photodynamic effect of extracts and oxoaporphine alkaloid isomoschatoline from *Guatteria blepharophylla*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 154–162, 2016.

MARTELLI, A.; PALERMO, F. Alterações Cerebrais e Análise Histopatológica dos Emaranhados Neurofibrilares na Doença de Alzheimer. **UNICIÊNCIAS**, p. 45–50, 2012.

MECOCCI, P.; CRISTINA, M. Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 631–638, 2012.

NITRINI, R.; NITRITI, R.; CARAMELLI, P.; BOTTINO, C. M. C.; DAMASCENO, B. P.; BRUCKI, S. M. D.; ANGHINAH, R. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil: avaliação cognitiva e funcional. Recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 3a, p. 720–727, 2005.

OPII, W. O.; JOSHI, G.; HEAD, E.; MILGRAM, N. W.; MUGGENBURG, B. A.; KLEIN, J. B.; PIERCE, W. M.; COTMAN, C. W.; BUTTERFIELD, D. A. Proteomic identification of brain proteins in the canine model of human aging following a long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment: Relevance to Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 29, p. 51–70, 2008.

PINTO, T.; LANCTÔT, K. L.; HERRMANN, N. Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 4, p. 404–412, 2011.

PRASAD, K. N. Simultaneous activation of Nrf2 and elevation of antioxidant compounds for reducing oxidative stress and chronic inflammation in human Alzheimer's disease. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 153, p. 41–47, 2016.

RABELO, D. M.; RABELO, D. M.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; SALOMÉ, K. S.; COSTA, E. V.; DA SILVA, F. M. A.; CHAVES, Y. O.; BASTOS, I. S.T Alcaloides isoquinolínicos e investigação das atividades antiplasmódica e antibacteriana de *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1453–1458, 2014.

RIDGE, P. G.; HOYT, K. B.; BOEHME, K.; MUKHERJEE, S.; CRANE, P. K.; HAINES, J. L.; MAYEUX, R.; FARRER, L. A.; PERICAK-VANCE, M. A.; SCHELLENBERG, G. D.; KAUWE, J. S. Assessment of the genetic variance of late-onset Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 41, 2016.

RINALDI, P.; POLIDORI, M. C.; METASTASIO, A.; MARIANI, E.; MATTIOLI, P.; CHERUBINI, A.; CATANI, M.; CECCHETTI, R.; SENIN, U.; MECOCCI, P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, p. 915–919, 2003.

SANTOS M. F. C.; SANTOS, M. F. C.; DUTRA, L. M.; MORAES, V. R. S.; BARISON, A.; COSTA, E. V. Aporphine alkaloids from the stem bark of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 60, p. 106–109, 2015.

SCHWARZ, A. J.; WEINER, M. W.; NEUROIMAGING, D. Amyloid status imputed from a multimodal classifier including structural MRI distinguishes progressors from nonprogressors in a mild Alzheimer's disease clinical trial cohort. **Alzheimer's & Dementia**, n. April, p. 1–10, 2016.

SERENIKI, A; VITAL, M. A B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria**, v. 30, n. 1, 2008.

SHER, H.; BUSSMANN, R. W.; HART, R.; DE BOER, H. J. Traditional use of medicinal plants among Kalasha , Ismaeli and Sunni groups in Chitral District , Khyber Pakhtunkhwa province, Pakistan. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 188, p. 57–69, 2016.

SINHA, M.; SAHA, A.; BASU, S.; PAL, K.; CHAKRABARTI, S. Antioxidants modulate rat brain levels of homocysteine and dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S): Implications in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 483, n. 2, p. 123–126, 2010.

TEIPEL, S. J.; CAVEDO, E.; GROTHE, M. J.; LISTA, S.; GALLUZZI, S.; COLLIOT, O.; CHUPIN, M.; BAKARDJIAN, H.; DORMONT, D.; DUBOIS, B.; HAMPEL, H. Predictors of cognitive decline and treatment response in a clinical trial on suspected prodromal Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 108, p. 128–135, 2016.

TEIXEIRA, J. B.; JUNIOR, P. R. B. S.; HIGA, J.; FILHA, M. M. T. Doença de Alzheimer: estudo da mortalidade no Brasil, 2000-2009. **Caderno de Saúde Pública**, v.31, n. 4, p. 1-12, 2015.

VALE, F.; NETO, Y. C. Tratamento da doença de Alzheimer. **Dement Neuropsychol**, v. 5, n. Suppl 1, p. 34–48, 2011.

WAHBA, S. M. R.; DARWISH, A. S.; KAMAL, S. M. Ceria-containing uncoated and coated hydroxyapatite-based galantamine nanocomposites for formidable treatment of Alzheimer's disease in ovariectomized albino-rat model. **Materials Science & Engineering C**, v. 65, p. 151–163, 2016.

WANG, C.; WANG, Z. Y.; XIE, J. W.; WANG, T.; WANG, X.; XU, Y.; CAI, J. H. Dl-3-n-butylphthalide-induced upregulation of antioxidant defense is involved in the enhancement of cross talk between CREB and Nrf2 in an Alzheimer's disease mouse model. **Neurobiology of Aging**, v. 38, p. 32–46, 2016.

YAHIAOUI, S.; HAMIDOUCHE, K.; BALLANDONNE, C.; DAVIS, A.; DE OLIVEIRA SANTOS, J. S.; FRERET, T.; BOULOUARD, M.; ROCHAIS, C.; DALLEMAGNE, P. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of multitarget-directed ligands with both serotonergic subtype 4 receptor (5-HT₄R) partial agonist and 5-HT₆R antagonist activities, as potential treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 121, p. 283-293, 2016.

CAPÍTULO I: Propriedades farmacológicas de alcaloides com perspectivas para o desenvolvimento de fitofármacos para doenças neurodegenerativas

Artigo publicado na revista Current Pharmaceutical Biotechnology

Propriedades farmacológicas de alcaloide como perspectivas para o desenvolvimento de fitofármacos para doenças neurodegenerativas

CHAVES, S. K. M.¹; ARAÚJO, L. S.²; FEITOSA, C.M.¹

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

RESUMO

O estudo das substâncias naturais vem se destacando nos últimos anos na busca por compostos com propriedades farmacológicas que possam ser utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos. Os alcaloides são substâncias advindas de fontes naturais que estão demonstrando atividades farmacológicas promissoras, inclusive para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer, cujo tratamento está baseado na polifarmacoterapia. Dessa forma, o capítulo teve como objetivo a revisão bibliográfica de alcaloides que apresentaram propriedades importantes no tratamento das doenças neurodegenerativas, sendo elas propriedades antioxidante, ansiolítica, anti-inflamatória e antidepressiva. Realizou-se uma revisão de literatura nas bases de dados Pubmed, Science Direct, Scopus, Scielo e Google Academics utilizando as palavras-chaves: alcaloides, farmacologia, doenças neurodegenerativas, anticolinesterásicos, antidepressivos, anti-inflamatórios, antioxidantes e ansiolíticos e foram selecionados artigos, dissertações e teses publicadas entre 2003 e 2015. Vários estudos demonstraram, através de métodos *in vitro*, *in vivo* e/ou *ex vivo* que muitos alcaloides extraídos de plantas apresentaram atividades anticolinesterásica, antioxidante, ansiolítica, anti-inflamatória e antidepressiva, propriedades relevantes no tratamento dos sintomas e da progressão de determinadas patologias, como a Doença de Alzheimer. Em suma, verificou-se que muitos alcaloides exibiram propriedades promissoras no que diz respeito à farmacoterapêutica de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Alcaloides, Doenças de Alzheimer, Farmacologia, Anticolinesterásicos, Antidepressivos, Anti-inflamatórios, Antioxidantes, Ansiolíticos.

ABSTRACT

The study of natural substances has increased in recent years in the search for compounds with pharmacological properties that can be used for the development of new drugs. The alkaloids, substances extracted natural sources, show promising pharmacological activities, including pharmacological activities for the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, whose treatment is based on the use of various drugs. Thus, the article

aims to a technological prospecting of alkaloids that presented important properties in the treatment of neurodegenerative diseases, namely, antioxidant, anxiolytic, anti-inflammatory and antidepressant properties. A literature review was conducted in the databases PubMed, Science Direct, Scopus, Scielo and Google Academics using the following key words: alkaloids, pharmacology, neurodegenerative diseases, cholinesterase inhibitors, antidepressants, anti-inflammatories, antioxidant and anxiolytic. Articles, dissertations and theses published between 2003 and 2015 were selected. Several studies showed through *in vitro*, *in vivo* and/or *ex vivo* methods that many alkaloids extracted from plants showed acetylcholinesterase, antioxidant, anti-anxiety, anti-inflammatory and anti-depressant activities, relevant properties in the treatment of the symptoms and progression of certain diseases, such as Alzheimer's disease. In short, it was found that many alkaloids exhibited promising properties in respect to the pharmacotherapy of neurodegenerative diseases.

Keywords: Alkaloids, Alzheimer's disease, Anticholinesterase, Antidepressants, Anti-inflammatories, Antioxidant, Anxiolytic.

1. Introdução

Os compostos presentes em várias espécies de plantas estão sendo extensamente estudados e avaliados com o propósito de desenvolver e aprimorar medicamentos para a farmacoterapia de várias patologias (BALBINOT; VELASQUEZ; DÜSMAN, 2013).

Dentre as substâncias presentes nas plantas figuram os alcaloides, um grupo heterogêneo de compostos de caráter básico advindos principalmente das plantas. Essas substâncias demonstram inúmeras atividades farmacológicas, como por exemplo, atividade antimicrobiana, antifúngica, anticolinesterásica, antioxidante, dentre outras. Dessa forma, o estudo dos alcaloides torna-se de extrema importância na busca de novos compostos com melhor eficácia e menores efeitos colaterais para as terapias farmacológicas existentes atualmente (LAIA et al., 2013; CUSHNIEA, CUSHNIEB; LAMB, 2014).

A Doença de Alzheimer, uma desordem neurodegenerativa, requer uma terapia baseada na polifarmácia para o tratamento tanto dos transtornos cognitivos como não cognitivos. Além disso, atualmente, existe uma necessidade crescente no aprimoramento da terapia do Mal de Alzheimer, pois as opções terapêuticas têm resultado em modesta melhora da memória e função cognitiva, bem como não previnem o progresso neurodegenerativo. Nesse cenário, a busca por substâncias advindas de fontes naturais vem se tornando uma alternativa interessante para o desenvolvimento de fármacos que possam ser utilizados na terapia (SILVA et al., 2010; LIU et al., 2015).

Este capítulo teve como objetivo a revisão bibliográfica dos alcaloides que demonstraram certas atividades, a saber: anticolinesterásica, antioxidante, ansiolítica, anti-

inflamatória e antidepressiva. O estudo desses compostos naturais mostra-se de grande valia e pesquisas na área são promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou a otimização da terapia atual da DA.

2. Materiais e métodos

Foi realizada uma revisão de literatura através das bases de dados Pubmed, Science Direct, Scopus, Scielo e Google Academics, utilizando as seguintes palavras-chaves: “alcaloides”, “farmacologia”, “doenças neurodegenerativas”, “anticolinesterásicos”, “antidepressivos”, “anti-inflamatórios”, “antioxidantes” e “ansiolíticos”. Foram selecionados artigos, dissertações e teses publicadas no período compreendido entre 2003 e 2015.

3. Resultados e Discussão

Realizou-se uma pesquisa em bases de dados como Scielo, Science Direct, Scopus, Pubmed e Google Academics detectando artigos que descreviam alcaloides com atividade anticolinesterásica, antioxidante, ansiolítica, anti-inflamatória e antidepressiva, atividades importantes no tratamento de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer.

É cada vez mais frequente a busca de novos inibidores da AChE em espécies vegetais (FEITOSA et al., 2011). Estas buscas direcionam-se, principalmente, para plantas já utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de insônia, amnésia, depressão e ansiedade, ou para prolongar a longevidade e melhorar a memória e a função cognitiva. Algumas plantas, como *Centella asiática* L. (Umbeliferae) e *Ginkgo biloba* L. (Coniferae), utilizadas na medicina tradicional indiana e chinesa, demonstraram, em estudos de atividades farmacológicas, resultados relevantes no tratamento de distúrbios cognitivos com ações anticolinesterásica, anti-inflamatória e antioxidante. Em função desses resultados, essas plantas têm sido indicadas para uso terapêutico no tratamento da Doença de Alzheimer (HOUGHTON et al., 2003).

3.1 Alcaloides que apresentam atividade anticolinesterásica

Estudos que buscam extratos, frações e compostos isolados de plantas com atividade contra a enzima acetilcolinesterase e/ou butirilcolinesterase tem se intensificado, atualmente, a fim de encontrar novas substâncias capazes de serem introduzidas na terapêutica de algumas

patologias. (QUEIROZ, NASCIMENTO & SCHWARZ, 2011; MOTA et al., 2012). Essa atividade tem sido atribuída a vários alcaloides advindos das plantas medicinais, podendo ser consideradas promissoras substâncias para a terapia de patologias neurodegenerativas, como a demência senil e Doença de Alzheimer (KONRATH et al., 2013).

Alcaloides isolados da espécie *Corydalis cava* Schweigg. & Kort, a saber, bulbocapnina (**1**), coridalina (**2**) e coridina (**3**) (Figura 1) demonstraram atividade inibitória contra acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, somente contra acetilcolinesterase e somente contra butirilcolinesterase, respectivamente (ADSERSEN et al., 2007). Em um estudo realizado por Rahman e colaboradores (2004), cinco novos alcaloides esteroidais isolados de extrato etanólico de *Sarcococca saligna* (5,14-dehidro-Na-demetilsaracodina, 14-dehidro-Na-demetilsaracodina, 16-dehidrosarcorina, 2,3-dehidrosarsalignona e 14,15-dehidrosarcovagina-D) apresentaram potente ação anticolinesterásica de forma dependente da concentração com valores de CI_{50} que variaram de 12,5 a 32,2 μM ; bem como ação antibutirilcolinesterase.

Através de ensaios *in vitro* pode-se avaliar a atividade inibitória frente à enzima que promove a hidrólise da acetilcolina. O Método de Ellman é um ensaio extensamente utilizado nos estudos que avaliam a presença de atividade anticolinesterásica das substâncias, incluindo os alcaloides de origem natural.

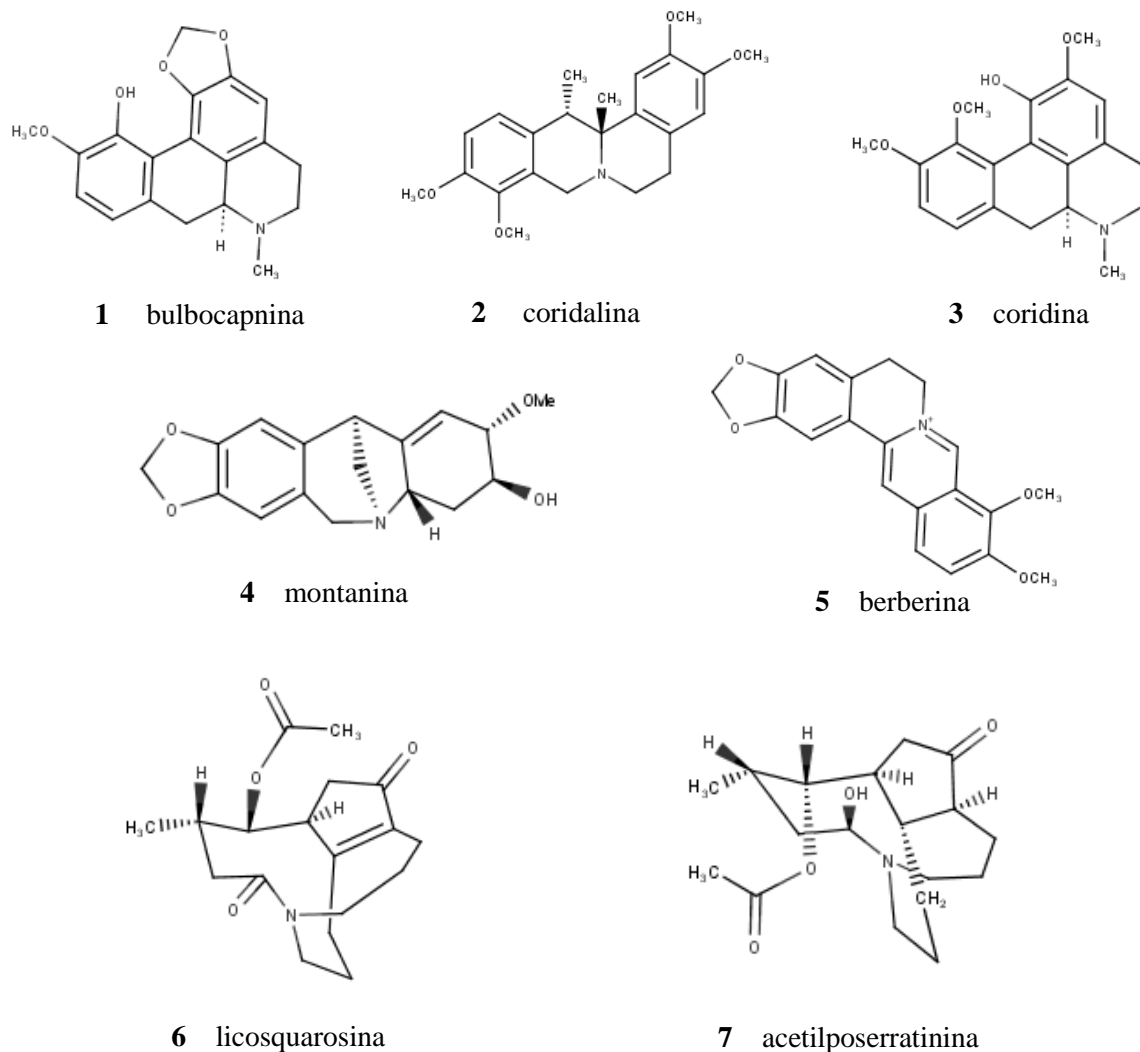
Através desse teste *in vitro*, o alcaloide isoquinolínico montanina (**4**) (Figura 1) demonstrou atividade anticolinesterásica inibindo mais que 50% da atividade da enzima na concentração de 1mmol/L (PAGLIOSA et al., 2010). A berberina (**5**) (Figura 1) isolada das folhas de *Berberis aetnensis* e *B. libanotica* inibiu a ação da acetilcolinesterase no ensaio utilizando o método de Ellman, com valor de CI_{50} de 2,2 $\mu\text{g/mL}$ (BONESI et al., 2013).

Vários alcaloides foram isolados da espécie vietnamita *Huperzia squarrosa*, dentre elas, a licosquarosina (**6**) e a acetilposerratinina (**7**) (Figura 1), que apresentaram atividade anticolinesterásica em ensaios *in vitro* com CI_{50} de 54,3 $\mu\text{g/mL}$ e 15,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, podendo ser consideradas substâncias promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos para patologias envolvendo a redução dos níveis de acetilcolina (CHUONG et al., 2014).

Devido à conhecida atividade anticolinesterásica de huperzina A, um alcaloide produzido pela espécie chinesa *Huperzia serrata*, os alcaloides extraídos de duas espécies brasileiras *H. quadrifariata* e *H. reflexa* com atividade anticolinesterásica *in vitro* descrita na literatura foram testadas em relação à mesma atividade em cérebros de camundongos. Os resultados demonstraram redução da atividade da enzima no córtex e hipocampo, apesar de ter apresentado atividade menor em comparação à huperzina A (KONRATH et al., 2012).

Viera e colaboradores (2008) analisaram as frações alcaloídicas e quatorze alcaloides isolados das raízes de *T. laeta* e *T. hystrix* através do método de Ellman em cromatografia em camada delgada. Verificou-se que os alcaloides heineanina e Nb-metilvoachalotina inibiram seletivamente a butirilcolinesterase e o 19-epi-isovoacristina foi seletivo para a inibição de acetilcolinesterase. As substâncias olivacina, affinisina, ibogamina, affinina, conodurina e histrixnina inibiram ambas as enzimas.

Figura 1 – Alcaloides que apresentam atividade anticolinesterásica.



3.2 Alcaloides que apresentam atividade antioxidante

O estresse oxidativo é um fenômeno que contribui para o desenvolvimento de várias doenças, como as doenças crônicas não transmissíveis, muitas vezes associadas ao envelhecimento. Os radicais livres que não são removidos ou neutralizados podem reagir com

lipídios, proteínas e ácidos nucleicos promovendo dano celular. Altos níveis de metais promovem também um aumento do estresse oxidativo, pois levam a produção de espécies reativas de oxigênio que provocam danos nas funções celulares. Dessa forma, substâncias capazes de combater o estresse oxidativo podem interferir na evolução de determinadas patologias como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, artrite reumatoide, entre outras, e assim contribuir para as suas terapias (FERRARI, 2011; LEAL et al., 2012; TORRÃO et al., 2012; SILVA; HIEDA et al., 2014).

Alguns extratos e alcaloides de *Peschiera affinis* foram testados quanto à ação antioxidante através do método qualitativo em cromatografia em camada delgada (CCD) do β -caroteno e do método do sequestro do radical DPPH. O extrato etanólico das raízes, as frações alcaloídicas e não-alcaloídicas e três alcaloides isolados, a saber, voacristina hidroxindolenina (**8**), voacristina (**9**) e voacangina (**10**) (Figura 2) apresentaram resultado positivo para o primeiro teste. Quando submetidas ao segundo método supracitado observou-se atividade significativa para o extrato etanólico, fração alcaloídica com inibição de 76%, voacangina de 78% e fração não-alcaloídica de 82% todos na concentração de 1 mg/mL, além do alcaloide voacristina hidroxindolenina com inibição de 50% na concentração de 1 mg/mL (SANTOS et al., 2009).

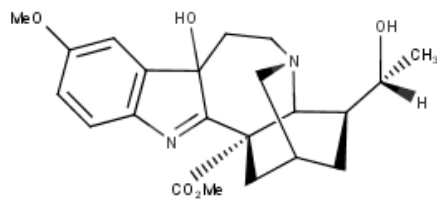
Seis alcaloides isolados de partes aéreas de *Aconitum laeve* foram avaliados com relação às atividades anti-inflamatória, antioxidante e inibição da tirosinase. Desses, duas substâncias, swatinina (**11**) (Figura 2) e delphatina apresentaram efeito antioxidante frente ao ensaio *in vitro* de sequestro de radicais DPPH com CI_{50} de 54,1% e 55,4%, respectivamente, enquanto que o padrão BHA (3-t-butil-4-hidroxianisola) apresentou CI_{50} de 92,1% na concentração de 1 mmol/L (SHAHEEN et al., 2005).

Kolak e colaboradores (2006) pesquisaram a presença de ação antioxidante em alcaloides norditerpenos isolados de raízes de *Delphinium linearilobum* através dos ensaios de sequestro de radicais DPPH e atividade quelante de metal. A linearilobina (**12**) (Figura 2), um novo alcaloide isolado juntamente com os alcaloides conhecidos, licoctonina, 14-acetiltalatzamina, browniina, cammaconina, talatzamina e cochlearenina (**13**) (Figura 2) demonstraram alta atividade no ensaio de sequestro de radicais DPPH enquanto a licoctonina exibiu elevada atividade quelante de metal.

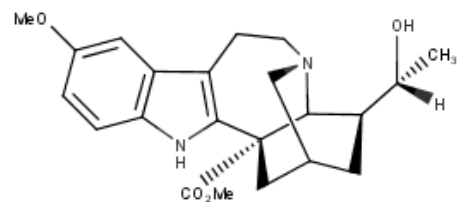
A psicolatina (**14**) (Figura 2) extraída das folhas de *Psychotria umbellata* Vell. (Rubiaceae) foi ensaiada em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* proeficientes e deficientes em defesa antioxidante com exposição a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e paraquat. Além disso, investigou-se a capacidade antioxidante frente ao radical hidroxila pelo ensaio

hipoxantina/xantina oxidase. O alcaloide demonstrou efeito protetor principalmente frente ao paraquat bem como ação antioxidante dose-dependente no ensaio hipoxantina/xantina oxidase, apesar de o extrato bruto ter demonstrado maior efeito protetor em relação às cepas de *S. cerevisiae* expostas a H_2O_2 . A presença de flavonoides no extrato seco da planta pode explicar a maior propriedade antioxidante do extrato em relação ao alcaloide purificado (FRAGOSO et al., 2008).

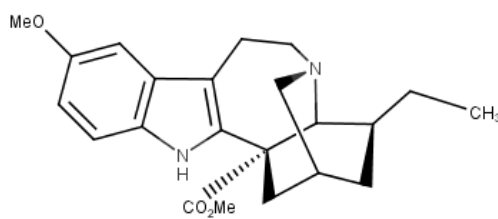
Figura 2 – Alcaloides que demonstraram atividade antioxidante.



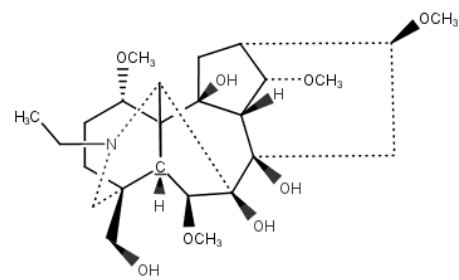
8 voacristina hidroxí-indolenina



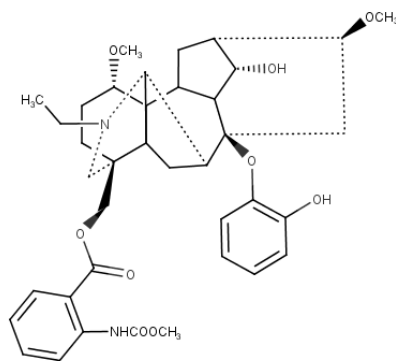
9 voacristina



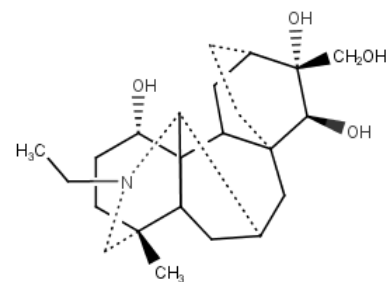
10 voacangina



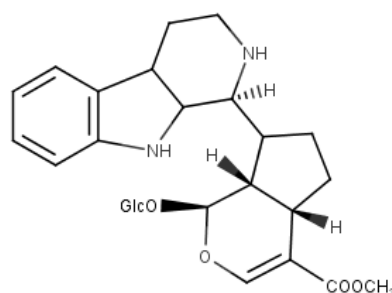
11 swatinina



12 linearilobina



13 cochlearenina



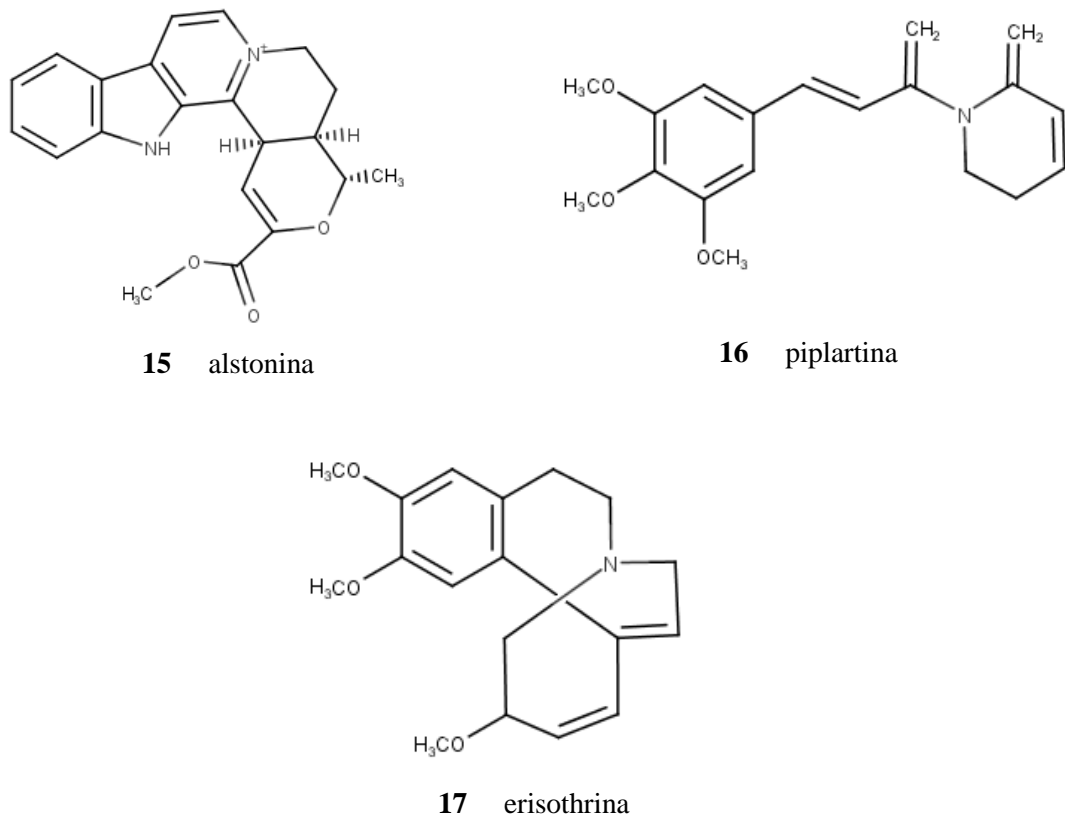
14 psicolatina

3.3 Alcaloides que apresentam atividade ansiolítica

Muitas desordens neurológicas, como as doenças neurodegenerativas, requerem uma combinação medicamentosa para uma terapia mais eficaz. A atividade ansiolítica das drogas pode atuar de forma favorável no combate aos sinais e sintomas de algumas dessas alterações patológicas, como por exemplo, a Doença de Alzheimer (ENGELHARDT et al., 2005).

Atualmente, a pesquisa de substâncias naturais que possam ser utilizadas como fármacos ou modelos químicos de fármacos com atividade ansiolítica está em plena atividade, e os alcaloides são uma classe dessas substâncias que está sendo investigada quanto a esse propósito. Costa-Campos e colaboradores (2004) estudaram o alcaloide alstonina (**15**) (Figura 3) que demonstrou atividade ansiolítica em ensaios comportamentais. O estudo ainda sugeriu o envolvimento dos receptores de serotonina 5-HT_{2A/2C}, pois o pré-tratamento com ritanserina, um antagonista desse tipo de receptor, reverteu os efeitos da alstonina (**15**). Utilizando testes em animais observou-se que a substância montanina (**4**), isolada de *Hippeastrum vittatum*, além da atividade anticolinesterásica avaliada em alguns estudos também apresenta efeito ansiolítico, importante em várias desordens do sistema nervoso central (SILVA et al., 2006).

O alcaloide piplartina (**16**) (Figura 3), extraído das folhas de *Piper tuberculatum* foi avaliado quanto às atividades ansiolítica, sedativa, relaxante muscular e anticonvulsivante a partir da utilização de testes comportamentais. Através do teste em labirinto em cruz elevada realizado com camundongos, a substância demonstrou atividade ansiolítica, aumentando tanto o número de entradas quanto o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos. Além disso, os efeitos foram bloqueados quando da administração prévia de flumazenil, indicando a participação de receptores do tipo benzodiazepínicos (FELIPE et al., 2007). Outro estudo que pesquisou a ação ansiolítica da erisothrina (**17**) (Figura 3), isolado do extrato hidroalcoólico das flores de *Erythrina mulungu*, concluiu que o alcaloide apresentou ação ansiolítica leve induzindo o aumento do número de entradas, mas não o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos diante da realização do teste supracitado (ROSA et al., 2012).

Figura 3 – Alcaloides que demonstraram atividade ansiolítica.

3.4 Alcaloides que apresentam atividade anti-inflamatória

O cérebro de pacientes portadores de Alzheimer passa por importantes modificações que incluem depósitos fibrilares amiloidais, acúmulo de filamentos anormais da proteína tau, perda neuronal e sináptica, ativação da glia e inflamação. O acúmulo de peptídios β amiloides, placas senis e novos neurofibrilares ativam o processo inflamatório e mobilizam macrófagos e outras células do sistema imune com consequente liberação de citocinas, interleucinas, fator de necrose tumoral, neurotransmissores, espécies reativas do oxigênio (ROS) entre outros elementos, de modo progressivo, comprometendo o cérebro e acelerando o curso da doença. Diante do quadro, estudos tem demonstrado que alguns medicamentos anti-inflamatórios tiveram a capacidade de reduzir o risco de desenvolvimento e progressão da Doença de Alzheimer. Dessa forma os anti-inflamatórios poderiam atuar contra processos inflamatórios frequentemente encontrados em portadores da patologia e que também podem promover injúria no tecido cerebral (SERENIKI; VITAL, 2008; CAVALCANTI; ENGELHARDT, 2012).

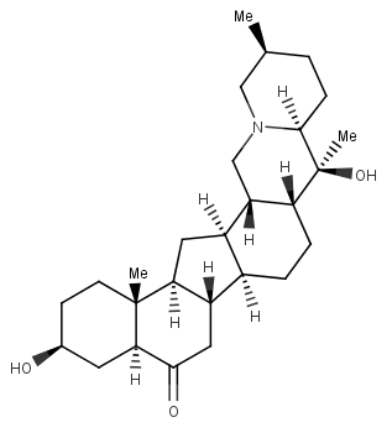
No estudo realizado por Shaheen e colaboradores (2005), os seis alcaloides isolados de *Aconitum laeve* também foram testados em bioensaio *in vitro* (Berridge e colaboradores modificado) para a avaliação da atividade anti-inflamatória. Desses, os compostos, lappaconitina e puberanina apresentaram atividade significativa.

As ações anti-inflamatórias dos alcaloides, imperialina (**18**), chuanbeinona (**19**) (Figura 4), verticinona e verticina foram testadas através da avaliação da formação de edema de orelha, induzida por xileno, em camundongos. Nas doses de 3,0 mg/kg a imperialina (**18**) e a chuanbeinona (**19**) (Figura 4) demonstraram atividade inibitória do edema de orelha maior que a dexametasona. Já os compostos verticinona e verticina não apresentaram ação significativa nesse ensaio. As substâncias na concentração de 1,5 mg/kg não foram capazes de exercer ação inibitória do edema (WANG et al., 2011).

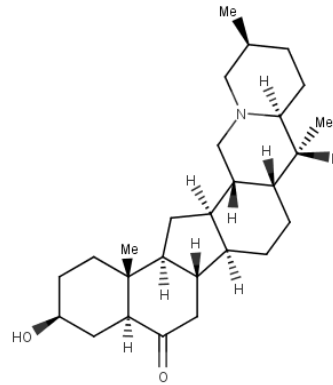
Diversas partes da espécie *Zizyphus numularia* são utilizadas para várias afecções, inclusive para fins anti-inflamatórios. Em um estudo testou-se a atividade anti-inflamatória de alcaloides ciclopeptídicos obtidos de folhas dessa espécie analisando a formação de edema na pata de rato e peritônio de camundongo. Os alcaloides demonstraram ação dose-dependente contra o edema de pata induzindo por carragenina, dextran, serotonina e histamina, além de redução, também dose-dependente, da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos camundongos (GOYAL et al., 2013).

Dentre os seis alcaloides encontrados em bulbos da espécie *Lycoris radiata*, quatro [(+)-1-hidroxi-ungeremina (**20**), (+)-6 β -acetyl-8-hidroxi-9-methoxy-crinamina (**21**), (+)-2-hidroxi-8-demetil-homolicorine- α -N-oxida (**22**), (+)-N-metoxilcarbonil-2 demetil-isocoridiona (**23**)] (Figura 4) demonstraram inibição seletiva *in vitro* contra a enzima COX-2, relacionada à formação de mediadores inflamatórios (LIU et al., 2015). Outros alcaloides do tipo pirroloquinazolínicos extraídos de *Adhatoda vasica* Nees foram avaliados frente a indução do edema de pata. Desses, a vasicina (**24**) (Figura 4) demonstrou efeito anti-inflamatório mais potente (59,51%) a 20,0 mg/kg após administração de carragena. A máxima inibição encontrada, 63,94%, foi atribuída ao alcaloide vasicinona (**25**) (Figura 4) na dose de 10,0 mg/kg após administração de Adjuvante Completo de Freud (ACF) (SINGH; SHARMAB, 2013).

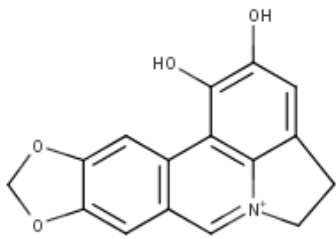
Figura 4 – Alcaloides que demonstraram atividade anti-inflamatória.



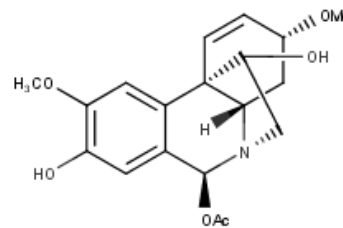
18 imperialina



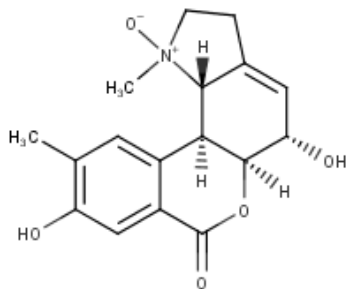
19 chuanbeinona



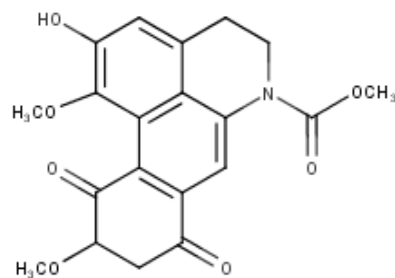
20 (+)-1-hidroxi-ungeremina



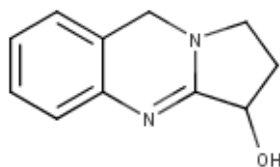
21 (+)-6β-acetil-8-hidroxi-9-metoxi-crinamina



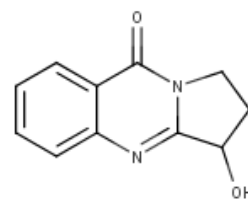
22 (+)-2-hidroxi-8-demetil-homolicorine-α-N-oxida



23 (+)-N-metoxilcarbonil-2 demetil-isocoridiona



24 vasicina



25 vasicinona

3.5 Alcaloides que apresentam atividade antidepressiva

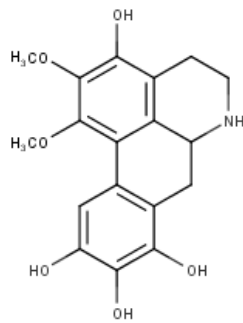
Além do tratamento da depressão propriamente dita, os antidepressivos podem fazer parte da farmacoterapia de outras doenças, como as desordens neurodegenerativas. O tratamento da DA, por exemplo, envolve também a terapia das manifestações não cognitivas como a psicose, agitação psicomotora, distúrbios do sono e a depressão. Dessa forma, a pesquisa de compostos capazes de desempenhar ação antidepressiva pode contribuir para a terapia farmacológica da DA (ENGELHARDT et al., 2005; FORLENZA, 2005).

No estudo de Silva e colaboradores (2006), o alcaloide montanina (**4**) (Figura 1) também foi avaliado para a atividade antidepressiva pelo ensaio comportamental do nado forçado. A administração de montanina (**4**) (Figura 1) previamente ao teste reduziu o tempo total de imobilidade e reforçou o comportamento de luta, o que sugeriu um efeito antidepressivo da substância. Utilizando o mesmo teste, Felipe e colaboradores (2007) investigaram a ação antidepressiva da piplartina (**16**) (Figura 3) e observaram uma significativa redução, de forma dose-dependente, do tempo de imobilidade dos animais, com um decréscimo de 41% e 75% nas doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente.

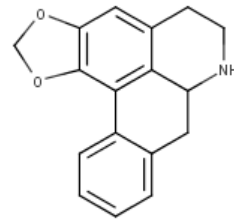
Os alcaloides diterpenos, a saber: mesaconitina, hipaconitina, napellina, songorina, 12-epinapellina e N-oxida, obtidos da espécie *Aconitum baicalense* foram estudados em ensaio comportamental (teste de suspensão da cauda) para avaliação do efeito antidepressivo. A songorina produziu o efeito antidepressivo mais pronunciado, seguida de mesacotinina, hipacotinina e napellina (NESTEROVA et al., 2011).

A análise do extrato alcaloídico das partes aéreas de *Annona cherimolia* demonstrou que o tratamento repetido com o extrato produziu efeitos do tipo antidepressivo em camundongos, além de facilitar o efeito da imipramina e clomipramina, conhecidos fármacos antidepressivos. Os principais constituintes do extrato em estudo compreendem os alcaloides, 1,2-dimethoxi-5,6,6a,7-tetrahidro-4H-dibenzoquinolina-3,8,9,10-tetraol (**26**); anonaina (**27**), lirioidenina (**28**) e nornuciferina (**29**) (Figura 5) (MARTÍNEZ-VÁZQUEZA et al., 2012).

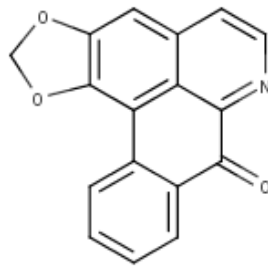
Figura 5 – Alcaloides que demonstraram atividade antidepressiva.



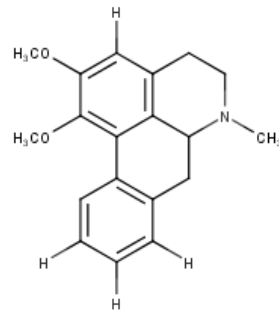
26 1,2-dimethoxi-5,6,6a,7-tetrahidro-4H-dibenzoquinolina-3,8,9,10-tetraol



27 anonaina



28 liriodenina



29 nornuciferina

4. Conclusão

Portanto, observa-se que vários alcaloides obtidos de fontes naturais desempenham importantes atividades farmacológicas, dentre elas, atividade anticolinesterásica, antioxidante e antidepressiva, que podem ser úteis na farmacoterapia de determinadas doenças, como o próprio Mal de Alzheimer. O estudo desses compostos naturais mostra-se de grande valia e pesquisas na área são importantes para o desenvolvimento de novos fármacos para a otimização de terapias atuais.

REFERÊNCIAS

- ADSERSEN, A.; KJØLBYE, A.; DALL, O.; JÄGER, A. K. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 179–182, 2007.
- BALBINOT, S.; VELASQUEZ, P.G.; DÜSMAN, E. Reconhecimento e uso de plantas medicinais pelos idosos do Município de Marmeleiro – Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 632-638, 2013.
- BONESI, M.; LOIZZO, M.R.; CONFORT, F.; PASSALACQUAB. N.G.; SAABC, A.; MENICHINI, F.; TUNDIS, R. *Berberis aetnensis* and *B. libanotica*: a comparative study on the chemical composition, inhibitory effect on key enzymes linked to Alzheimer’s disease and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy And Pharmacology**, v. 65, n. 12, p. 1726–1735, 2013.
- CAVALCANTI, J. L. S.; ENGELHARDT, E. Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 48, n. 4, p. 21-29, 2012.
- CHUONG, N. N.; HUONG, N. T. T.; HUNG, T. M.; LUAN, T. C. Anti-Cholinesterase Activity of Lycopodium Alkaloids from Vietnamese *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 19172-19179, 2014.
- CUSHNIEA, T. P. T.; CUSHNIEB, B.; LAMB, A. J. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 5, p. 377–386, 2014.
- COSTA-CAMPOS, L.; DASSOLER, S. C.; RIGOB, A. P.; IWU, M.; ELISABETSKY, E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 77, n. 3, p. 481–489, 2004.
- ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.; VALE, F. A. C. Tratamento da Doença de Alzheimer: Recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 1104-1112, 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, n. 3, p. 783-789, 2011.
- FELIPE, F. C. B.; FILHO, J. T. S.; SOUZA, L. E. O.; SILVEIRA, J. Á.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; VIANA, G. S. B. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, v. 14, n. 9, p. 605–612, 2007.
- FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, n. 3, p. 137-148, 2005.

FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N. C.; MOURA, D. J.; SILVA, A. C. R.; RICHTER, M. F.; SAFFI, J.; FETT-NETO, A. G. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 559–566, 2008.

GOYAL, M.; GHOSH, M.; NAGORI, B. P.; SASMAL, D. Analgesic and anti-inflammatory studies of cyclopeptide alkaloid fraction of leaves of *Zizyphus nummularia*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 4, p. 365–371, 2013.

HIEDA, Y.; ANRAKU, M.; CHOSHI, T.; TOMIDA, H.; FUJIOKA, H.; HATAE, N.; HORI, O.; HIROSE, J.; HIBINO, S. Antioxidant effects of the highly-substituted carbazole alkaloids and their related carbazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 15, p. 3530–3533, 2014.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J. R. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 513-527, 2003.

LAIA, D.; YANGA, Z.; XUEB, W.; SHENGA, J.; SHIC, Y.; YAO, X. Isolation, characterization and acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids from roots of *Stemona sessilifolia*. **Fitoterapia**, v. 89, n. 1, p. 257–264, 2013.

LEAL, M. F. C.; CATARINO, R. I. L.; PIMENTA, A. M.; SOUTO, M. R.; PINHEIRO, T. S. N. Especificação de cobre e zinco em urina – importância dos metais em doenças neurodegenerativas. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 1985-1990, 2012.

LIU, Z. M.; HUANG, X. Y.; CUI, M. R.; ZHANG, X.; ZHAO, C.; YANG, B. S.; ZHAO, X. K. Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata* with cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Fitoterapia**, v. 101, n. 1, p. 188–193, 2015.

LIU, Q.; QIANG, X.; LI, Y.; SANG, Z.; LI, Y.; TAN, Z.; DENG, Y. Design, synthesis and evaluation of chromone-2-carboxamido-alkylbenzylamines as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 911–923, 2015.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZA M, ESTRADA-REYES R, ESCALONA AGA, VELÁZQUEZ IL, MARTÍNEZ-MOTA L, MORENO J, HEINZE G. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 164–170, 2012.

MOTA, W. M.; BARROS, M. L.; CUNHA, P. E. L.; SANTANA, M. V. A.; STEVAM, C. S.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 4, p. 624-628, 2012.

NESTEROVA, Y. V.; POVETIEVA, T. N.; SUSLOV, N. I.; SEMENOV, A. A.; PUSHKARSKIY, S. V. Antidepressant Activity of Diterpene Alkaloids of *Aconitum baicalense* Turcz. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 151, n. 4, p. 425-428, 2011.

KOLAK, U.; ÖZTÜRK, M.; ÖZGÖKÇE, F.; ULUBELEN, A. Norditerpene alkaloids from *Delphinium linearilobum* and antioxidant activity. **Phytochemistry**, v. 67, n. 19, p. 2170–2175, 2006.

KONRATH, E. L.; NEVES, B. M.; PASSOS, C. S.; LUNARDI, P. S.; ORTEGA, M. G.; CABRERA, J. L.; GONÇALVES, C. A.; HENRIQUES, A. T. *Huperzia quadrifariata* and *Huperzia reflexa* alkaloids inhibit acetylcholinesterase activity *in vivo* in mice brain. **Phytomedicine**, v. 19, n. 14, p. 1321–1324, 2012.

KONRATH, E. L.; PASSOS, C. S.; KLEIN-JUNIOR, L. C.; HENRIQUES, A. T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 12, p. 1701–1725, 2013.

PAGLIOSA, L. B.; MONTEIRO SC, SILVA KB, ANDRADE JP, DUTILH J, BATISDA J, CAMMAROTA M, ZUANAZZI JAS. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8, p. 698-701, 2010.

QUEIROZ, F. M.; NASCIMENTO, M. A.; SCHWARZ, A. Estudo preliminar *in vitro* da atividade antiacetilcolinesterásica de extratos etanólicos de plantas: possíveis alternativas no tratamento da Doença de Alzheimer. **Revista de Biologia**, v. 6, n. 1, 2011.

RAHMAN, A.; FERROZ, F.; NAEEM, I.; HAGA, Z.; NAWAZ, S. A.; KHANC, N.; KHAN, M. R.; CHOUDHARY, M. I. New pregnane-type steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna* and their cholinesterase inhibitory activity. **Steroids**, v. 69, n. 11, p. 735–741, 2004.

ROSA, D. S.; FAGGION, S. A.; GAVIN, A. S.; SOUZA, M. A.; FACHIM, H. A.; SANTOS, W. F.; PEREIRA, M. A. S.; CUNHA, A. O. S.; BELEBONI, R. O. Erysothrine, an alkaloid extracted from flowers of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth: Evaluating its anticonvulsant and anxiolytic potential. **Epilepsy & Behavior**, v. 23, n. 3, p. 205–212, 2012.

SANTOS, A. K. L.; MAGALHÃES, T. S.; MONTE, F. J. Q.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; ALMEIDA, M. M. B.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R. Alcaloides iboga de *Peschiera affinis* (*Apocynaceae*) – atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1834-1838, 2009.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 1, 2008.

SHAHEEN, F.; AHMAD, M.; KHAN, M. T. H.; JALIL, S.; EJAZ, A.; SULTANKHODJAEV, M. N.; ARFAN, M.; CHOUDHARY, M. I.; RAHMAN, A. Alkaloids of *Aconitum laeve* and their anti-inflammatory, antioxidant and tyrosinase inhibition activities. **Phytochemistry**, v. 66, n. 8, p. 935–940, 2005.

SILVA, A. F. S.; ANDRADE, J. P.; BEVILAQUA, R. M.; SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, I.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI JAS. Anxiolytic, antidepressant and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 1, p. 148–154, 2006.

SILVA, D. H. S.; VIEGAS, J. R. C.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Espectralina, Cassina e Análogos Semissintéticos como Potenciais Candidatos a Fármacos para o Tratamento da Doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 38-46, 2010.

SINGH, B.; SHARMAB, R. A. Anti-inflammatory and antimicrobial properties of pyrroloquinazoline alkaloids from *Adhatoda vasica* Nees. **Phytomedicine**, v. 20, n. 50, p. 441–445, 2013.

TORRÃO, A. S.; CAFÉ-MENDES, C. C.; REAL, C. C.; HERNANDES, M. S.; FERREIRA, A. F. B.; SANTOS, T. O.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; MAZUCANTI, C. H. Y.; FERRO, E. S.; CRISTOFORO, S.; BRITTO, L. R. G. Abordagens diferentes, um único objetivo: compreender os mecanismos celulares das doenças de Parkinson e de Alzheimer. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 2, p. 194-218, 2012.

VIERA, I. J. C.; MEDEIROS, W. L. B.; MONNERAT, C. S.; SOUZA, J. J.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; PINTO, A. C.; SOUSA, P. M.; REZENDE, C. M.; EPIFANIO, R. A. Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 3, 2008.

WANG, D.; ZHU, J.; WANG, S.; WANG, X.; OU, Y.; WEI, D.; LI, X. Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from Bulbus *Fritillariae Cirrhosae*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1290–1294, 2011.

**CAPÍTULO II: Atividades farmacológicas do alcaloide palmatina composto isolado de
Guatteria friesiana - perspectivas para elaboração de novos fármacos.**

Artigo submetido a revista Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences

Atividades farmacológicas do alcaloide palmatina composto isolado de *Guatteria friesiana* - perspectivas para elaboração de novos fármacos.

CHAVES, S. K. M.¹; FEITOSA, C.M.¹

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

RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas há milhares de anos para o tratamento de inúmeras enfermidades tornando-se uma importante fonte na busca por novos fármacos. Dentre as substâncias, advindas de fontes naturais, a palmatina, um alcaloide protoberberínico vem sendo investigado no que diz respeito às suas ações farmacológicas e tem demonstrado atividades promissoras para a terapêutica de várias doenças destacando-se a Doença de Alzheimer (DA). O objetivo desta pesquisa foi verificar o estado da arte e da técnica sobre a palmatina com ênfase em suas atividades farmacológicas *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* o que a torna promissora na elaboração de novos medicamentos, principalmente para o tratamento da DA. Foram encontrados 164 estudos utilizando as palavras-chaves “palmatina”, “palmatine”, “atividade palmatina” e “activity palmatine”. Não foram observados depósitos de patentes. A palmatina demonstrou atividades farmacológicas promissoras, incluindo: anti-inflamatória, antidepressiva, antipirética, dentre outras. Dessa forma, observou-se que o alcaloide demonstrou algumas ações farmacológicas relevantes, inclusive relacionadas à terapia de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Palmatina. Atividades. Farmacologia.

ABSTRACT

Medicinal plants have been used for thousands of years for the treatment of numerous diseases becoming an important source in the search for new drugs. Among the substances, palmatine, arising from natural sources, an alkaloid has been investigated with regard to their pharmacological actions and has demonstrated promising activity for the treatment of various diseases highlighting Alzheimer's disease (AD). The aim of this study was to verify the state of the art and technique on palmatine with emphasis on their pharmacological activity *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* which makes it promising in developing new drugs, primarily for the treatment of AD. 164 studies were found using the keywords "palmatine", "palmatine", "palmatine activity" and "activity palmatine". Patent deposit was not observed. The palmatine shown promising pharmacological activities, including: anti-inflammatory, anti-depressive, anti-pyretic, among others. Thus, it was observed that the alkaloid demonstrated some important pharmacological actions, including related to the therapy of neurodegenerative diseases.

Keywords: Palmatine. Activities. Pharmacology.

1. Introdução

As plantas medicinais têm sido utilizadas desde o início da civilização para fins terapêuticos. As primeiras civilizações já perceberam que algumas plantas continham princípios ativos que poderiam ser utilizados para o tratamento de enfermidades. Dessa forma, a natureza tornou-se uma fonte promissora de novas substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (TREVISAN; MACEDO, 2003; BADKE et al., 2011; MARQUES et al., 2013).

Dentre as substâncias encontradas em fontes naturais pode-se destacar a palmatina, um alcaloide protoberberínico e um dos principais componentes de preparações de plantas medicinais utilizadas principalmente na medicina tradicional chinesa, coreana e indiana. A palmatina pode ser encontrada em várias espécies medicinais, como *Coptis chinensis*, *Rhizoma coptidis*, *Corydalis yanhusuo*, *Radix tinosporae*, entre outras (LEE et al., 2015; VRBA et al., 2014).

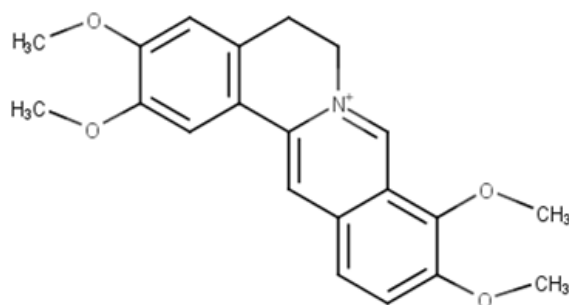
Costa (2009) isolou a palmatina (Figura 1) da espécie vegetal *Guatteria friesiana*. Essa espécie é uma pequena árvore conhecida como “envireira” ou “envira” encontrada na bacia amazônica brasileira e colombiana e utilizada na medicina tradicional para várias finalidades. Estudos realizados com extratos, frações, óleos essenciais e compostos isolados de *Guatteria friesiana* evidenciaram a presença de atividades como ação antitumoral, antimicrobiana e ação larvicida contra a larva de *Aedes aegypti* (COSTA et al., 2008; ACIOLE et al., 2011; COSTA et al., 2012; COSTA et al., 2013).

A palmatina tem apresentado determinadas atividades farmacológicas que podem estar relacionadas, por exemplo, à sua habilidade de interagir com proteínas e ácidos nucleicos, sendo algumas delas importantes na terapêutica das doenças neurodegenerativas (DUMONT; MONARI, 2015; VRBA et al., 2015).

As doenças neurodegenerativas afetam atualmente milhões de pessoas e a incidência de novos casos está relacionado principalmente com o aumento do envelhecimento da população (FAROOQUI; FAROOQUI, 2009; ANDERKOVA; REKTOROVA, 2014). Segundo os estudos de Dorsey e colaboradores (2013), o número de pessoas afetadas pelas principais doenças neurodegenerativas terá um aumento de 50% até 2030. A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa com manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas que desencadeia uma deficiência progressiva, tanto na memória como em outras funções cognitivas (MARTELLI; MARTELLI, 2014; SERENIKI; VITAL, 2008). A DA representa um importante problema de saúde pública, principalmente em países onde há

um aumento da expectativa de vida, além de afetar funcional e socialmente a família e a sociedade (TRENTINI; GONÇALVES, 2009; FORLENZA, 2005).

Figura 1 – Estrutura molecular do alcaloide palmatina



Vários estudos estão sendo realizados para avaliar as atividades farmacológicas associadas à palmatina, desde ensaios *in vitro* até ensaios *in vivo* e *ex vivo*. Dessa forma o objetivo desta revisão foi verificar o estado da arte e da técnica da palmatina com ênfase em suas atividades farmacológicas avaliadas *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*.

2. Materiais e métodos

Foi realizado um levantamento bibliográfico acerca da palmatina através das bases de dados Science Direct, Pubmed, LILACS, MEDLINE, Portal da Capes, Web of Science, Scopus e Scielo. As palavras-chaves utilizadas foram: “palmatina”, “palmatine”, “atividade palmatina” e “activity palmatine”. Foram selecionados artigos publicados no período compreendido entre 1993 a 2015. A seleção dos estudos foi baseada na análise dos títulos e resumos. Foi realizada ainda uma prospecção tecnológica nos pedidos de patentes depositados no *European Patent Office* (EPO), *Google patents*, Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e *World Intellectual Property Organization* (WIPO). O período e os termos de busca foram os mesmos utilizados para as bases científicas.

3. Resultados e Discussão

A busca em bases científicas utilizando a palavra-chave “palmatine” resultou na obtenção de 164 estudos, enquanto que nenhum estudo foi encontrado utilizando o termo “palmatina”. Para o termo “atividade palmatina” não foram encontrados estudos nas bases científicas e com relação à palavra-chave “activity palmatine” foram observados 51 estudos como demonstra a Tabela 1. Após análise de títulos e resumos e eliminação dos artigos repetidos foram selecionados 18 estudos que tratavam diretamente da pesquisa de atividades farmacológicas da palmatina. Não foram observados depósitos de pedidos de patentes nas bases selecionadas. Das pesquisas encontradas foram selecionadas aquelas que avaliaram de forma direta a atividade do alcaloide *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*.

Tabela 1 - Quantificação das publicações acerca do alcaloide palmatina encontradas em base de dados científicas para cada descritor de busca.

Bases de dados	Palavras-chave			
	Palmatine	Palmatina	Atividade palmatina	Activity palmatine
LILACS	0	0	0	0
MEDLINE	7	0	0	3
Portal da Capes	108	0	0	42
PubMed	0	0	0	0
SciELO	2	0	0	0
Science Direct	23	0	0	3
Scopus	7	0	0	0
Web of Science	17	0	0	3
Total de publicações	164	0	0	51

3.1 Atividades farmacológicas em ensaios *in vitro*

Existem diversos tipos e metodologias de ensaios *in vitro* para comprovar ou refutar ações farmacológicas. Determinados ensaios *in vitro* foram realizados com a palmatina e algumas atividades foram atribuídas à substância a partir desses testes (Tabela 2).

Nos testes *in vitro* que avaliam a capacidade da substância de inibir a enzima acetilcolinesterase, uma das vertentes para o tratamento da Doença de Alzheimer, Mak e colaboradores (2014) mostraram que a combinação de palmatina e berberina resultou em inibição sinérgica *in vitro* da AChE recombinante humana, sendo a associação uma potencial estratégia terapêutica (MAK et al., 2014). Além disso, foi observada a capacidade sequestrante de radicais ONOO⁻ da palmatina, ou seja a capacidade antioxidante, com valor de CI₅₀ de 28,70 µM. (JUNG et al., 2009).

A palmatina também tem demonstrando outras ações farmacológicas como a inibição seletiva de células do câncer de próstata e atividade citostática seletiva contra linhagens de células cancerígenas na mama (MCF-7) e células de glioma (U251) (HAMBRIGHT et al., 2014; COSTA et al., 2013). Li e colaboradores (2015) sugeriram que alguns alcaloides, dentre eles a palmatina, seriam os responsáveis pela notável atividade anti-inflamatória de *Rhizoma coptidis*.

Tabela 2. Resumo dos estudos das atividades *in vitro* da palmatina

Espécie	Parte da planta	Tipo de extrato/fração	Objetivo do estudo	Resultados	Referência
-	-	-	Investigar o efeito da palmatina sobre a força isométrica em tiras isoladas de artérias de ratos	A palmatina relaxou de forma dose-dependente a resposta contrátil induzida por fenilefrina	(CHANG et al., 1999)
-	-	-	Observar a ação da palmatina sobre a secreção colônica de cloro (Cl ⁻) em mucosa colônica de ratos	A substância inibiu a secreção de Cl ⁻ ativada por Ca ²⁺ e AMP _C	(WU et al., 2008)
<i>Enantia chlorantha</i>	Casca	Extrato metanólico	Estudar a atividade do alcaloide frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania infantum</i>	O composto exibiu atividade inibitória significativa contra ambos os parasitos	(NKWENGOUA et al., 2009)
<i>Coptis chinensis</i>	-	-	Avaliar o efeito da palmatina frente à protease NS2B-NS3 do vírus do Nilo ocidental	O alcaloide foi capaz de inibir a atividade da protease sem citotoxicidade detectável	(JIA et al., 2010)

Legenda: (-) não informado no estudo

Tabela 2. cont.– Resumo dos estudos das atividades *in vitro* da palmatina

Espécie	Parte da planta	Tipo de extrato/fração	Objetivo do estudo	Resultados	Referência
<i>Coptis chinensis</i>	-	-	Estudar o efeito da palmatina sobre a diferenciação de osteoblastos	A palmatina apresentou efeito inibitório na diferenciação e função de osteoblastos	(LEE et al., 2010a)
<i>Coptis chinensis</i>	Rizoma	Extrato metanólico (fração n-butanoica)	Investigar o efeito de alcaloides isolados na diferenciação de adipócitos através da mensuração do acúmulo de lipídios e determinar os níveis de expressão de genes marcadores de adipócitos	Os alcaloides, incluindo a palmatina, inibiram o acúmulo de lipídios nas células e reduziram os níveis de expressão de vários genes marcadores de adipócitos	(CHOI et al., 2014)

Legenda: (-) não informado no estudo

3.2 Atividades farmacológicas em ensaios *in vivo* e *ex vivo*

Ensaios *in vivo* e *ex vivo* são extensamente utilizados para a elucidação de ações farmacológicas de inúmeros compostos. Assim como nos testes *in vitro*, determinadas atividades *in vivo* e *ex vivo* da palmatina já foram comprovadas na literatura (Tabela 3).

Ning e colaboradores (2015) avaliaram o efeito da palmatina, isolada de *Coptis chinensis* em hamsters alimentados com dieta rica em gordura. Observou-se que o composto reduziu o nível de colesterol total sérico (CT), triglicérides (TG) e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), bem como aumentou a excreção de CT e de ácidos biliares totais nos animais. Em outro estudo evidenciou-se que o alcaloide apresentava efeito sobre a atividade motora e a concentração de monoaminas em regiões do cérebro de ratos. A substância elevou a hipomotilidade induzida por α -metil-*p*-tirosina, reserpina e 5-hidroxitriptofano e reduziu a hiperomotilidade causada por L-DOPA com benserazida e *p*-clorofenilalanina. A concentração de dopamina e ácido homovanílico foi significativamente reduzida no córtex. Em contrapartida os níveis de 5-HT no córtex e ácido 5-hidroxi-indol acético elevaram-se (HSIEH, et al., 1993).

Com relação à Doença de Alzheimer, alguns ensaios comportamentais e testes *ex vivo* também são adequados para avaliar a potencial utilização desses compostos no tratamento da doença. A palmatina nas doses 0,5 e 1mg/kg, via intraperitoneal, foi avaliada através do ensaio labirinto de Morris e constatou-se, que a substância melhorou significativamente o aprendizado e a memória de camundongos. Além disso, a substância reverteu a amnésia provocada por escopolamina e diazepam. Nos testes *ex vivo* constatou-se redução da atividade da acetilcolinesterase no cérebro dos animais (DHINGRA; KUMAR, 2012).

Dhingra e Bhanker (2014) demonstraram a capacidade do alcaloide em reduzir o período de imobilidade de camundongos, submetidos e não submetidos a estresse leve imprevisível, nos testes de nado forçado e de suspensão da cauda, deduzindo-se um efeito do tipo antidepressivo da substância. O composto ainda reverteu significativamente o aumento dos níveis cerebrais de catalase, da peroxidação lipídica, do nitrito plasmático e de corticoides, induzidos por estresse.

Tabela 3 - Resumo dos estudos das atividades *in vivo* e *ex vivo* da palmatina.

Espécie	Parte da planta	Tipo de extrato/fração	Objetivo do estudo	Resultados	Referências
<i>Berberis</i> spp.	Raiz	Fração alcaloide	Estudar os efeitos de vários alcaloides, dentre eles a palmatina, em modelos <i>in vivo</i>	A palmatina apresentou atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antipirética para determinadas vias de administração	(KÜPELI et al., 2002)
<i>Coptis chinensis</i>	-	-	Avaliar a atividade citoprotetora do composto na insuficiência hepática fulminante induzida por d-galactosamina (GalN) / lipopolissacarídeo (LPS)	O alcaloide aliviou a lesão hepática induzida por GalN/LPS através da modulação da resposta de citocinas e inibição da apoptose	(LEE et al., 2010b)

Legenda: (-) não informado no estudo

4. Conclusão

Através da prospecção observou-se que estudos acerca das atividades farmacológicas e biológicas da palmatina estão sendo realizados desde o ano de 1993. Durante esse período, já foram comprovadas algumas atividades importantes incluindo ação anti-inflamatória, antiparasitária, antipirética, entre outras. No entanto, ainda existe um campo para a realização de novas pesquisas com a substância, que pode ser considerada promissora para a utilização em terapias diversas.

REFERÊNCIAS

- ACIOLE, S. D. G. et al. 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.
- ANDERKOVA, L.; REKTOROVA, I. Cognitive effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with neurodegenerative diseases - Clinician's perspective. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 339, n. 1–2, p. 15–25, 2014.
- BADKE, M. R., BUDÓ, M. L. D., SILVA, F. M., RESSEL, L. B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular, **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 132–139, 2011.
- BRITTO, A C. et al. In Vitro and In Vivo Antitumor Effects of the Essential Oil from the Leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta medica**, p. 409–414, 2012.
- CHANG, Y.; USAMI, S.; HSIEH, M.; JIANG, M. J. Effects of palmatine on isometric force and intracellular calcium levels of arterial smooth muscle. **Life Science**, v. 64, n. 8, p. 597–606, 1999.
- CHOI, J. S. et al. Coptis chinensis alkaloids exert anti-adipogenic activity on 3T3-L1 adipocytes by downregulating C/EBP- α and PPAR- γ . **Fitoterapia**, v. 98, p. 199–208, 2014.
- COSTA, E. V. et al. Aporphine and tetrahydroprotoberberine alkaloids from the leaves of *guatteria friesiana* (annonaceae) and their cytotoxic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 5, p. 788–796, 2013.
- COSTA, E. V. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteria* species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1895–1899, 2008.
- DHINGRA, D.; BHANKHER, A. Behavioral and biochemical evidences for antidepressant-like activity of palmatine in mice subjected to chronic unpredictable mild stress. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2014.
- DHINGRA, D.; KUMAR, V. Memory-enhancing activity of palmatine in mice using elevated plus maze and Morris water maze. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2012, 2012.
- DUMONT, É.; MONARI, A. Interaction of Palmatine with DNA: An Environmentally Controlled Phototherapy Drug. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 2, p. 410–419, 2015.
- FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A. Aging: An important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. 4, p. 203–215, 2009.
- FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, n. 3, p. 137–148, 2005.
- HAMBRIGHT, H. G. et al. Palmatine inhibits growth and invasion in prostate cancer cell: Potential role for pS6/NF- κ B/FLIP. **Molecular Carcinogenesis**, n. February, p. 1–8, 2014.
- HSIEH, M. T. et al. Effects of *Hemerocallis flava* on motor activity and the concentration of central monoamines and its metabolites in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, n. 2, p. 71–76, 1993.

- JIA, F. et al. Identification of palmatine as an inhibitor of West Nile virus. **Archives of Virology**, v. 155, n. 8, p. 1325–1329, 2010.
- JUNG, H. A. et al. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 32, n. 8, p. 1433–1438, 2009.
- KÜPELI, E. et al. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. **Life Sciences**, v. 72, n. 6, p. 645–657, 2002.
- LEE, J.-W. et al. Palmatine attenuates osteoclast differentiation and function through inhibition of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression in osteoblast cells. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 10, p. 1733–1739, 2010.
- LEE, S. et al. Theriogenology Sequential treatment with resveratrol-trolox improves development of porcine embryos derived from parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 84, n. 1, p. 145–154, 2015.
- LI, J. et al. Seasonal Variation of Alkaloid Contents and Anti-Inflammatory Activity of *Rhizoma coptidis* Based on Fingerprints Combined with Chemometrics Methods. p. 1131–1139, 2015.
- MAK, S. et al. Synergistic Inhibition on Acetylcholinesterase by the Combination of Berberine and Palmatine Originally Isolated from Chinese Medicinal Herbs. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 53, n. 3, p. 511–516, 2014.
- MARQUES, T. H. C., SANTOS, P. S., FREITAS, R. M. Atividade anticolinesterásica e perfil químico de uma fração cromatográfica ativa do extrato etanólico das flores *Bellis perennis* L. (Asteraceae), **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 549–553, 2013.
- MARTELLI, A.; PALERMO, F. Alterações Cerebrais e Análise Histopatológica dos Emaranhados Neurofibrilares na Doença de Alzheimer. **UNICIÊNCIAS** v. 18, n. 1, p. 45-50, 2014.
- NING, N. et al. Hypolipidemic Effect and Mechanism of Palmatine from *Coptis chinensis* in Hamsters Fed High-Fat diet. **Phytotherapy Research**, v. 673, p. 668–673, 2015.
- NKWENGOUA, E. T., NGANTCHOU, I., NYASSE, B., DENIER, C., BLONSKI, C., SCHNEIDER, B. In vitro inhibitory effects of palmatine from *Enantia chlorantha* on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. **Natural Product Research**, v. 23, v. 12, p. 1144-1150, 2009.
- PINHEIRO, B. et al. First report of alkaloids in the genus *Guatteriaopsis* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 43–45, 2009.
- RAY DORSEY, E. et al. The coming crisis: Obtaining care for the growing burden of neurodegenerative conditions. **Neurology**, v. 80, n. 21, p. 1989–1996, 2013.
- SERENIKI, A; VITAL, M. A B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria**, v. 30, n. 1, p. 0–0, 2008.
- TREVISAN, S.; MACEDO, V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterásica para a doença de Alzheimer. **Química nova**, v. 26, n. 3, p. 301–304, 2003.
- TRENTINI, C. M.; GONÇALVES, M. T. A. Os métodos de investigação na pesquisa junto a cuidadores de idosos com a doença de Alzheimer. **Psico**, v. 40, n. 3, p. 308–318, 2009.

VRBA, J. et al. Palmatine activates AhR and upregulates CYP1A activity in HepG2 cells but not in human hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 4, p. 693–699, 2014.

VRBA, J. et al. Metabolism of palmatine by human hepatocytes and recombinant cytochromes P450. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 193–198, 2015.

WU, D. Z. et al. Palmatine, a protoberberine alkaloid, inhibits both Ca(2+)- and cAMP-activated Cl(-) secretion in isolated rat distal colon. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 6, p. 1203–1213, 2008.

**CAPÍTULO III: Atividades anticolinesterásica e antioxidante da palmatina, alcaloide
isolado de *Guatteria friesiana***

Artigo submetido a revista Journal of Ethnopharmacology

**Atividades anticolinesterásica e antioxidante da palmatina, alcaloide isolado de
*Guatteria friesiana***

**CHAVES, S. K. M.¹; FEITOSA, C.M.¹; CAVALCANTE, A. A. M.¹; MATA, A. M. O.
F¹; ROLI, H. ¹; MEDEIROS, M. ¹; COSTA, E. V. ²**

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

As plantas medicinais são usadas para o tratamento de diversas alterações patológicas sendo consideradas importantes fontes para a busca de substâncias ativas. Entre as plantas medicinais destaca-se a espécie *Guatteria friesiana*, da qual foram extraídos e isolados determinados compostos como a palmatina. A palmatina apresenta atividades farmacológicas promissoras, como ação anti-inflamatória e antidepressiva, no entanto, ainda são escassos estudos acerca de outras importantes atividades, por exemplo, para o tratamento da Doença de Alzheimer (DA). A DA, uma patologia neurodegenerativa, é considerada um problema de saúde pública, pois atinge um grande percentual da população mundial como tendência ao crescimento, devido, entre outros fatores, ao processo de envelhecimento da população. O tratamento do Alzheimer ainda apresenta certas limitações o que incentiva a busca por novas substâncias que possam ser utilizadas na terapêutica da doença. Este estudo objetivou verificar a atividade anticolinesterásica *in vitro* e antioxidante *in vitro* e *in vivo* da palmatina, trolox, ácido ascórbico e combinações. Para tal estudo, foi realizado ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase seguindo a metodologia de Ellman et al. (1961), os seguintes testes antioxidantes *in vitro*: DPPH[•], [•]OH, NO[•], TBARS, potencial redutor e ABTS^{•+} e testes antioxidantes *in vivo* em *S. cerevisiae*. Os resultados demonstraram significativa ação anticolinesterásica do alcaloide, bem como do trolox, apesar da combinação não ter apresentado efeito melhorado. A substância mostrou ainda potencial antioxidante e de modulação dos danos oxidativos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, tanto isoladamente quanto em associação com antioxidantes, sendo a associação com melhor potencial palmatina + trolox. Portanto, este estudo sugere que o alcaloide e suas combinações apresentam-se como importantes estratégias para a utilização na terapia da Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Palmatina. Alzheimer. Anticolinesterásica. Antioxidante.

ABSTRACT

The medicinal plants are used for the treatment of various pathological changes were considered important sources for the search for active substances. Among the medicinal plants

stands out *Guatteria friesiana* species, which were extracted and isolated certain compounds like palmatine alkaloid. The palmatine presents promising pharmacological activities such as anti-inflammatory and antidepressant action, however, there are few studies on other important activities, for example, for the treatment of Alzheimer's disease. Alzheimer's disease, a neurodegenerative disease is considered a public health problem because it affects a large percentage of the world population as a tendency to growth due, among other factors, to the aging process. The treatment of Alzheimer still has certain limitations which encourages the search for new substances which can be used in the treatment of disease. This study aimed to verify the acetylcholinesterase activity *in vitro* and antioxidant *in vitro* and *in vivo* of palmatine alkaloid, trolox, ascorbic acid and combinations. For this study, it was performed testing inhibition of acetylcholinesterase following the methodology of Ellman et al. (1961), the following antioxidants *in vitro* tests: DPPH[•], [•]OH, NO[•], TBARS, potential reducer and ABTS^{•+} and antioxidants *in vivo* tests in *S. cerevisiae*. The results showed significant anticholinesterase action alkaloid, as well as the trolox, although the combination has not shown enhanced effect. The substance showed further potential antioxidant and oxidative modulation damage *in vitro* and *in vivo*, respectively, both singly and in combination with antioxidants, and the association with better potential palmatine + trolox. Thus, this study suggests that the alkaloid and combinations thereof present as major strategies for use in therapy of Alzheimer.

Keywords: Palmatine. Alzheimer. Anticholinesterasic. Antioxidant.

1.0 Introdução

As plantas medicinais têm sido utilizadas desde a antiguidade para o tratamento de disfunções da memória e várias outras alterações patológicas relacionadas ao processo de envelhecimento. Destacam-se no meio científico esses produtos naturais como excelentes fontes para a pesquisa de novos compostos na busca de tratamentos para diversas patologias, dentre elas a Doença de Alzheimer (DA). Os avanços em descobrir compostos naturais derivados de plantas ampliam as possibilidades para o desenvolvimento de novos fármacos que superem limitações dos tratamentos convencionais utilizados para essa doença neurodegenerativa (OLIVEIRA et al., 2014; ADEWUSI; STEENKAMP, 2015; HARRAD; AMINE, 2016).

Nesse sentido, pode-se citar o gênero *Guatteria* (Ruiz & Pav.), pertencente à família Annonaceae, que está distribuído em algumas regiões neotropicais e apresenta espécies conhecidas por suas propriedades medicinais, destacando-se a espécie *Guateria friesiana* encontrada na bacia amazônica brasileira e colombiana. Investigações prévias revelaram a presença de determinados compostos, como os alcaloides, que exibiram atividades biológicas como ação antitumoral e antimicrobiana, apesar dos estudos com essa espécie ainda serem limitados (COSTA et al., 2013).

Dentre os alcaloides extraídos da espécie citada tem-se palmatina, um alcaloide quaternário encontrado nas folhas da planta, que apresenta determinadas atividades biológicas comprovadas como ação anti-inflamatória e inibição seletiva de determinados tipos de células cancerígenas. Embora esse alcaloide já tenha apresentado atividades farmacológicas de interesse, ainda há um vasto campo a ser pesquisado no sentido de detectar importantes atividades terapêuticas da substância, no que concerne, por exemplo ao Mal de Alzheimer (HAMBRIGHT et al., 2014; VRBA et al., 2015).

A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa multifatorial associada à agregação de placas senis, formação de emaranhados neurofibrilares, dentre outros fatores, que promovem a degeneração das células nervosas. Uma característica marcante no paciente portador da DA diz respeito à redução nos níveis de neurotransmissores cerebrais, especialmente a acetilcolina (ACh). Essas alterações levam ao declínio da memória e outras funções cognitivas do paciente. Além disso, estudos demonstram o importante papel do estresse oxidativo na DA. Esses estudos sugerem que os sinais do estresse oxidativo estão entre as primeiras manifestações patológicas da doença e que a formação de radicais livres pode contribuir para a sua patogenia e progressão (FORLENZA, 2005; MAMELAK, 2007; HWANG et al., 2015; OTA; OISHI; ITO, 2015).

Desse modo as pesquisas em busca de novas estratégias terapêuticas para a DA são direcionadas principalmente para a busca de inibidores da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela degradação da ACh, promovendo assim o aumento dos níveis de acetilcolina no cérebro, com a finalidade de retardar a progressão da doença. Associada à essa ação inibitória a atividade antioxidante também se mostra interessante no contexto da terapêutica da DA, pois como citado, além da redução dos níveis de acetilcolina estarem relacionados com o desenvolvimento dessa patologia o estresse oxidativo também contribui de forma significativa para a sua progressão (PAGLIOSA et al., 2010; VALE et al., 2011). Diante do cenário, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade inibitória da palmatina sobre a enzima AChE *in vitro*, bem como sua ação antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

2.0 Materiais e métodos

2.1 Material vegetal

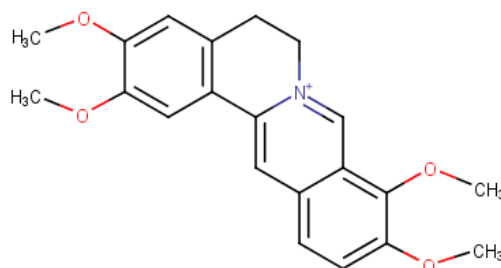
As folhas de *G. friesiana* foram coletadas em janeiro de 2005 na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), uma área de três mil hectares,

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 Extração e isolamento do alcaloide palmatina

A extração, isolamento e a identificação da palmatina (Figura 1) utilizada neste estudo foram descritos por Costa et al. (2013)

Figura 1 – Estrutura química do alcaloide palmatina



2.3 Preparo das substâncias para o teste de detecção da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase.

A palmatina foi preparada através da diluição em solução de Tween 80 0,05% em solução salina 0,9% obtendo-se soluções nas concentrações de 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL e 0,0625 mg/mL. O ácido ascórbico (AA) foi diluído em tampão fosfato obtendo-se uma concentração de 50 mmol/L, enquanto que o trolox foi solubilizado em DMSO obtendo-se uma solução na mesma concentração.

2.3 Ensaio *in vitro* para detecção da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase

2.3.1 Inibição qualitativa da AChE

Cerca de 2,0 μ L da amostra de cada concentração foi aplicada na placa de sílica gel com auxílio de um capilar e eluída em clorofórmio e metanol na proporção de 9:1,

respectivamente. Após a placa ser desenvolvida a atividade inibitória foi detectada utilizando-se revelador baseado no método de Ellman. 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 pH 8) até a saturação com o reagente, mas não tanto para escorrer. Depois de seca por 3-5 minutos pulverizou-se a placa com 10 U/mL da enzima. A observação de uma placa amarela com manchas brancas após 5 minutos evidencia um resultado positivo. (INGKANINAN et al., 1999; INGKANINAN et al. 2000; RHEE et al.; 2001). A cafeína obtida da espécie *Paulinia cupana* foi utilizada como padrão uma vez que possui atividade inibitória comprovadamente ativa para a AChE.

2.3.2 Reação química de tiocolina e DTNB (falso positivo)

Para verificar se o resultado positivo da amostra é, na verdade, devido à inibição da enzima ou da reação química entre DTNB e tiocolina, 10 U/mL de AChE foi misturada com 1 mmol/L ATCI em tampão tris HCl pH 8 e incubada por 15 minutos a 37 ° C. A mistura enzima-substrato foi usada como revelador tiocolina. A amostra foi aplicada em placa de sílica gel utilizando um capilar de vidro, eluída, e a placa foi pulverizada com uma solução 1mmol/L de DTNB seguida do revelador tiocolina. Manchas brancas em um campo amarelo são observadas para compostos falso-positivos. Alguns aldeídos, aminas e ácidos apresentam efeito falso-positivo no método de Ellman (ELLMAN et al., 1961; INGKANINAN et al., 1999; INGKANINAN et al., 2000).

2.3.3 Inibição quantitativa da AChE

O efeito inibitório da palmatina 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 µL da amostra (solução de tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8, e 10% de metanol), misturou-se com 100 µL 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 µL 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 µL de DTNB (na concentração de 3 mmol/L em tampão Tris-HCl, pH 8, e NaCl 0,1 mol/L, MgCl₂ 0,02 mol/L) e 100 µL de ATCI (4 mmol/L em água). Preparou-se o branco por substituição de AChE por 100 µL 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.

2.6 Preparo das substâncias para os testes antioxidantes *in vitro*.

O alcaloide palmatina foi preparado através da diluição em solução de Tween 80 0,05% em solução salina 0,9% obtendo-se as soluções nas concentrações de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL e 1 mg/mL. O ácido ascórbico (AA) foi diluído em tampão fosfato obtendo-se uma concentração de 50 mmol/L, enquanto que o Trolox foi solubilizado em DMSO obtendo-se uma solução na mesma concentração.

2.6.1 Atividade sequestrante do radical DPPH[•]

O teste para atividade sequestrante do DPPH[•] foi realizado utilizando um método modificado descrito por Manzocco e colaboradores (1998). Em resumo, 0,3 mL das amostras (PA/TRO/AA/PA+TRO/PA+AA) foram adicionadas a 2,7 mL de solução etanólica de DPPH (0,5 mmol/L). Após 30 min a absorbância foi mensurada usando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. Os grupos com co-tratamento foram tratados com trolox e ácido ascórbico na concentração de 50 mmol/L. Trolox e ácido ascórbico servem como controle positivo, enquanto somente 0,3 mL do veículo (0,05% tween 80 em 0,9% NaCl) foram adicionados à solução de DPPH sendo considerado o controle negativo (CN). O branco não continha as amostras. O potencial sequestrante de DPPH foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ sequestrante de DPPH}^{\bullet} = [(A_{br} - A_{ar}) / A_{br}] \times 100$$

onde A_{br} é a absorbância de radicais livres de DPPH antes da reação e A_{ar} é a absorbância de radicais livres de DPPH após a reação.

2.6.2 Atividade sequestrante do radical $ABTS^{\bullet+}$

O ensaio $ABTS^{\bullet+}$ foi realizado como descrito por Seeram e colaboradores (2006) com leve modificação do método. O $ABTS^{\bullet+}$ foi produzido pela adição de dióxido de manganês sólido (80 mg) a uma solução aquosa de 5 mmol/L de ABTS em tampão Na^+/K^+ (pH 7,0). Em seguida, 2,8 mL da amostra foi adicionada em 0,2 mL de solução $ABTS^{\bullet+}$. A absorvância foi medida no comprimento de onda de 750 nm após 5 minutos. O percentual de capacidade sequestrante foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ sequestrante de } ABTS^{\bullet+} = [(A_{br} - A_{ar})/A_{br}] \times 100$$

onde A_{br} é a absorvância de radicais livres $ABTS^{\bullet+}$ antes da reação e A_{ar} é a absorvância de radicais livres $ABTS^{\bullet+}$ após a reação com os testes.

2.6.3 Atividade sequestrante do radical $\bullet OH$

A habilidade das amostras em sequestrar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinada de acordo com o método descrito por Ruch e colaboradores (1989). A solução de 40 mmol/L de H_2O_2 foi preparada em tampão fosfato (50 mmol/L; pH 7,4). A concentração de H_2O_2 foi mensurada em espectrofotômetro através da determinação da absorvância em 230 nm. As amostras testes (1-50 mg/mL) e os co-tratamentos (0,6 mL) foram adicionados a 0,5 mL de H_2O_2 e a absorvância de 230 nm foi determinada após 10 minutos. A solução contendo tampão fosfato sem H_2O_2 foi utilizada como branco. A porcentagem de sequestro de H_2O_2 foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ sequestrante de } H_2O_2 = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$$

onde A_0 é a absorvância do controle e A é a absorvância do teste.

2.6.4 Atividade sequestrante do radical NO^{\bullet}

Para o teste de atividade sequestrante do nitrito (NO^{\bullet}), foram adicionados 0,375 mL das amostras testes a 1,5 mL de nitroprussiato de sódio (10mmol/L) e 0,375 mL de tampão fosfato em salina (PBS; pH 7,4). Após incubação da mistura reacional a 37 °C por 1 hora, 1 mL da solução foi misturada com 1 mL do reagente de Griess. A mistura reacional foi então incubada a temperatura ambiente por 30 minutos e a absorvância final (A_{ar}) foi mensurada a

546 nm. O CN continha somente nitroprussiato de sódio e veículo (MARCOCCI et al., 1994). A inibição do radical NO foi calculada conforme a equação:

$$\% \text{ inibição do radical NO} = [(A_{br} - A_{ar})/A_{br}] \times 100$$

onde A_{br} é a absorvância de radicais livre NO^\bullet antes da reação e A_{ar} é a absorvância de radicais livres de NO^\bullet com a adição dos testes.

2.6.5 Avaliação do potencial antioxidante contra a formação de TBARS

O ensaio de TBARS (radicais ácido tiobarbitúrico) foi utilizado para mensurar a peroxidação lipídica. Para esse teste, 0,1 mL da amostra foi adicionada à 1 mL de homogenato de gema de ovo (1% a/v) em 20mmol/L de tampão fosfato (pH 7,4). A oxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL da solução de 2,2'-azobis (2-methylpropionamidina) dihydrochlorida (AAPH; 0,12 M). A mistura reacional foi incubada a 37 ° C por 15 minutos. Após o resfriamento, 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) foi adicionado a 0,5 mL da amostra e a mistura foi centrifugada a 1.200 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,67%) e aquecida a 95 °C durante 30 minutos. Após o processo, a absorvância foi medida a 532 nm utilizando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas apenas pelo AAPH isolado. A porcentagem de sequestro dos radicais livres foi determinada em função das medidas das absorvâncias por meio da seguinte equação (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990):

$$\% \text{ sequestrante de TBARS} = [(Ac - AT)/Ac] \times 100$$

Onde: Ac é a absorvância do controle, obtida do meio reacional sem a amostra e AT é o valor de cada amostra.

2.6.6 Teste de potencial de redução (PR)

O teste de PR foi realizado conforme metodologia descrita por OYAIZU (1986) com determinadas modificações. Nesse teste 0,2 mL da amostra foi adicionada a 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 0,5 mL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1% w/v) e a mistura reacional foi aquecida a 50 °C por 20 minutos. Em seguida, 0,5 mL de ácido tricloroacético (10% a/v) foi adicionado com constante agitação, seguida pela adição de 1,175 mL de água destilada e 0,125 mL de FeCl_3 (0,1% a/v) após 5 minutos. A absorvância da amostra foi realizada a 700 nm. Para o branco, somente 0,2 mL do veículo. A capacidade redutora foi calculada como se segue:

$$\text{Potencial de redução (\%)} = [(A_{ts} - A_{bs})/A_{ts}] \times 100$$

onde A_{ts} é a absorvância da amostra teste e A_{bs} é a absorvância do branco.

2.7 Preparo das substâncias para o teste de *S. cerevisiae*

O alcaloide palmatina foi preparado através da diluição em solução de Tween 80 0,05% em solução salina 0,9% obtendo-se as soluções nas concentrações de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL e 1 mg/mL. O ácido ascórbico (AA) foi diluído em tampão fosfato obtendo-se uma concentração de 50 mmol/L, enquanto o Trolox (TRO) foi solubilizado em DMSO obtendo-se uma solução na mesma concentração.

2.8 Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas

As linhagens utilizadas estão demonstradas na Tabela 1. A EG103 corresponde à linhagem proficiente nas enzimas antioxidantes. A linhagem EG118 é mutada para o sistema enzimático que contém a enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD - produto do gene SOD1), enquanto que a linhagem EG110 é mutada na enzima superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD - produto do gene SOD2). A linhagem EG133 é duplo mutante para as enzimas SOD 1 e SOD 2. A linhagem EG223 é mutada para a enzima catalase, enquanto a linhagem EG é duplo mutante para a superóxido dismutase citoplasmática e para catalase.

Tabela 1 – Descrição das linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no estudo.

Descrição	Genótipo	Origem
EG103 (SODWT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (Sod1Δ)	sod1::URA3 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (Sod2Δ)	sod2::TRP1 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (Sod1ΔSod2Δ)	sod1::URA3 sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1Δ)	EG103, except cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (Sod1ΔCat1Δ)	EG103, except sod1:: URA3 and cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles

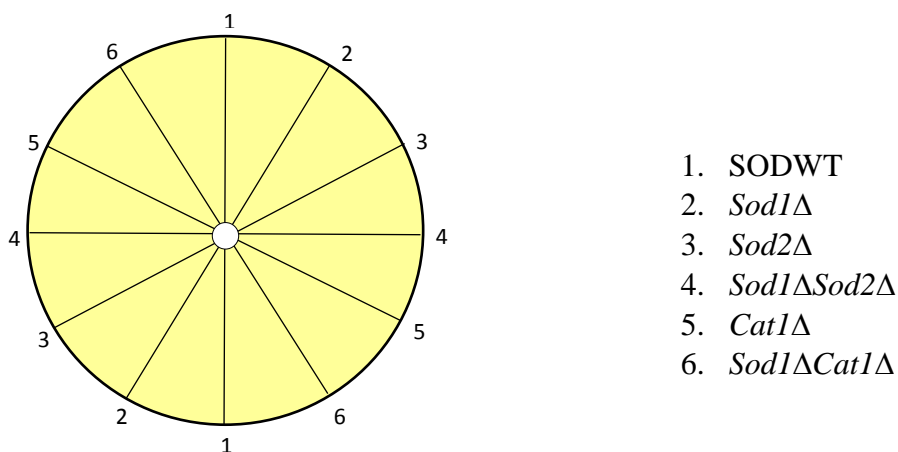
Adaptação: De Lima, 2008.

2.9 Teste do disco central

As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto peptona, 2% de glucose) a 28 °C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária.

As células cultivadas em meio líquido foram semeadas na placa de Petri do centro para a margem em um ciclo contínuo para ambas as partes da placa contendo no centro um disco de papel de filtro estéril com as substâncias utilizadas no teste, de acordo com o esquema apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Posição das linhagens na placa de Petri.



Após semeadura e adição das substâncias, as placas foram incubadas por 48 h em estufa a 30 °C. Os halos de inibição foram mensurados em milímetros desde a margem do disco de papel de filtro até o início do crescimento celular. Os valores variaram de 0 mm

(crescimento completo) até 40 mm (ausência de crescimento) e os resultados foram tabelados e submetidos a tratamento estatístico. O teste foi realizado em duplicata sendo o controle negativo solução salina 0,9% e o controle positivo peróxido de hidrogênio a 5 mmol/L.

*2.10 Avaliação na modulação de danos oxidativos induzidos por peróxido de hidrogênio nas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao alcaloide palmatina e sua associação com ácido ascórbico e trolox.*

Os valores do percentual de modulação dos danos oxidativos da palmatina e sua associação com AA e trolox foram calculados utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Modulação: } \frac{\text{H}_2\text{O}_2 - \text{Palmatina}}{\text{H}_2\text{O}_2} \times 100 \text{ ou}$$

$$\% \text{ Modulação: } \frac{\text{H}_2\text{O}_2 - \text{Palmatina} + \text{AA ou TRO}}{\text{H}_2\text{O}_2} \times 100$$

2.11 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de Newman-Keuls como post hoc teste por meio do programa GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright ©). As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas a partir de $p < 0,05$.

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Investigação qualitativa e quantitativa da atividade inibitória da acetilcolinesterase pela palmatina, trolox, ácido ascórbico e combinações.

O declínio da memória é um dos aspectos que caracteriza a Doença de Alzheimer. Estudos demonstram que o comprometimento da memória resulta de baixos níveis de um neurotransmissor, a acetilcolina, que corrobora com a hipótese colinérgica como a causa ou uma das causas do aparecimento e/ou desenvolvimento dessa patologia. A acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase são duas enzimas que agem sobre a ACh na fenda sináptica interrompendo a sinalização colinérgica. Portanto, a estratégia de prolongamento do tempo de

meia-vida do neurotransmissor em questão, através do uso de inibidores da AChE é, atualmente, utilizada como abordagem terapêutica para a DA (SAMARADIVAKARA et al., 2016).

A palmatina, extraída das folhas da espécie *Guatteria friesiana* foi avaliado com relação à atividade anticolinesterásica. O teste qualitativo e quantitativo foi realizado através do método de Ellman que se baseia na reação entre ATCI e a enzima acetilcolinesterase formando tiocolina. Posteriormente a tiocolina reage com o DTNB resultando em um ácido de coloração amarela. A presença de manchas brancas no fundo amarelo evidencia a não formação do composto amarelo, ou seja, a inibição da ação enzimática da AChE sobre o ATCI. O teste demonstrou que a palmatina apresenta atividade inibitória frente à enzima para todas as concentrações testadas, como se pode observar na (Figura 3), através da observação do aparecimento das manchas brancas, utilizando-se as concentrações de 1 mg/mL a 0,0625 mg/mL. O teste quantitativo utilizando o mesmo princípio teve como resultado um CI_{50} de 0,294 $\mu\text{g/mL}$ para o alcaloide testado (Tabela 2), mostrando um valor abaixo da galantamina, o que permite considerar a palmatina uma importante substância para aplicação na terapia da DA. A galantamina, que é considerado o alcaloide mais eficiente para a DA, apresenta um valor de CI_{50} de $0,37 \times 10^{-3}$ mg/mL (RASHED et al., 2013).

Jung e colaboradores (2009) ao testarem vários alcaloides protoberberínicos isolados de *Coptidis Rhizoma* para a ação anticolinesterásica, incluindo a palmatina, encontrou um $CI_{50} = 0,179 \mu\text{g/mL}$. Os valores de CI_{50} da palmatina encontrados para ambos os estudos foram próximos entre si e abaixo do valor para a galantamina, considerado um inibidor padrão da AChE. Além dessa atividade, a palmatina já demonstrou, *in vitro*, ações anti-inflamatória, antiparasitária, efeito inibitório na diferenciação e função dos osteoclastos, bem como ação antipirética, antinociceptiva, e de redução dos níveis de colesterol, triglicerídeos e LDL, redução de marcadores do fenômeno oxidativo induzido por estresse e ação antidepressiva em modelos de animais (LEE et al., 2010; DHINGRA; BHANKHER, 2014; LI et al., 2015; NING et al., 2015).

Figura 3 – Análise qualitativa da atividade inibitória da palmatina, com base no ensaio de Ellman.



LEGENDA: CAF (cafeína); (PAL) palmatina.

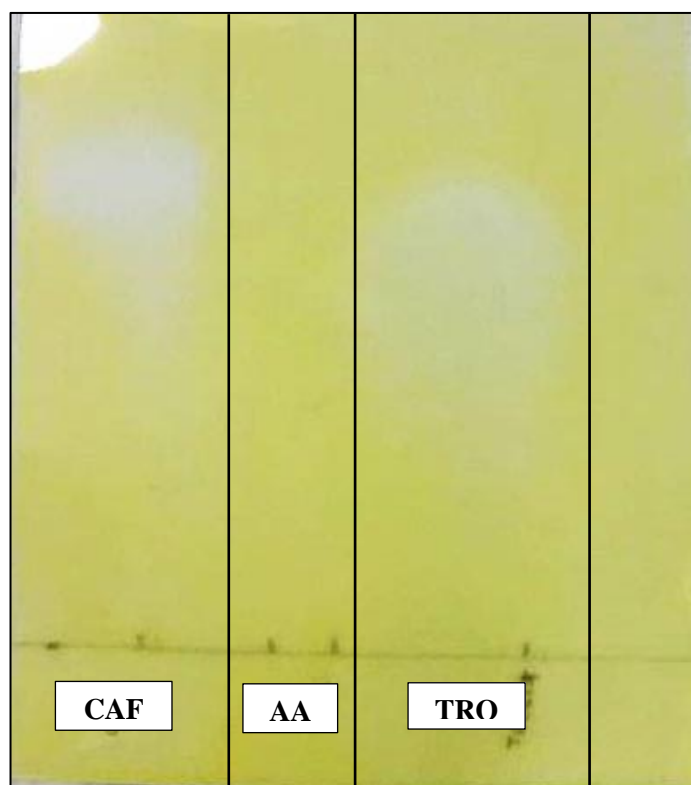
Tabela 2 – Avaliação quantitativa da atividade inibitória da palmatina com base no ensaio de Ellman.

Substância	CI ₅₀ (µg/mL)
Palmatina	0,294
Trolox	2,256
Palmatina + Trolox	1,534

Além da palmatina os ensaios qualitativos foram realizados para o trolox e o ácido ascórbico e pôde-se observar que somente o trolox demonstrou capacidade inibitória com relação à AChE na concentração testada (Figura 4). Além disso, verificou-se que a mistura de palmatina com o trolox continuou demonstrando ação inibitória no ensaio qualitativo. Dessa forma, o teste quantitativo foi realizado para o trolox e a combinação palmatina+trolox na proporção de 1:1. Através do teste quantitativo com trolox e combinação palmatina+trolox foram encontrados valores de CI₅₀ de 2,256 e 1,534 µg/mL, respectivamente, como exposto

na Tabela 2. Observa-se que apesar do trolox apresentar certa atividade inibitória, a combinação de trolox e palmatina não promoveu uma melhora na ação do alcaloide. Esse fato pode ter ocorrido, por exemplo, por uma competição entre as substâncias pela enzima, na proporção da combinação utilizada no teste. Não foram encontrados na literatura outros achados acerca da ação inibitória da AChE pelo trolox.

Figura 4 – Análise qualitativa da atividade inibitória do ácido ascórbico e do trolox com base no ensaio de Ellman.



LEGENDA: CAF (cafeína); (AA) ácido ascórbico (TRO) trolox (concentração de 50 mmol/L)

3.2 Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* da palmatina, trolox, ácido ascórbico e combinações do alcaloide com trolox e ácido ascórbico.

O estresse oxidativo refere-se a uma situação de desequilíbrio entre as ações antioxidantes e a concentração de espécies reativas o que leva à oxidação indevida de moléculas por esses radicais, como as espécies reativas de oxigênio, promovendo dano celular. A atividade antioxidante vem demonstrando importância na terapêutica da DA, visto que o fenômeno do estresse oxidativo pode estar relacionado ao aparecimento e/ou

desenvolvimento dessa patologia, sendo o citoplasma dos neurônios vulneráveis o principal local onde ocorre o aumento do dano oxidativo (MAMELAK, 2007; WOJTUNIK-KULESZA et al., 2016).

Estudos confirmam a influência desses radicais no desenvolvimento das alterações relacionadas à DA. O cérebro de indivíduos portadores de Alzheimer apresenta uma extensão significativa de danos oxidativos associados com o acúmulo anormal de peptídeo β -amiloide e deposição de emaranhados neurofibrilares (HUANG; ZHANG; CHEN, 2016) (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2016).

Diante desses achados, além da importante atividade anticolinesterásica na terapêutica da DA, a ação antioxidante da palmatina foi avaliada. O alcaloide demonstrou ação antioxidante *in vitro* para todas as concentrações testadas, em comparação ao controle negativo, nos ensaios de DPPH \bullet , ABTS \bullet^{+} e TBARS (Tabelas 3, 4, 7) com valores de CI_{50} iguais a $3,48 \pm 0,48$; $10,64 \pm 0,74$ e $3,97 \pm 0,3$ mg/mL, respectivamente. As concentrações de 5 a 50 mg/mL para o ensaio com radical $\bullet OH$ e de 10 a 50 mg/mL no ensaio com radical $NO\bullet$ (Tabelas 5, 6) também demonstraram valores significativamente menores, em relação ao controle negativo, tendo o alcaloide valores de CI_{50} , para esses testes, de $10,91 \pm 0,70$ e $14,4 \pm 0,82$ mg/mL, respectivamente. Com relação à avaliação da capacidade redutora foi observado um padrão semelhante, no qual todas as concentrações do alcaloide demonstraram significativa atividade redutora ao comparar com o controle negativo, resultando em um valor de CI_{50} de $2,17 \pm 0,4$ mg/mL. Jung e colaboradores (2009), demonstraram que a palmatina exibiu efeitos antioxidantes *in vitro*, com CI_{50} igual a $28,70 \mu M$ ($10,11$ mg/mL), frente ao radical peroxinitrito ($ONOO^-$), formado pela reação entre $NO\bullet$ e $\bullet O_2^-$. Esse radical apresenta alto poder oxidante que leva a oxidação de componentes celulares como lipídios, proteínas, carboidratos e DNA, bem como ao aumento da agregação de peptídeo β -amiloide.

O trolox é um composto sintético, análogo da vitamina E, com certa solubilidade em meio aquoso, que apresenta potente capacidade de eliminar radicais peroxil de forma semelhante à vitamina E, garantindo proteção antioxidante. Esses compostos previnem a reação em cadeia de formação de EROs reduzindo, portanto, a geração desses radicais. Devido a sua alta capacidade de captura de radicais é frequentemente usado como composto padrão, um antioxidante de referência (FAGUNDES et al., 2010; HALL et al., 2010; OEHLKE et al., 2011; ANEL-LÓPEZ et al., 2012; BAI et al., 2014; LEE et al., 2015; MESTRES et al., 2015).

A interação palmatina + trolox apresentou valores de CI_{50} estatisticamente menores que a palmatina isolada em todos os testes antioxidante *in vitro* realizados, demonstrando que

a combinação palmatina e trolox potencializa o efeito antioxidante do alcaloide. A interação palmatina + trolox apresentou um valor ainda menor de $CI_{50} = 0,44 \pm 0,22$ mg/mL do que a palmatina isolada também para o teste de potencial redutor (Tabela 8). Para os ensaios com NO^{\bullet} e TBARS os valores de CI_{50} para a combinação palmatina + trolox foram estatisticamente menores ($1,73 \pm 0,36$ e $0,49 \pm 0,22$ mg/mL) quando comparados tanto com a palmatina, quanto com o ácido ascórbico e o trolox de forma isolada (Tabelas 6 e 7). As evidências de que o estresse oxidativo, pela formação de radicais livres, pode contribuir na patogenia da DA, justifica a utilização de compostos antioxidantes na terapia da doença, como a vitamina E, que pode ser empregada como adjuvante no tratamento dessa patologia (MECOCCI; CRISTINA, 2012).

Tabela 3 – Avaliação do potencial sequestrante da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico frente ao radical DPPH•.

Tratamentos	Potencial sequestrante do radical (%)					CI ₅₀ (mg/mL) [IC (mg/mL), R ²]
	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	
PA	37,50±0,01 ^a	43,95±0,04 ^a	45,96±0,01 ^a	51,69±0,01 ^a	58,86±0,02 ^{a,e}	3,48±0,48 [0,57-24,87, 0,97]
TRO	51,40±0,04 ^{a,b,f}	55,48±0,04 ^{a,b,f}	70,18±0,04 ^{a,b,d,e,f}	81,77±0,01 ^{a,b,d,e,f}	89,65±0,01 ^{a,b,f}	0,87±0,38 [0,11-6,66, 0,81]
AA	46,16±0,01 ^{a,b}	53,76±0,01 ^{a,b}	55,71±0,04 ^{a,b}	63,56±0,02 ^{a,b,f}	81,42±0,01 ^{a,b,f}	1,74±0,40 [1,23-7,33, 0,89]
PA+TRO	44,87±0,01 ^a	47,91±0,01 ^a	49,17±0,02 ^a	56,19±0,02 ^a	95,21±0,01 ^{a,b,c,d,f}	3,12±0,54 [0,15-64,90, 0,53]
PA+AA	42,49±0,01 ^a	44,78±0,01 ^a	49,23±0,01 ^a	49,34±0,01 ^a	51,49±0,01 ^a	0,06±0,30 [0,002-1,92, 0,85]
CN	4,12±0,10					-

Os valores correspondem à média ± desvio padrão (SD)

LEGENDA: CN (controle negativo); PA (palmatina); TRO (trolox); AA (ácido ascórbico); CI₅₀: concentração inibitória mínima de 50% dos radicais; ^ap<0,05 comparado com o CN (0,05% tween 80 em 0,9% NaCl); ^bp<0,05 comparado com a PA (respectiva concentração); ^cp < 0,05 comparado com o TRO (respectiva concentração); ^dp<0,05 comparado com o AA (respectiva concentração); ^ep<0,05 comparado com PA+TRO (respectiva concentração); ^fp<0,05 comparado com PA+AA (respectiva concentração) (ANOVA e t-Student-Newman-Kelwls as post hoc test)

Tabela 4 – Avaliação do potencial sequestrante da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico frente ao radical ABTS^{•+}.

Tratamentos	Potencial sequestrante do radical (%)					IC ₅₀ (mg/mL) [CI (mg/mL), R ²]
	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	
PA	9,18±0,06 ^a	15,11±0,04 ^a	23,97±0,01 ^a	41,05±0,04 ^a	55,63±0,02 ^a	10,64±0,74 [5,72-19,81, 0,94]
TRO	24,65±0,01 ^{a,b}	28,51±0,03 ^{a,b}	45,73±0,01 ^{a,b}	55,59±0,01 ^{a,b}	58,49±0,01 ^a	2,32±0,56 [0,56-9,64, 0,83]
AA	15,01±0,01 ^a	26,12±0,02 ^{a,b}	42,52±0,03 ^{a,b}	53,09±0,02 ^{a,b}	55,98±0,01 ^a	3,85±0,54 [1,76-8,39, 0,94]
PA+TRO	15,93±0,01 ^a	37,91±0,02 ^{a,b,c,d,f}	46,27±0,01 ^{a,b}	56,95±0,01 ^{a,b}	66,67±0,01 ^{a,b,d}	3,70±0,24 [2,38-5,73, 0,98]
PA+AA	16,11±0,01 ^a	27,19±0,02 ^{a,b}	43,59±0,03 ^{a,b}	53,80±0,01 ^{a,b}	57,73±0,01 ^a	3,74±0,50 [1,71-8,18, 0,94]
CN	1,46±0,01					-

Os valores correspondem à média ± desvio padrão (SD)

LEGENDA: CN (controle negativo); PA (palmatina); TRO (trolox); AA (ácido ascórbico); CI₅₀: concentração inibitória mínima de 50% dos radicais; ^ap<0,05 comparado com o CN (0,05% tween 80 em 0,9% NaCl); ^bp<0,05 comparado com a PA (respectiva concentração); ^cp<0,05 comparado com o TRO (respectiva concentração); ^dp<0,05 comparado com o AA (respectiva concentração); ^ep < 0,05 comparado com PA+TRO (respectiva concentração); ^fp<0,05 comparado com PA+AA (respectiva concentração) (ANOVA e *t*-Student-Newman-Kewls as *post hoc* test).

Tabela 5 – Avaliação do potencial sequestrante da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico frente ao radical OH•.

Tratamentos	Potencial sequestrante do radical (%)					CI ₅₀ (mg/mL) [IC (mg/mL), R ²]
	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	
PA	8,72±0,06	15,88±0,01 ^a	26,66±0,01 ^a	36,99±0,01 ^a	57,63±0,01 ^a	10,91±0,70 [5,22-22,81, 0,92]
TRO	27,11±0,01 ^{a,b,d,e,f}	37,34±0,01 ^{a,b,f}	43,78±0,05 ^{a,b,f}	52,02±0,03 ^{a,b}	79,13±0,01 ^{a,b,d,f}	4,74±0,48 [1,08- 20,93, 0,79]
AA	15,19±0,01 ^a	26,79±0,01 ^{a,b}	36,93±0,01 ^{a,b}	46,95±0,01 ^{a,b}	57,25±0,01 ^a	4,56±0,36 [2,25-9,23, 0,95]
PA+TRO	13,85±0,05 ^a	27,14±0,01 ^{a,b}	37,17±0,01 ^{a,b}	47,57±0,01 ^{a,b}	64,35±0,06 ^a	6,25±0,44 [2,98-1311, 0,94]
PA+AA	12,68±0,04 ^a	22,87±0,05 ^a	31,48±0,04 ^a	48,85±0,04 ^{a,b}	60,21±0,01 ^a	7,13±0,56 [3,45-14,70, 0,93]
CN	2,72±0,03					-

Os valores correspondem à média ± desvio padrão (SD)

LEGENDA: CN (controle negativo); PA (palmatina); TRO (trolox); AA (ácido ascórbico); CI₅₀: concentração inibitória mínima de 50% dos radicais; ^ap<0,05 comparado com o CN (0,05% tween 80 em 0,9% NaCl); ^bp<0,05 comparado com a PA (respectiva concentração); ^cp<0,05 comparado com o TRO (respectiva concentração); ^dp<0,05 comparado com o AA (respectiva concentração); ^ep<0,05 comparado com PA+TRO (respectiva concentração); ^fp<0,05 comparado com PA+AA (respectiva concentração) (ANOVA e *t*-Student-Newman-Kewls as *post hoc* test).

Tabela 6 – Avaliação do potencial sequestrante da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico frente ao radical NO•.

Tratamentos	Potencial sequestrante do radical (%)					CI ₅₀ (mg/mL) [IC (mg/mL), R ²]
	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	
PA	2,62±0,02	7,50±0,05	18,53±0,01 ^a	27,71±0,01 ^a	46,81±0,03 ^a	14,47±0,82 [8,11-25,83, 0,95]
TRO	16,44±0,01 ^{a,b}	27,61±0,01 ^{a,b}	48,42±0,01 ^{a,b,d}	55,62±0,03 ^{a,b}	68,26±0,01 ^{a,b,d}	5,02±0,50 [2,34-10,76, 0,93]
AA	11,29±0,02 ^{a,b}	23,91±0,04 ^{a,b}	31,24±0,01 ^{a,b}	46,23±0,01 ^{a,b}	56,05±0,04 ^{a,b}	6,23±0,46 [3,27-11,85, 0,95]
PA+TRO	35,64±0,04 ^{a,b,c,d,f}	42,87±0,04 ^{a,b,c,d,f}	54,34±0,03 ^{a,b,d,f}	64,63±0,04 ^{a,b,c,d,f}	71,25±0,02 ^{a,b,d}	1,73±0,36 [0,35-5,46, 0,87]
PA+AA	23,50±0,03 ^{a,b,d}	31,54±0,01 ^{a,b,d}	45,97±0,01 ^{a,b,d}	51,65±0,02 ^a	66,17±0,03 ^{a,b,e}	3,41±0,40 [1,15-10,15, 0,89]
CN	1,38±0,01					-

Os valores correspondem à média ± desvio padrão (SD)

LEGENDA: CN (controle negativo); PA (palmatina); TRO (trolox); AA (ácido ascórbico); CI₅₀: concentração inibitória mínima de 50% dos radicais; ^ap<0,05 comparado com o CN (0,05% tween 80 em 0,9% NaCl); ^bp<0,05 comparado com a PA (respectiva concentração); ^cp<0,05 comparado com o TRO (respectiva concentração); ^dp<0,05 comparado com o AA (respectiva concentração); ^ep<0,05 comparado com PA+TRO (respectiva concentração); ^fp<0,05 comparado com PA+AA (respectiva concentração) (ANOVA e *t*-Student-Newman-Kewls as *post hoc* test).

Tabela 7 – Avaliação antioxidante da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico frente ao ensaio de TBARS.

Tratamentos	Inibição da peroxidação lipídica (%)					CI ₅₀ (mg/mL) [IC (mg/mL), R ²]
	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	
PA	15,28±0,01 ^a	36,46±0,01 ^a	41,35±0,01 ^a	51,20±0,01 ^a	63,91±0,01 ^a	3,97±0,30 [2,12-7,43, 0,96]
TRO	36,46±0,01 ^{a,b,d}	45,05±0,01 ^{a,d}	55,15±0,01 ^{a,b}	62,80±0,01 ^{a,b}	68,39±0,01 ^a	1,02±0,30 [0,29-3,55, 0,90]
AA	17,57±0,01 ^a	35,79±0,01 ^a	49,59±0,01 ^{a,b}	54,48±0,01 ^a	66,67±0,01 ^a	3,56±0,28 [2,01-6,32, 0,97]
PA+TRO	44,04±0,01 ^{a,b,d}	54,48±0,01 ^{a,b,c,d}	59,87±0,01 ^{a,b,d}	64,94±0,01 ^{a,b,d}	70,95±0,01 ^a	0,49±0,22 [0,15-1,59, 0,94]
PA+AA	37,11±0,01 ^{a,b,d}	47,86±0,01 ^{a,b,d}	52,71±0,01 ^{a,b}	59,60±0,01 ^a	66,48±0,01 ^a	0,97±0,24 [0,25-2,49, 0,93]
CN	3,18±0,01					-

Os valores correspondem à média ± desvio padrão (SD)

LEGENDA: CN (controle negativo); PA (palmatina); TRO (trolox); AA (ácido ascórbico); CI₅₀: concentração inibitória mínima de 50% dos radicais; ^ap<0,05 comparado com o CN (0,05% tween 80 em 0,9% NaCl); ^bp<0,05 comparado com a PA (respectiva concentração); ^cp<0,05 comparado com o TRO (respectiva concentração); ^dp<0,05 comparado com o AA (respectiva concentração); ^ep < 0,05 comparado com PA+TRO (respectiva concentração); ^fp<0,05 comparado com PA+AA (respectiva concentração) (ANOVA e *t*-Student-Newman-Kewls as *post hoc* test).

Tabela 8 – Avaliação da capacidade redutora da palmatina, trolox, ácido ascórbico e da interação palmatina e trolox e interação palmatina e ácido ascórbico.

Tratamentos	Capacidade redutora (%)					CI ₅₀ (mg/mL) [IC (mg/mL), R ²]
	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	
PA	24,47±0,01 ^a	41,80±0,01 ^a	60,34±0,01 ^{a,d}	66,82±0,01 ^{a,d}	69,26±0,01 ^a	2,17±0,40 [1,04-4,51, 0,95]
TRO	57,23±0,01 ^{a,b,d,f}	63,96±0,01 ^{a,b,d,f}	68,16±0,01 ^{a,d,f}	72,05±0,01 ^{a,d}	74,37±0,01 ^{a,d,f}	0,14±0,22 [0,02-0,83, 0,93]
AA	31,73±0,01 ^a	36,04±0,01 ^a	45,80±0,01 ^a	55,90±0,01 ^a	63,02±0,01 ^a	1,48±0,39 [0,29-7,55, 0,83]
PA+TRO	46,21±0,01 ^{a,b,f}	56,44±0,01 ^{a,b,d,f}	62,23±0,01 ^{a,d,f}	68,16±0,01 ^{a,d}	71,49±0,01 ^{a,d}	0,44±0,22 [0,14-1,35, 0,94]
PA+AA	27,55±0,01 ^a	45,80±0,01 ^{a,d}	55,35±0,01 ^{a,d}	62,83±0,01 ^{a,d}	65,37±0,01 ^a	1,54±0,22 [0,96-2,47, 0,98]
CN	2,74±0,01					-

Os valores correspondem à média ± desvio padrão (SD)

LEGENDA: CN (controle negativo); PA (palmatina); TRO (trolox); AA (ácido ascórbico); CI₅₀: concentração inibitória mínima de 50% dos radicais; ^ap<0,05 comparado com o CN (0,05% tween 80 em 0,9% NaCl); ^bp<0,05 comparado com a PA (respectiva concentração); ^cp<0,05 comparado com o TRO (respectiva concentração); ^dp<0,05 comparado com o AA (respectiva concentração); ^ep<0,05 comparado com PA+TRO (respectiva concentração); ^fp<0,05 comparado com PA+AA (respectiva concentração) (ANOVA e *t*-Student-Newman-Kewls as *post hoc* test).

Observa-se, que para os testes frente a vários radicais livres, a palmatina demonstrou ação antioxidante para a maioria das concentrações utilizadas. As combinações entre palmatina e ácido ascórbico e palmatina e trolox também apresentaram ação antioxidante significativa nos testes realizados para grande parte das concentrações. Além disso, a combinação palmatina + trolox apresentou um valor de CI_{50} abaixo da palmatina do trolox isoladamente e da combinação palmatina + ácido ascórbico.

3.3 Avaliação da atividade oxidante e antioxidante in vivo da palmatina, trolox, ácido ascórbico e combinações frente à diferentes linhagens de Saccharomyces cerevisiae.

A avaliação da capacidade antioxidante empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados significativos. Os ensaios realizados com microrganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. A avaliação da capacidade antioxidante pode ser realizada pela medida da sobrevivência de células tratadas com o antioxidante e agentes estressores (TEIXEIRA; GUARIENT, 2010).

Inicialmente foi avaliado o efeito oxidante do alcaloide isolado em relação às cepas de leveduras e constatou-se que somente a maior concentração (50 mg/mL) da palmatina induziu dano oxidativo significativo, em relação ao controle negativo, exceto para *Sod1Δ*, a linhagem mutada para a SOD citoplasmática. Nas menores concentrações esse efeito não foi observado (Tabela 9).

Com relação à análise da atividade antioxidante, ao disco central foi adicionado, além da palmatina, o peróxido de hidrogênio a fim de induzir danos oxidativos às leveduras. A palmatina foi capaz de modular os danos induzidos por peróxido de hidrogênio na linhagem SOD WT (proeficiente) para as concentrações de 25 mg/mL, 10 mg/mL e 5 mg/mL. O alcaloide modulou os danos oxidativos de H_2O_2 nas concentrações de 10 mg/mL, 5 mg/mL e 1 mg/mL para as linhagens mutadas na SOD mitocondrial e citoplasmática e para a linhagem duplo mutante *Sod1ΔSod2Δ*. Modulou a ação oxidante nas linhagens *Cat1Δ* e para *Sod1ΔCat1Δ* nas mesmas concentrações acima citadas. O alcaloide demonstrou ainda ação antioxidante para a menor concentração na linhagem selvagem (Tabela 10).

A galantamina, um potente fármaco inibidor da acetilcolinesterase, extensamente utilizado no tratamento da Doença de Alzheimer tem demonstrado importante propriedade antioxidante em modelos de estudos *in vitro*. A galantamina promoveu a redução da liberação de espécies

reativas de oxigênio, bem como da geração de radical NO^\bullet em linhagens de células humanas de neuroblastoma tratadas com H_2O_2 para indução do estresse oxidativo (EZOULIN et al., 2008). O fármaco também apresentou capacidade protetiva contra os danos oxidativos induzidos por H_2O_2 em linhagens de linfócitos humanos promovendo maior viabilidade celular (TRIANA-VIDAL; CARVAJAL-VARONA, 2013).

Achados da literatura sugerem que ainda não está elucidado um mecanismo exato para a toxicidade das placas β -amiloides, umas das principais alterações observadas em pacientes portadores da Doença de Alzheimer. No entanto, estudos apontam que a mediação da toxicidade através da ação de radicais livres é fortemente sustentada por constatações de que a vitamina C e E podem reduzir os danos causados pelas placas senis em uma extensão considerável. Algumas descobertas sugerem ainda que o estresse oxidativo, mais especificamente o fenômeno da peroxidação lipídica, não só atua como mediador da toxicidade das placas amiloides, como pode preceder a formação dessas placas em modelos animais para Alzheimer. Estudos *in vitro* demonstram também que a hiperfosforilação da proteína tau, outra alteração marcante na Doença de Alzheimer, em neurônios incubados com peptídeo β -amiloide, foi prevenida pela co-incubação dos neurônios com trolox (análogo da vitamina E) (KOPPAL, 1998; YATIN et al., 1999; KONTUSH et al., 2001; MONTILLA-LÓPEZ et al., 2002; NISHIDA et al., 2006; ALZOUBI et al., 2013; GIRALDO et al., 2014; AN; FU; ZHANG, 2015; WARNER et al., 2015; ULATOWSKI; MANOR, 2015).

As associações entre o alcaloide e os compostos antioxidantes a saber: trolox e ácido ascórbico, também demonstraram eficácia na modulação dos danos oxidativos induzidos por peróxido de hidrogênio. A análise da interação entre palmatina e o ácido ascórbico, cujos valores estão expostos na Tabela 11, demonstrou que houve modulação por parte dessa combinação frente aos danos causados por H_2O_2 em todas as concentrações (50 mg/mL, 25 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL) e em todas as linhagens testadas, apesar da significativa oxidação quando comparada ao controle negativo em $\text{Sod1}\Delta\text{Cat1}\Delta$ na concentração de 50 mg/mL. Como se pode observar através dos valores mostrados na Tabela 12 a combinação da palmatina e trolox modulou os danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 na maioria das concentrações e linhagens testadas, exceto para a maior concentração (50 mg/mL) nas linhagens $\text{Sod1}\Delta$ e $\text{Sod1}\Delta\text{Cat1}\Delta$.

Tabela 9 – Avaliação do dano oxidante da palmatina nas concentrações de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL, frente à diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Os valores correspondem a Média \pm Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens.

Linhagens	CN	CP	Palmatina 50mg/mL	Palmatina 25mg/mL	Palmatina 10mg/mL	Palmatina 5mg/mL	Palmatina 1mg/mL
SOD WT	0,75 \pm 0,47	30,75 \pm 5,058*	29,25 \pm 2,98*	28,25 \pm 5,85	27,50 \pm 9,74	17,00 \pm 3,55	9,00 \pm 3,46
Sod1 Δ	1,75 \pm 1,70	25,50 \pm 4,20**	20,25 \pm 8,53	11,50 \pm 3,87	14,00 \pm 2,44	12,00 \pm 2,30	10,25 \pm 2,06
Sod2 Δ	0,50 \pm 0,28	25,25 \pm 6,18**	24,75 \pm 11,38*	14,50 \pm 2,10	17,50 \pm 4,12	15,75 \pm 4,34	9,75 \pm 0,50
Sod1 Δ Sod2 Δ	2,75 \pm 3,59	27,00 \pm 5,09***	18,50 \pm 5,44*	15,00 \pm 1,55	11,50 \pm 2,5	12,00 \pm 3,36	12,25 \pm 0,50
Cat1 Δ	0,50 \pm 0,57	24,25 \pm 4,03***	16,75 \pm 2,36*	11,50 \pm 4,04	10,50 \pm 1,91	11,75 \pm 2,06	9,75 \pm 0,50
Sod1 Δ Cat1 Δ	1,25 \pm 1,50	22,25 \pm 4,57**	16,25 \pm 2,75*	12,00 \pm 1,82	11,25 \pm 0,95	11,50 \pm 1,73	12,25 \pm 3,94

LEGENDA: CN (controle negativo); CP (controle positivo); *p<0,05 em relação ao CN; **p<0,001 em relação ao CN; ***p<0,0001 em relação ao CN.

Tabela 10 – Avaliação da atividade antioxidante da palmatina nas concentrações de 50 mg/mL, 25mg/mL, 10mg/mL, 5mg/mL, 1mg/mL, frente aos danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ em diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Linhagens	CN	H ₂ O ₂	Palmatina 50mg/mL + H ₂ O ₂	Palmatina 25 mg/mL + H ₂ O ₂	Palmatina 10mg/mL + H ₂ O ₂	Palmatina 5mg/mL + H ₂ O ₂	Palmatina 1mg/mL + H ₂ O ₂
SOD WT	0,75 ± 0,95	38,50 ± 1,91*	31,25 ± 6,13*	29,23 ± 2,87	30,75 ± 4,64	25,25 ± 2,06	21,25 ± 2,68* ^a
Sod1Δ	1,75 ± 0,85	35,00 ± 4,76**	35,00 ± 4,24*	32,00 ± 3,65*	30,75 ± 4,78	24,50 ± 5,26	21,00 ± 5,7
Sod2Δ	0,50 ± 0,28	37,25 ± 3,77**	31,75 ± 2,06*	34,00 ± 4,69*	28,00 ± 2,44	31,75 ± 2,06	23,00 ± 2,44
Sod1ΔSod2Δ	2,75 ± 3,59	30,75 ± 1,50*	34,75 ± 3,73*	34,75 ± 6,80*	34,50 ± 3,69	27,25 ± 6,80	24,00 ± 3,55
Cat1Δ	0,50 ± 0,28	36,75 ± 4,55*	32,00 ± 4,23*	33,00 ± 4,96*	29,75 ± 9,32	27,50 ± 7,18	26,25 ± 6,50
Sod1ΔCat1Δ	1,25 ± 1,50	36,10 ± 4,97*	34,75 ± 4,99*	33,00 ± 4,96*	35,50 ± 5,196	31,25 ± 6,29	29,75 ± 6,94

Os valores correspondem a Média ± Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens.

LEGENDA: CN (controle negativo); *p<0,05 em relação ao CN; *^a p<0,05 em relação ao H₂O₂; **p<0,001 em relação ao CN.

Tabela 11 – Avaliação da atividade antioxidante da palmatina nas concentrações de 50mg/mL, 25mg/mL, 10mg/mL, 5mg/mL, 1mg/mL em interação com o ácido ascórbico frente aos danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ em diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Linhagens	CN	CP	Palmatina 50mg/mL	Palmatina 25mg/mL	Palmatina 10mg/mL	Palmatina 5mg/mL	Palmatina 1mg/mL
SOD WT	0,75 ± 1,75	39,00 ± 5,05**	30,75 ± 6,50	27,00 ± 6,05	29,75 ± 4,50	22,75 ± 6,00	23,00 ± 6,05
Sod1Δ	1,75 ± 1,70	37,00 ± 4,76**	31,50 ± 5,06	30,25 ± 11,32	29,00 ± 4,54	27,50 ± 4,04	24,75 ± 4,57
Sod2Δ	0,50 ± 0,57	37,25 ± 3,77**	32,50 ± 3,00	31,25 ± 10,11	30,75 ± 6,50	27,00 ± 6,05	28,00 ± 6,075
Sod1ΔSod2Δ	2,75 ± 3,59	37,75 ± 3,86*	35,75 ± 5,31	31,25 ± 2,98	33,75 ± 8,008	32,00 ± 9,27	27,00 ± 8,75
Cat1Δ	0,50 ± 0,28	36,75 ± 4,50*	30,50 ± 4,00	31,00 ± 10,52	29,00 ± 8,36	28,50 ± 8,58	26,75 ± 9,03
Sod1ΔCat1Δ	1,25 ± 1,50	36,00 ± 4,69*	35,25 ± 3,20*	32,25 ± 6,99	27,75 ± 2,63	30,75 ± 6,39	26,25 ± 7,13

Os valores correspondem a Média ± Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens.

LEGENDA: CN (controle negativo); CP (controle positivo); *p<0,05 em relação ao CN; **p<0,001 em relação ao CN

Tabela 12 – Avaliação da atividade antioxidante da palmatina nas concentrações de 50mg/mL, 25mg/mL, 10mg/mL, 5mg/mL, 1mg/mL em interação com o trolox frente aos danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ em diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Linhagens	CN	CP	Palmatina 50mg/mL	Palmatina 25mg/mL	Palmatina 10mg/mL	Palmatina 5mg/mL	Palmatina 1mg/mL
SOD WT	0,75 ± 0,95	39,00 ± 1,41***	30,50 ± 7,72	28,00 ± 5,71	32,00 ± 2,94	30,35 ± 4,64	23,50 ± 3,10
Sod1Δ	1,75 ± 1,70	37,00 ± 4,76**	32,00 ± 6,97*	25,00 ± 2,16	27,75 ± 7,63	22,25 ± 5,60	17,00 ± 4,96
Sod2Δ	0,50 ± 3,77**	37,25 ± 3,77*	34,50 ± 4,20	33,50 ± 4,65	28,75 ± 3,86	23,50 ± 5,74	24,75 ± 6,94
Sod1ΔSod2Δ	2,75 ± 3,5**	37,75 ± 3,86**	34,00 ± 5,83	30,25 ± 5,9	23,25 ± 2,75	28,50 ± 9,4	22,00 ± 8,12
Cat1Δ	0,50 ± 0,57*	36,75 ± 4,57*	30,00 ± 6,16	27,25 ± 6,6	24,25 ± 4,50	22,00 ± 8,08	20,00 ± 2,16
Sod1ΔCat1Δ	1,25 ± 1,50	36,00 ± 4,69**	33,00 ± 6,92*	29,25 ± 4,99	24,75 ± 3,50	23,75 ± 2,87	18,25 ± 9,60

Os valores correspondem a Média ± Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens.

LEGENDA: CN (controle negativo); CP (controle positivo); *p<0,05 em relação ao CN; **p<0,001 em relação ao CN; ***p<0,0001 em relação ao CN.

Através dos testes realizados nota-se que a palmatina não promoveu danos oxidantes às cepas de *S. cerevisiae*, excetuando-se para a concentração de 50 mg/mL e que tanto o alcaloide isolado quanto suas combinações com compostos antioxidantes foram capazes de modular os danos oxidativos causados por peróxido de hidrogênio.

Na análise comparativa entre a modulação dos danos oxidativos da palmatina e das interações com ácido ascórbico e o trolox sobre os danos causados pelo H₂O₂ em *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 5) não foi observada diferença estatística entre os efeitos antioxidantes na linhagem selvagem das leveduras, mesmo observando que a palmatina nas menores concentrações apresenta percentual de modulação de danos oxidativos superiores a 40% em SOD WT. Entretanto, em relação a linhagem Sod1Δ, diferenças significativas foram observadas para a interação palmatina + trolox na concentração de 25 mg/mL.

Com relação à Sod2Δ não houve diferenças significativas da palmatina com suas interações, mas para Sod1ΔSod2Δ a interação palmatina + trolox apresentou dados significativos para 10 e 25 mg/mL. Para a linhagem Cat1Δ diferenças significativas foram observadas na concentração de 1 mg/mL para a interação palmatina + trolox em relação à palmatina isolada e em relação à interação palmatina + ácido ascórbico. Esse efeito também foi observado para o duplo mutante Sod1ΔCat1Δ.

O efeito antioxidante foi melhor observado na interação entre palmatina e trolox ultrapassando 50% no percentual de modulação para Sod1Δ e Sod1ΔCat1Δ.

Além das ações anticolinesterásica e antioxidante *in vitro*, os achados dos testes oxidantes e antioxidantes *in vivo* destacam a palmatina, bem como suas combinações, especialmente com trolox, como interessantes estratégias terapêuticas para a Doença de Alzheimer.

Figura 5 – Percentuais de modulação dos danos oxidativos da palmatina e de sua interação com ácido ascórbico e com trolox frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em *Saccharomyces cerevisiae*.

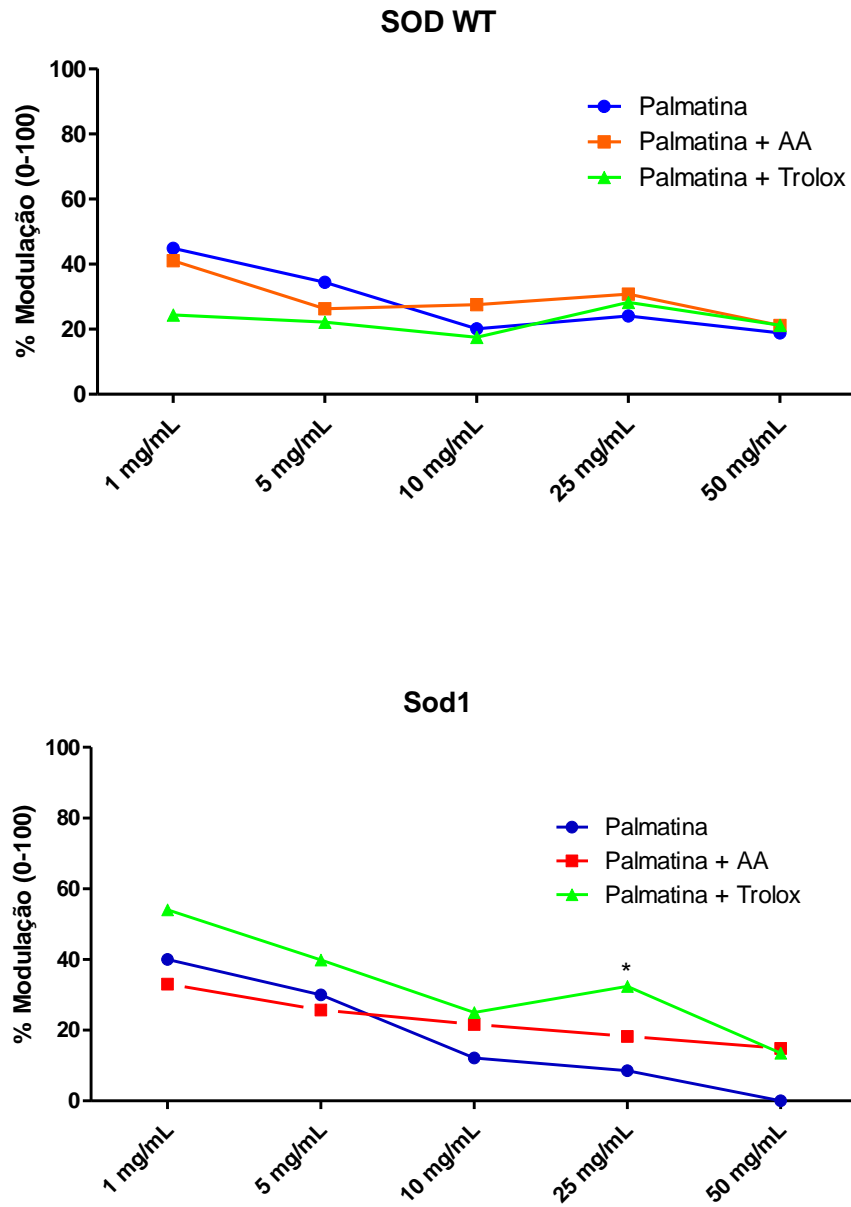


Figura 5 cont.– Percentuais de modulação dos danos oxidativos da palmatina e de sua interação com ácido ascórbico e com trolox frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em *Saccharomyces cerevisiae*.

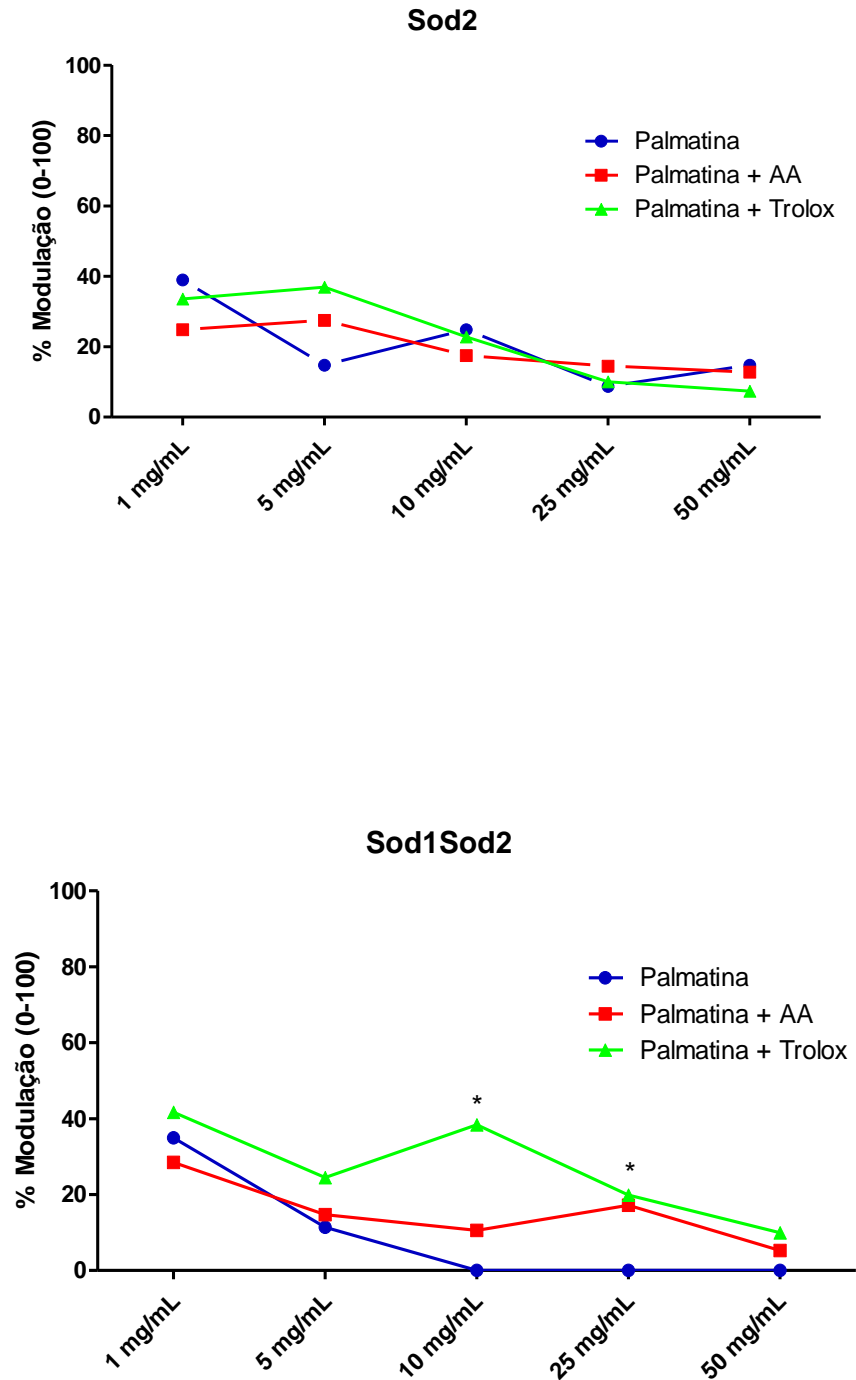
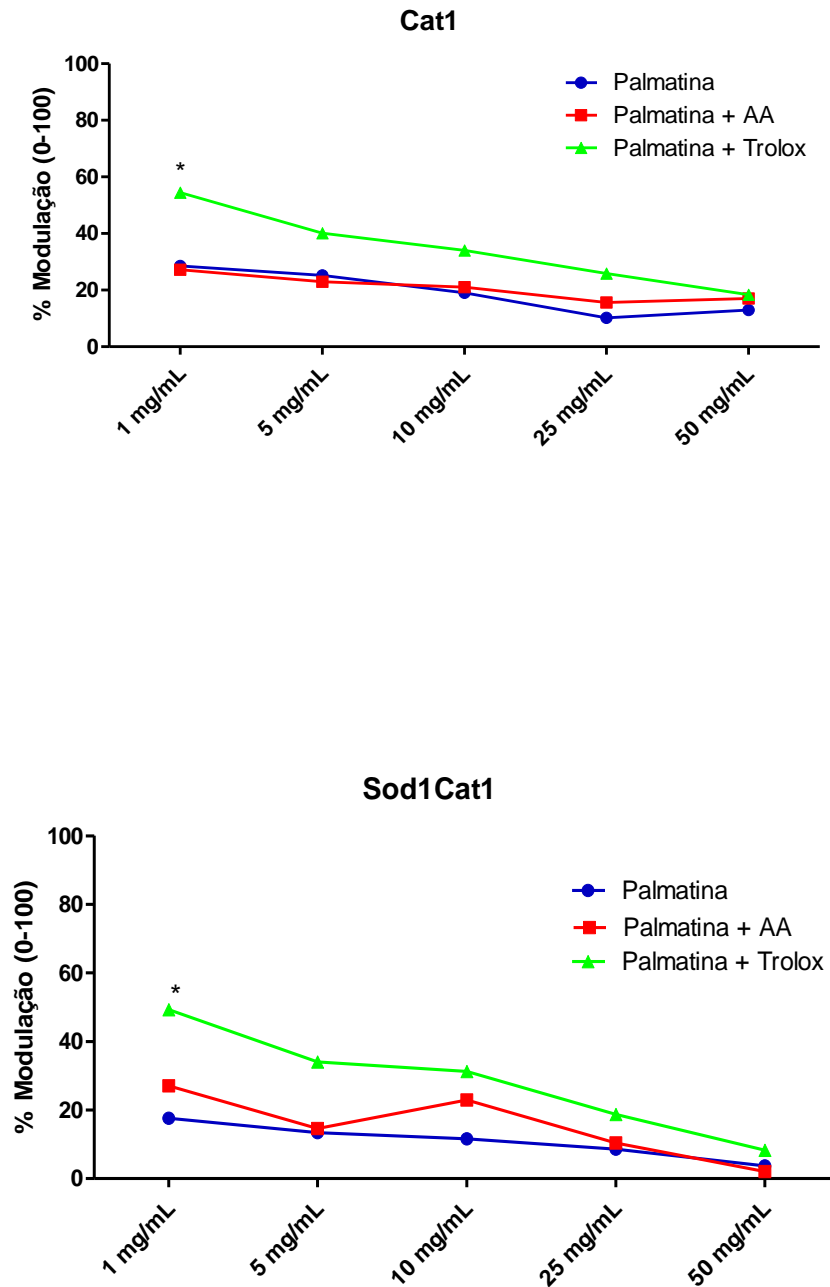


Figura 5 cont.– Percentuais de modulação dos danos oxidativos da palmatina e de sua interação com ácido ascórbico e com trolox frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em *Saccharomyces cerevisiae*.



4.0 Conclusão

Nesta pesquisa, os resultados sugerem que o composto palmatina e o trolox possuem atividade anticolinesterásica *in vitro*, apesar de a interação desses compostos, na proporção utilizada nesse estudo não otimizar a inibição da enzima, em relação ao alcaloide isolado. Verificou-se ainda que a palmatina possui importante atividade antioxidante frente a diversos radicais *in vitro*, capacidade redutora, bem como é capaz de modular os danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio em linhagens de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Ressalta-se ainda que a interação palmatina e trolox demonstrou melhor atividade na maioria dos ensaios antioxidantes *in vitro* e *in vivo* em relação à palmatina isolada. Dessa forma, a palmatina mostra-se uma interessante estratégia terapêutica para pacientes portadores da Doença de Alzheimer, pois alia tanto a ação anticolinesterásica como antioxidante, as quais são de grande importância no controle da doença.

REFERÊNCIAS

- ADEWUSI, E. A.; STEENKAMP, V. Medicinal plants and their derivatives with amyloid beta inhibitory activity as potential targets for drug discovery. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 6, p. 430–440, 2015.
- ALZOUBI, K. H.; KHABOUR, O. F.; SALAH, H. A.; HASAN, Z. Physiology & Behavior Vitamin E prevents high-fat high-carbohydrates diet-induced memory impairment: The role of oxidative stress. **Physiology & Behavior**, v. 119, p. 72–78, 2013.
- AN, L.; FU, J.; ZHANG, T. Pharmacology, Biochemistry and Behavior Reversible effects of vitamins C and E combination on cognitive deficits and oxidative stress in the hippocampus of melamine-exposed rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 132, p. 152–159, 2015.
- ANEL-LÓPEZ, L.; ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; ALVAREZ M.; MAROTO-MORALES, A.; ANEL, L.; DE PAZ, P.; GARDE, J. J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Reduced glutathione and Trolox (vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 135, n. 1-4, p. 37–46, 2012.
- BAI, H.; LIU, R.; CHEN, H. L.; ZHANG, W.; WANG, X.; ZHANG, X. D.; LI, W. L.; HAI, C. X. Enhanced antioxidant effect of caffeic acid phenethyl ester and Trolox in combination against radiation induced-oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v. 207, n. 1, p. 7–15, 2014.
- COSTA, E. V.; COSTA, E. V.; CRUZ, P. E. O.; PINHEIRO, M. L. B.; MARQUES, F. A.; RUIZ, A. L. T. G.; MARCHETTI, G. M.; CARVALHO, E.; BARISON, A.; SALES MAIA, B. H. L. N. Aporphine and tetrahydroprotoberberine alkaloids from the leaves of *Guatteria friesiana* (Annonaceae) and their cytotoxic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 5, p. 788–796, 2013.
- DHINGRA, D.; BHANKHER, A. Behavioral and biochemical evidences for antidepressant-like activity of palmatine in mice subjected to chronic unpredictable mild stress. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2014.
- EZOULIN, M. J. M. Antioxidative properties of galantamine on neuronal damage induced by hydrogen peroxide in SK-N-SH cells. **NeuroToxicology**, v. 29, n. 2, p. 270–277, 2008.
- FAGUNDES, D. S.; GONZALO, S.; ARRUEBO, M. P.; PLAZA, M. A.; MURILLO, M. D. Melatonin and Trolox ameliorate duodenal LPS-induced disturbances and oxidative stress. **Digestive and Liver Disease**, v. 42, n. 1, p. 40–44, 2010.
- FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, n. 3, p. 137–148, 2005.
- GIRALDO, E.; LLORET, A.; FUCHSBERGER, T.; VIÑA, J. A β and tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: Protective role of vitamin E. **Redox Biology**, v. 2, p. 873–877, 2014.

HALL, N. K.; CHAPMAN, T. M.; KIM, H. J.; MIN, D. B. Antioxidant mechanisms of Trolox and ascorbic acid on the oxidation of riboflavin in milk under light. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 534–539, 2010.

HAMBRIGHT, H. G.; BATTH, I. S.; XIE, J.; GHOSH, R.; KUMAR, A. P. Palmatine inhibits growth and invasion in prostate cancer cell: Potential role for pS6/NFκB/FLIP. **Molecular Carcinogenesis**, n. February, p. 1–8, 2014.

HARRAD, L. EL; AMINE, A. Enzyme and Microbial Technology Amperometric biosensor based on prussian blue and nafion modified screen-printed electrode for screening of potential xanthine oxidase inhibitors from medicinal plants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 85, p. 57–63, 2016.

HUANG, W. E. N. J.; ZHANG, X. I. A.; CHEN, W. E. I. W. E. I. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review). **Current Medicinal Chemistry**, v.21, n.3, p. 519–522, 2016.

HWANG, J.; KIM, C. M.; JEON, S.; LEE, J. M.; HONG, Y. J.; ROH, J. H.; LEE, J. H.; KOH, J. Y.; NA, D. L. Prediction of Alzheimer's disease pathophysiology based on cortical thickness patterns. **Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring**, v.2, p. 58-67, 2015.

JUNG, H. A.; MIN, B. S.; YOKOZAWA, T.; LEE, J. H.; KIM, Y. S.; CHOI, J. S. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 32, n. 8, p. 1433–1438, 2009.

KONTUSH, A.; MANN, U.; ARLT, S.; UJEYL, A.; LÜHRS, C.; MÜLLER-THOMSEN, T.; BEISIEGEL, U. S. Influence of vitamin e and c supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 3, p. 345–354, 2001.

KOPPAL, T. Vitamin E protects against Alzheimer's amyloid peptide (25 – 35)-induced changes in neocortical synaptosomal membrane lipid structure and composition. **Brain Research**, v. 9, n. 1, p. 270–273, 1998.

LEE, J.-W.; MASE, N.; YONEZAWA, T.; SEO, H. J.; JEON, W. B.; CHA, B. Y.; NAGAI, K.; WOO, J. T. Palmatine attenuates osteoclast differentiation and function through inhibition of receptor activator of nuclear factor-κb ligand expression in osteoblast cells. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 10, p. 1733–1739, 2010.

LEE, S.; PARK, E. J.; MOON, J. H.; KIM, S. J.; SONG, K.; LEE, B. C. Sequential treatment with resveratrol-trolox improves development of porcine embryos derived from parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 84, n. 1, p. 145–154, 2015.

LI, J.; WANG, X. B.; LUO, J. G.; KONG, L. Y. Seasonal variation of alkaloid contents and anti-inflammatory activity of *Rhizoma coptidis* based on fingerprints combined with chemometrics methods. **Journal of Chromatographic Science**, v. 53, n. 7, p. 1131–1139, 2015.

MAMELAK, M. Alzheimer's disease, oxidative stress and gammahydroxybutyrate. **Neurobiology of Aging**, v. 28, p. 1340–1360, 2007.

MECOCCI, P.; CRISTINA, M. Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 631–638, 2012.

MESTRES, G.; SANTOS, C. F.; ENGMAN, L.; PERSSON, C.; OTT, M. K. Scavenging effect of trolox released from brushite cements. **Acta Biomaterialia**, v. 11, n. C, p. 459–466, 2015.

MONTILLA-LÓPEZ, P.; MUÑOZ-AGUEDA, M. C.; FEIJÓO LÓPEZ, M.; MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R.; BUJALANCE-ARENAS, I.; TÚNEZ-FIÑANA, I. Comparison of melatonin versus vitamin C on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease induced by okadaic acid in neuroblastoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 451, p. 237–243, 2002.

NING, N.; HE, K.; WANG, Y.; ZOU, Z.; WU, H.; LI, X.; YE, X. Hypolipidemic effect and mechanism of palmatine from *Coptis chinensis* in hamsters fed high-fat diet. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 5, p. 668–673, 2015.

NISHIDA, Y.; YOKOTA, T.; TAKAHASHI, T.; UCHIHARA, T.; JISHAGE, K.; MIZUSAWA, H. Deletion of vitamin E enhances phenotype of Alzheimer disease model mouse. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 3, p. 530–536, 2006.

OEHLKEA, K.; HEINSA, A.; STÖCKMANN, H.; SÖNNICHSEN, F.; SCHWARZA, K. New insights into the antioxidant activity of trolox in o/w emulsions. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 781–787, 2011.

OLIVEIRA, F. R. A.; OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, J. S.; ALENCAR, M. V. O. B.; FREITAS, R. M. Technological forecasting: use of the alkaloids for the treatment of Alzheimer's disease. **Revista GEINTEC**, v. 4, p. 1017–1025, 2014.

OTA, K.; OISHI, N.; ITO, K. Effects of imaging modalities, brain atlases and feature selection on prediction of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 256, p. 168–183, 2015.

PAGLIOSA, L. B.; MONTEIRO, S. C.; SILVA, K. B.; DE ANDRADE, J. P.; DUTILH, J.; BASTIDA, J.; CAMMAROTA, M.; ZUANAZZI, J. A. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8–9, p. 698–701, 2010.

RASHED, K.; RASHED, K. N. Z.; SUCUPIRA, A. C. C.; NETO, J. M. M.; FEITOSA, C. M. Evaluation of acetylcholinesterase inhibition by *Alnus rugosa* L. stems methanol extract and phytochemical content. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 4, n.9, p. 606–609, 2013.

SAMARADIVAKARA, S. P.; SAMARASEKERA, R.; HANDUNNETTI, S. M. Cholinesterase, protease inhibitory and antioxidant capacities of Sri Lankan medicinal plants. **Industrial Crops & Products**, v. 83, p. 227–234, 2016.

TRIANA-VIDAL, L. E.; CARVAJAL-VARONA, S. M. Protective effect of galantamine against oxidative damage using human lymphocytes : A novel *in vitro* model. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 2, p. 85–92, 2013.

ULATOWSKI, L. M.; MANOR, D. Neurobiology of Disease Vitamin E and neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 84, p. 78–83, 2015.

VALE, F.; NETO, Y. C. Tratamento da doença de Alzheimer. **Dement Neuropsychol**, v. 5, n. Suppl 1, p. 34–48, 2011.

VRBA, J.; PAPOUSKOVA, B.; PYSZKOVA, M.; ZATLOUKALOVA, M.; LEMR, K.; ULRICHOVA, J.; VACEK, J. Metabolism of palmatine by human hepatocytes and recombinant cytochromes P450. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 193–198, 2015.

WARNER, T. A.; KANG, J. Q.; KENNARD, J. A.; HARRISON, F. E. Low brain ascorbic acid increases susceptibility to seizures in mouse models of decreased brain ascorbic acid transport and Alzheimer's disease. **Epilepsy Research**, v. 110, p. 20–25, 2015.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A. et al. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 78, p. 39–49, 2016.

YATIN, S. M.; ONISZCZUK, A.; ONISZCZUK, T.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Alzheimer's amyloid b-peptide associated free radicals increase rat embryonic neuronal polyamine uptake and ornithine decarboxylase activity : protective effect of vitamin E. **Neuroscience Letters**, v. 263, n. 1, p. 17–20, 1999.

**CAPÍTULO IV: Análise de interações palmartina/galantamina e acetilcolinesterase,
através de modelagem molecular com uso de ferramentas de docking molecular**

Artigo submetido na revista Química nova

Estudo computacional da interação entre Palmatina e Galantamina com o receptor Acetilcolinesterase

CHAVES, S. K. M.¹; FEITOSA, C.M.¹; COSTA, E. V.²; JUNIOR, M. P. S.³ LIMA, F. C. A.³

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.
3. Universidade Estadual do Piauí, CEP 64.002-150: Teresina, Brasil

RESUMO

A utilização de ferramentas de modelagem molecular apresenta grande vantagem para a investigação e seleção de compostos que possam ser utilizados na terapia de doenças, como por exemplo, os compostos provenientes de plantas medicinais. Análises que avaliam a interação entre fármacos e macromoléculas podem auxiliar na elucidação de mecanismos de ações e na escolha de substâncias mais promissoras durante o processo de P&D de medicamentos. Diante deste cenário, o objetivo do presente trabalho foi analisar a interação entre a palmatina e a acetilcolinesterase e da mesma enzima com galantamina, um fármaco de eficácia comprovada no tratamento da Doença de Alzheimer. Foi detectada a conformação de menor energia para a molécula de palmatina e a interação da palmatina e da galantamina com a enzima foi realizada através da docagem molecular, evidenciando as três interações mais prováveis e os aminoácidos responsáveis pela ligação. Nossos achados indicam dados promissores pois pode-se observar que alguns aminoácidos responsáveis pela ligação de galantamina como sítio ativo da enzima também estão envolvidos na interação palmatina/acetilcolinesterase, podendo-se concluir que as substâncias atuam de forma semelhante no sítio ativo da acetilcolinesterase.

Palavras-chave: Palmatina. Galantamina. Acetilcolinesterase. Docagem molecular.

ABSTRACT

The use of molecular modeling tools has great advantages for research and screening of compounds which may be used in the therapy of diseases such as, for example, compounds from medicinal plants. Analysis to assess the interaction between drugs and macromolecules can help to elucidate mechanisms of action and choice of most promising substances during the R & D process for medicines. In this scenario, the objective of this study was to analyze the interaction between palmatine and acetylcholinesterase enzyme and the same with galantamine, a drug with proven efficacy in the treatment of Alzheimer's disease. The conformation of lowest energy was detected for palmatine molecule and the interaction of

palmatine and galantamine with enzyme was carried out by molecular docking, showing the three most probable interactions and amino acids responsible for binding. Our findings show promising data as it can be observed that some amino acids responsible for binding of galantamine as the active site of the enzyme are also involved in palmatine/acetylcholinesterase interaction and can be concluded that the substances act similarly in the active site of acetylcholinesterase.

Keywords: Palmatine. Galantamine. Acetylcholinesterase. Molecular docking.

1. Introdução

A descoberta de novos fármacos é um grande desafio para a indústria farmacêutica moderna. Os altos investimentos na área de pesquisa e desenvolvimento (P&D) contrastam com o número de novos medicamentos que têm chegado ao mercado nos últimos anos. Este complexo panorama tem forçado a adoção de novas estratégias com o objetivo de aumentar a eficiência do processo de P&D, tendo como alicerces as inovações científicas, tecnológicas e empresariais. Considerando-se o expressivo número de alvos biológicos (proteínas alvo) promissores para o planejamento de fármacos, as técnicas de triagem virtual tem ocupado papel de destaque entre as estratégias modernas exploradas na identificação de novas substâncias bioativas (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

A modelagem molecular, segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias. O planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD "Computer-Assisted Drug Design"), a investigação das interações químicas de um ligante com o seu receptor e a exploração dos fatores estruturais relacionados ao efeito biológico vem sendo cada vez mais utilizados nos estudos de novas substâncias ativas (CARVALHO et al., 2003).

Um dos principais métodos atualmente utilizados para elucidar interações entre compostos e proteínas é a docagem molecular ou docking molecular. Docking molecular é o método computacional que analisa as formas de interação (conformação e orientação) de ligantes com alvos macromoleculares (proteínas ou oligômeros de DNA) prevendo a conformação do complexo ligante-proteína e compreendendo as interações entre as moléculas. Essa técnica possibilita a seleção de compostos, que apresentam um conjunto favorável de interações moleculares, com base em um determinado mecanismo ou modo de

ação, por exemplo, inibidores enzimáticos que atuam de maneira reversível através de um mecanismo do tipo competitivo (FU et al., 2016; MANAS; BAKAR; ILLIAS, 2016).

Conhecer o mecanismo de ação de uma substância é de grande importância para o descobrimento e desenvolvimento de um novo fármaco. Geralmente o fármaco tem seu efeito mediado por um alvo específico, um receptor. Caso a estrutura do complexo receptor-fármaco seja conhecida, as interações entre ambos podem ser investigadas com mais detalhes. Estudos computacionais e quantitativos que correlacionam a estrutura química e a atividade biológica de uma série de fármacos e análogos têm apontado para os mecanismos de ação e têm dado diretrizes para a síntese de novos derivados mais eficientes (COSTA; KIRALJ; FERREIRA, 2007; EL-BINDARY et al., 2016).

As enzimas são alvos biológicos extremamente importantes para o planejamento de novos fármacos, em razão do seu papel essencial em vias bioquímicas associadas a doenças e disfunções em humanos. Os inibidores enzimáticos são os candidatos a fármacos mais estudados. A acetilcolinesterase, por exemplo, é uma enzima alvo no tratamento da Doença de Alzheimer (DA), pois um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença são os baixos níveis do neurotransmissor acetilcolina (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; SU et al., 2014).

A acetilcolinesterase (AChE) (Figura 2), é uma enzima pertencente à família das colinesterases, sendo responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A AChE está presente no sistema nervoso central e periférico. No sistema periférico ela é responsável pela modulação dos impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos, pela dilatação dos vasos sanguíneos e pela contração dos músculos lisos enquanto que no central ela está envolvida no controle motor, na cognição e na memória. Essa enzima tem sido usada como modelo para a investigação da interação com uma variedade de compostos inorgânicos e orgânicos a fim de analisar interações promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos (PETRONILHO; PINTO; VILLAR, 2011; CABRAL et al., 2013).

Os inibidores de acetilcolinesterase, como a galantamina, impedem a hidrólise de acetilcolina (ACh) aumentando o tempo de meia-vida no neurotransmissor na sinapse neuronal e, portanto, atenuam a redução dos níveis do ACh em pacientes portadores da DA. Esses medicamentos melhoram a cognição e memória e indiretamente outras disfunções características dessa patologia. Devido à algumas limitações dos fármacos utilizados atualmente, por pacientes portadores da DA, a busca e o estudo de compostos inibidores da AChE cada vez mais eficazes são de grande importância para aplicação na terapia. Nesse

contexto podem ser destacados os compostos bioativos, como os alcaloides provenientes de plantas medicinais, um campo valioso na descoberta de novos medicamentos que possam atuar no tratamento de várias desordens e assim promover melhor qualidade de vida para o indivíduo (BALLARD et al., 2011; SAMARADIVAKARA et al., 2016).

Dentre os alcaloides, temos a palmatina, um membro da classe protoberberina, com uma estrutura análoga a outro alcaloide, a berberina. A palmatina é um importante composto da medicina tradicional e uma substância bioativa isolada de plantas medicinais, tais como, *Rhizoma coptidis*, *Cortex phellodendri*, *Radix tinosporae*, *Enantia chlorantha* assim como *Guatteria friesiana*. É um alcaloide usado na medicina popular para o tratamento de icterícia, hipertensão, disenteria, inflamação, doenças relacionadas ao fígado, entre outros. A substância já demonstrou possuir ação antipirética, antiviral, antimicrobiana, anti-fotooxidativa, antidepressiva, anti-inflamatória, entre outras ações farmacológicas *in vitro* e *in vivo*. Algumas dessas ações já avaliadas podem auxiliar no tratamento de várias patologias, como a própria Doença de Alzheimer (WU et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a interação da palmatina com a enzima acetilcolinesterase, por meio da docagem molecular, assim como avaliar a interação da galantamina, uma droga de eficácia clínica no tratamento da DA, com a enzima a fim de comparar ao alcaloide testado.

2. Materiais e métodos

Para realização dos estudos de interação computacional (docagem) descritas nesse trabalho foi necessário a obtenção dos modelos em computador das moléculas do receptor: acetilcolinesterase e dos ligantes: palmatina e galantamina.

2.1 Obtenção do ligante

2.1.1 Galantamina

A molécula de galantamina foi adquirida na base de dados ZINC (ID: 03872661). Após obtenção, otimizou-se a molécula por uso do cálculo Funcional de Densidade B3LYP utilizando os conjuntos de base 6-31++G (d,p), por meio do programa Gaussian98. Após análise dos resultados do cálculo de densidade, foi selecionado a molécula mais estável, que

apresentava configuração de menor energia e exportou-se a estrutura selecionada para utilizá-la no estudo.

2.1.2 *Palmatina*

A molécula de palmatina foi desenhada no programa Avogadro. Após ter seu modelo tridimensional, otimizou-se a geometria da molécula por uso do cálculo Funcional de Densidade B3LYP utilizando os conjuntos de base 6-31++G(d,p), por meio do programa Gaussian98. Após análise dos resultados do cálculo de densidade, foi selecionado a molécula mais estável, que apresentava configuração de menor energia e exportou-se a estrutura selecionada para utilizá-la no processo de docagem.

2.4 *Obtenção de acetilcolinesterase*

A molécula de acetilcolinesterase foi obtida na base de dados *Protein Data Bank* (ID: 5ehna). Após adquirida a molécula, iniciou-se a preparação para o processo de Docagem. Por meio do programa Auto Dock Tools (ADT) foi realizada uma busca pela existência de moléculas de água e estruturas proteicas repetidas. As moléculas de água existentes na estrutura foram excluídas assim como uma das partes do dímero da acetilcolinesterase, que após ter sido analisada por meio do programa Chimera, mostrou ser formado pela mesma sequência de aminoácidos.

Os parâmetros utilizados no programa foram os mesmos para os dois ligantes, assim assume-se que a análise comparativa entre as duas docagens possa ter dados mais condizentes com a realidade.

3. Resultados e Discussão

Com avanços nas áreas de estrutura e biologia molecular, as técnicas de desenvolvimento e estudo de moléculas bioativas baseadas na estrutura do receptor têm assumido grande importância. Os programas de docking molecular realizam o acoplamento da molécula do ligante no sítio de ligação da macromolécula de interesse em um processo dividido em duas etapas: geração de todas e/ou vários complexos possíveis entre a molécula do ligante e a macromolécula e posteriormente identificação entre os complexos formados aqueles que poderiam corresponder ao complexo real (KITCHEN et al., 2004; KLEBE, 2006; NOWOSIELSKI et al., 2013; ONWUDIWE et al., 2016).

Após obtenção da molécula de palmatina, otimizou-se a geometria da molécula selecionando a mais estável, que apresentava configuração de menor energia, e exportou-se a estrutura selecionada para utilizá-la no processo de docagem molecular. A escolhida foi a 71° conformação, por apresentar menor estado energético como demonstrado na Figura 1 e na Tabela 1.

Figura 1 – Diagrama de energia correlacionada com conformação obtida ao fim do cálculo Funcional de densidade.

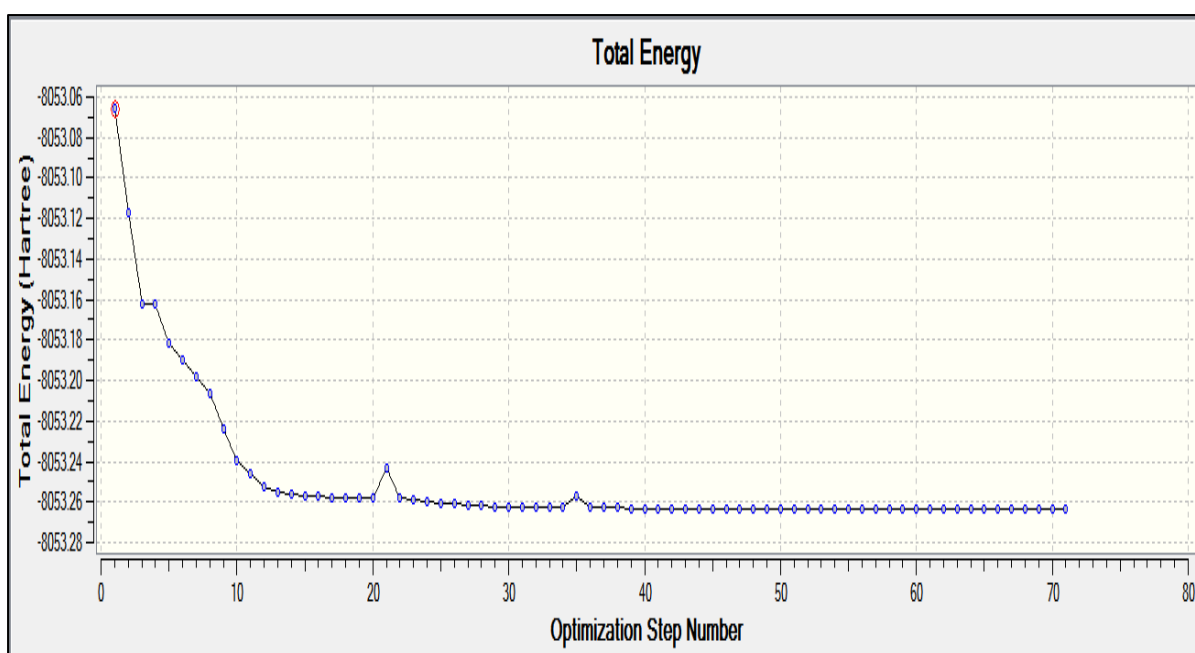


Tabela 1 – Energias das últimas conformações da molécula de palmatina.

Conformação	Energia de conformação (Hartree)
67°	-8053.26367580
68°	-8053.26367584
69°	-8053.26367588
70°	-8053.26367590
71°	-8053.26367592

Afim de obter dados mais precisos e exatos com a docagem molecular foram realizadas 50 diferentes interações, tanto para a docagem galantamina/acetilcolinesterase quanto para a docagem palmatina/acetilcolinesterase. A partir das interações obtidas, analisou-se da mais estável para a menos estável energeticamente e 3 interações mais prováveis de ocorrerem entre palmatina e enzima e galantamina e enzima foram selecionadas (Tabela 2).

A partir da análise dos dados expostos na Tabela 2 e das Figuras 6, 7 e 8 observa-se que houve interação entre a galantamina e o sítio ativo da acetilcolinesterase e, nas três melhores conformações obtidas, os aminoácidos que interagem são semelhantes, dando destaque a GLN (glutamina) 369, HIS (histidina) 405 e LEU (leucina) 540. A galantamina foi utilizada como um padrão para comparação com a palmatina por ser um alcaloide atualmente utilizado como um dos principais fármacos para o tratamento da Doença de Alzheimer em muitos países, tendo sido aprovada pela FDA em 2001 para o tratamento de pacientes que apresentam a patologia na sua forma leve a moderada (ATANASOVA et al., 2015; WU et al., 2015; ZHOU et al., 2016).

Os dados apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 3, 4, 5 demonstram que a palmatina foi capaz de interagir com o sítio ativo da AChE, local de ação relacionado ao processo de inibição da atividade da enzima, por parte dos inibidores já consagrados, como a própria galantamina. Além disso, observou-se que os aminoácidos que interagiram nas três melhores conformações encontradas foram semelhantes aos aminoácidos responsáveis pela interação entre galantamina e AChE. Através da docagem molecular foi possível identificar que os aminoácidos GLN 369, HIS 405 e LEU 540 que estavam envolvidos na interação galantamina/AChE também contribuíam para a interação ligação palmatina/AChE.

Tabela 2 – Relação de resíduos de aminoácido da enzima acetilcolinesterase que apresentaram interação com a palmatina e a galantamina nas três melhores conformações obtidas pelo processo de docagem.

Ligantes	Interação obtida	Energia de ligação	Ponte de Hidrogênio	Constante de inibição	Aminoácidos que interagem
Palmatina	1 ^a	-7,24	Não	4,93	LEU 540, LEU 536, TRP 532, HIS 405, GLN 369.
	2 ^a	-7,18	Não	5,47	LEU 540, LEU 536, HIS 405, ALA 374, GLN 369.
	3 ^a	-7,16	Não	5,63	LEU 540, LEU 536, GLY 234, TRP 532, HIS 405, ALA 374, GLN 369.
Galantamina	1 ^a	-7,86	Sim Distância: 2,227A Energia: -1,058	1,74	GLN 369, HIS 405, TRP 582, LEU 540, PRO 537, CYS 409, PRO 410.
	2 ^a	-7,81	“Não” Distância: 2,227A Energia: -0,956	1,87	GLN 369, HIS 405, TRP 582, LEU 536, LEU 540, PRO 537, CYS 409, PRO 410.
	3 ^a	-7,81	Sim Distância: 2,047A Energia: -1,927	1,89	GLN 369, HIS 405, TRP 582, LEU 536, PRO 537, CYS 409, PRO 410.

Dessa forma, é possível observar que tanto a galantamina quanto a palmatina foram capazes de se ligar ao sítio ativo da enzima no processo de docagem e que existe grande semelhança de ligação dos dois alcaloides com a enzima, inferindo-se que essas substâncias podem interagir espacialmente no mesmo sítio de ação (Figura 9).

Figura 2 – Estrutura computacional da enzima acetilcolinesterase.

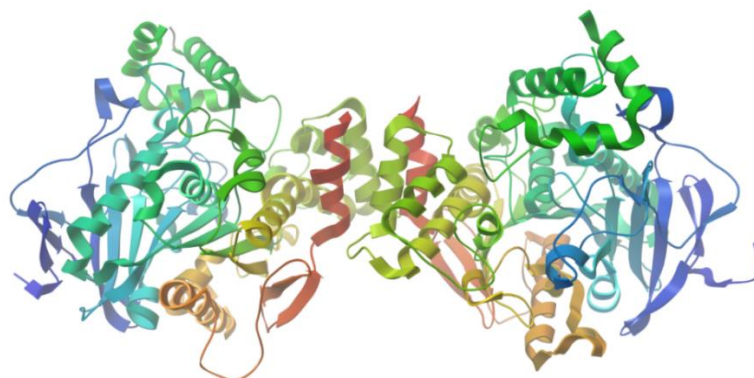


Figura 3 – Primeira conformação para a interação computacional entre palmatina e acetilcolinesterase.

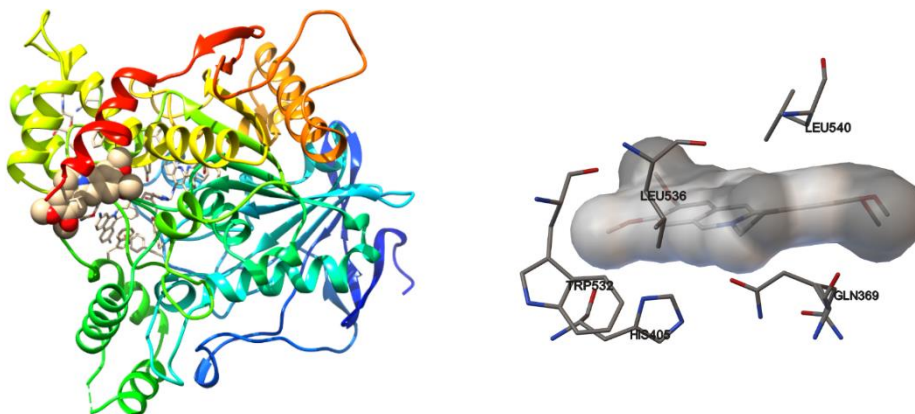


Figura 4 – Segunda conformação para a interação computacional entre palmatina e acetilcolinesterase.

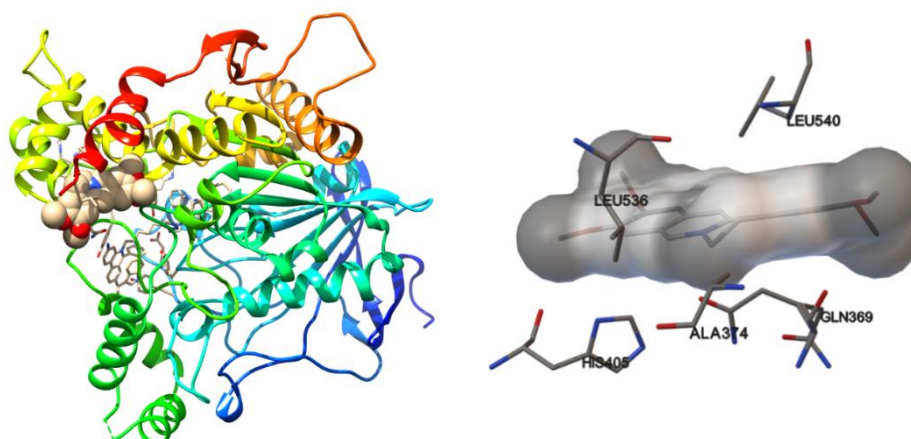


Figura 5 – Terceira conformação para a interação computacional entre palmatina e acetilcolinesterase.

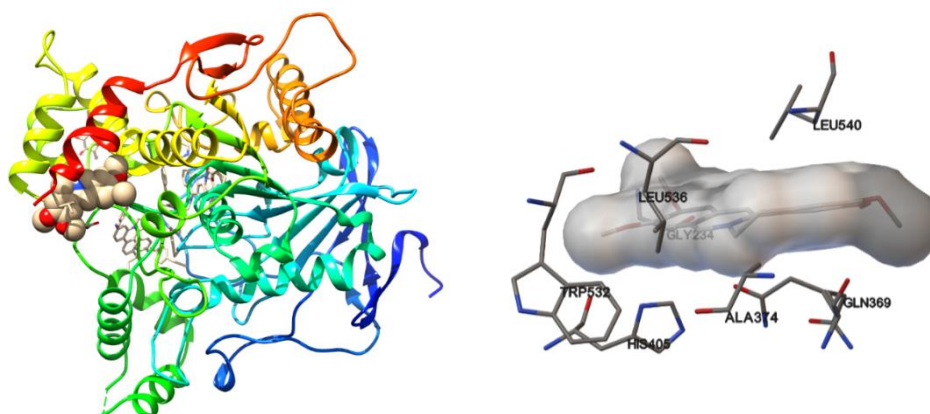


Figura 6 – Primeira conformação para a interação computacional entre galantamina e acetilcolinesterase.

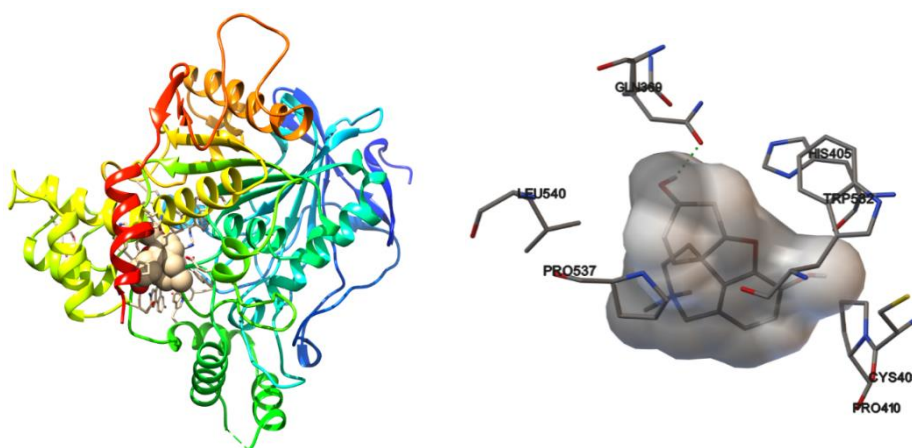


Figura 7 – Segunda conformação para a interação computacional entre galantamina e acetilcolinesterase.

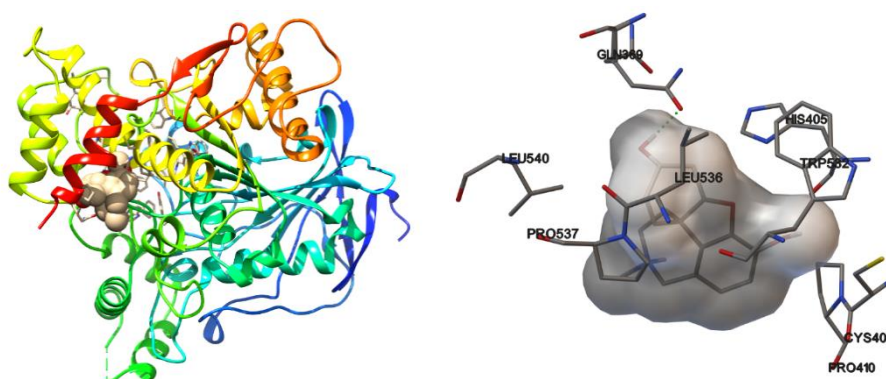


Figura 8 – Segunda conformação para a interação computacional entre galantamina e acetilcolinesterase.

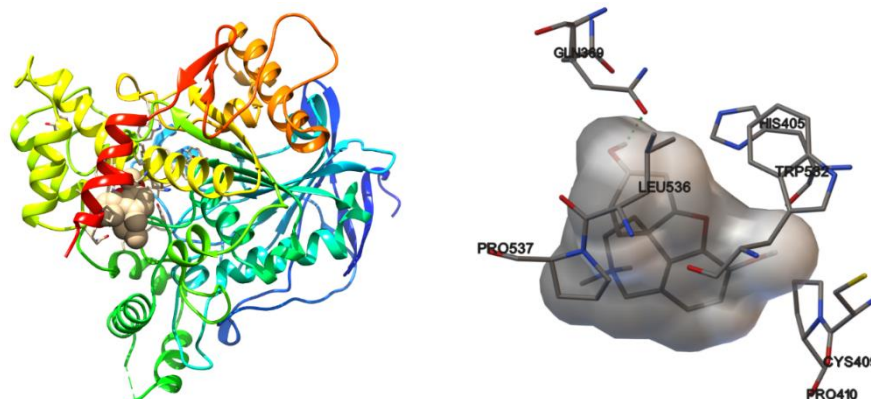
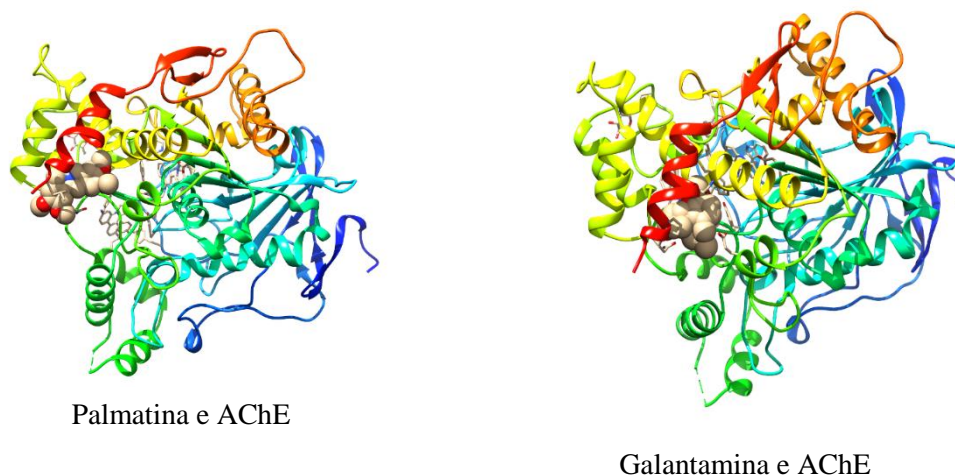


Figura 9 – Comparação entre as interações de palmatina com acetilcolinesterase e de galantamina com acetilcolinesterase



4. Conclusão

Na análise da palmatina a conformação energeticamente mais estável da molécula foi utilizada nos estudos de docagem molecular. Os resultados da docagem levaram à escolha das três principais formas de interação entre palmatina e acetilcolinesterase, assim como de galantamina e acetilcolinesterase. Pôde-se observar ainda que os aminoácidos relacionados à ligação do fármaco galantamina com a enzima também estão envolvidos na interação da substância isolada palmatina, demonstrando a relevância da substância, no que diz respeito à sua capacidade inibitória frente à acetilcolinesterase e conseqüentemente na aplicação da terapia do Mal de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- ATANASOVA, M.; STAVRAKOV, G.; PHILIPOVA, I.; ZHELEVA, D.; YORDANOV, N.; DOYTCHINOVA, I. Galantamine derivatives with indole moiety: Docking , design , synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 17, p. 5382–5389, 2015.
- BALLARD, C.; GAUTHIER, S.; CORBETT, A.; BRAYNE, C.; AARSLAND, D.; JONES, E. et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 377, n. 9770, p. 1019–1031, 2011.
- CABRAL, M. F.; BARRIOS, J. D.; KATAOKA, E. M.; MACHADO, S. A.; CARRILHO, E.; GARCIA, C. D.; AYON, A. A. Computational, electrochemical, and spectroscopic, studies of acetylcholinesterase covalently attached to carbon nanotubes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 624–629, 2013.
- CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, Á. D.; BERNARDES, L. S. C.. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428–438, 2003.
- COSTA, S.; KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 25–31, 2007.
- EL-BINDARY, A. A.; DIAB, M. A.; EL-SONBATI, A. Z.; SALEM, O. L. Geometrical , molecular docking and potentiometric studies of sulfoxine and its new azo derivative with their metal complexes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 219, p. 737–747, 2016.
- FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química nova**, v. 34, n. 10, p. 1770–1778, 2011.
- FU, L.; SUN, Y.; DING, L.; WANG, Y.; GAO, Z.; WU, Z.; WANG, S.; LI, W.; BI, Y. Mechanism evaluation of the interactions between flavonoids and bovine serum albumin based on multi-spectroscopy , molecular docking and Q-TOF HR-MS analyses. **Food Chemistry**, v. 203, p. 150–157, 2016.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.
- KITCHEN, D.B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.
- KLEBE, G.; “Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations”. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 1, p. 580-594, 2006.

MANAS, N. H. A.; BAKAR, F. D. A.; ILLIAS, R. M. Computational docking , molecular dynamics simulation and subsite structure analysis of a maltogenic amylase from *Bacillus lehensis* G1 provide insights into substrate and product specificity. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 67, p. 1–13, 2016.

NOWOSIELSKI, M.; HOFFMANN, M.; KURON, A.; KORYCKA-MACHALA, M.; DZIADEK, J. The MM2QM Tool for Combining Docking , Molecular Dynamics, Molecular Mechanics, and Quantum Mechanics. **Journal of Computational Chemistry**, v. 34, p. 750–756, 2013.

ONWUDIWEA, D. C.; EKENNIAC, A. C.; MOGWASED, B. M. S.; OLUBIYIE, O. O. Palladium (II) and platinum (II) complexes of N-butyl-N-phenyldithiocarbamate: Synthesis , characterization , biological activities and molecular docking studies. **Inorganica Chimica Acta**, v. 450, p. 69–80, 2016.

PETRONILHO, C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. 28, p. 3–14, 2011.

SAMARADIVAKARA, S. P.; SAMARASEKERA, R.; HANDUNNETTI, S. M.. Cholinesterase, protease inhibitory and antioxidant capacities of Sri Lankan medicinal plants. **Industrial Crops & Products**, v. 83, p. 227–234, 2016.

SU, Y.; WANG, Q.; WANG, C.; CHAN, K.; SUN, Y.; KUANG, H. The treatment of Alzheimer's disease using Chinese Medicinal Plants : From disease models to potential clinical applications. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, n. 3, p. 403–423, 2014.

WU, J.; XIAO, Q.; ZHANG, N.; XUE, C.; LEUNG, A. W.; ZHANG, H.; XU, C.; TANG, Q. J. Photodynamic action of palmatine hydrochloride on colon adenocarcinoma HT-29 cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 53–58, 2016.

WU, Z.; ZHAO, L.; CHEN, X.; CHENG, X.; ZHANG, Y. Galantamine attenuates amyloid- β deposition and astrocyte activation in APP/PS1 transgenic mice. **Experimental Gerontology**, v. 72, p. 244–250, 2015.

ZHOU, X.; LIN, X.; XIONG, Y.; JIANG, L.; LI, W.; LI, J.; WU, L. Chondroprotective effects of palmatine on osteoarthritis in vivo and *in vitro*: A possible mechanism of inhibiting the Wnt/ β -catenin and Hedgehog signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 34, p. 129–138, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVA

Nossos achados sugerem que a palmatina exibiu uma boa ação anticolinesterásica com CI_{50} de 0,29 $\mu\text{g/mL}$ em comparação à outras substâncias que também foram capazes de inibir a enzima, por exemplo, alguns fármacos anticolinesterásicos, como a rivastigmina. O trolox também apresentou certa ação inibitória frente à enzima, apesar da CI_{50} ter sido mais elevada do que da palmatina, e da combinação dos dois compostos não apresentar ação superior à palmatina isolada.

Pode-se concluir também que o alcaloide testado apresentou ações antioxidantes promissoras em vários testes antioxidantes *in vitro*, bem como foi capaz de modular os danos oxidativos associados à presença de peróxido de hidrogênio em diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. A associação da palmatina com os compostos antioxidantes melhorou a ação do alcaloide na maioria dos testes, concentrações e tipos de cepas, sendo a associação palmatina/trolox a que apresentou melhores resultados nos testes antioxidantes *in vitro* e *in vivo*.

No estudo da interação computacional da palmatina e de um anticolinesterásico padrão, a galantamina, com a enzima AChE, detectou-se que alguns aminoácidos responsáveis pela interação da galantamina com o sítio ativo da enzima também estão envolvidos na interação da palmatina com a AChE o que sugere que as substâncias atuem especialmente no mesmo sítio de ação e reafirmam a atividade anticolinesterásica evidenciada nos testes qualitativo e quantitativo *in vitro*.

Diante dos achados observa-se que a palmatina se apresenta como uma substância promissora e de grande interesse para a aplicação no tratamento do Mal de Alzheimer e que mais estudos com o composto devem ser realizados.

Com relação às perspectivas temos: ensaios pré-clínicos utilizando modelos experimentais da DA, ensaios toxicológicos, estudos de farmacocinética e farmacodinâmica, elaboração de formas farmacêuticas, a síntese da palmatina em laboratório e estudos clínicos.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

FEITOSA, C. M.; FEITOSA, D. M.; MELO, C. H. S.; **CHAVES, S.K.M.** Considerações Sobre a Doença de Alzheimer. In: Chistiane Mendes Feitosa. (Org.). **Plantas medicinais e a doença de Alzheimer**. Campinas: Editora Átomo, 2015, p. 103-122.

FEITOSA, C.M.; COSTA, E.V.; SILVA, V.L.; PINHEIRO, M.L.B.; MELO, C.H.S.; **CHAVES, S.K.M.**; BRITO, F.C. **Pedido de patente: Substâncias úteis na terapia da doença de Alzheimer isoladas de *Guatteria friesiana*, *Guatteria blepharophylla*, *Xylopia leavigata* e suas aplicações em formulações farmacêuticas.**

CHAVES, S. K. M.; ARAÚJO, L. S.; FEITOSA, C. M. Alkaloids Pharmacological Activities - Prospects for the Development of Phytopharmaceuticals for Neurodegenerative Diseases. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 15, p. 629 – 635, 2016.

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

ANEXOS

PUBLICAÇÃO DE ARTIGO E CAPITULO DE LIVRO

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae*Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2016, 17, 000-000

1

Alkaloids Pharmacological Activities - Prospects for the Development of Phytopharmaceuticals for Neurodegenerative DiseasesSoane K.M. Chaves¹, Chistiane M. Feitosa^{2*} and Lidiane da S. Araújo²¹University Federal of Piauí, Teresina, Brazil; ²Department of Chemistry, University Federal of Piauí, Teresina, Brazil

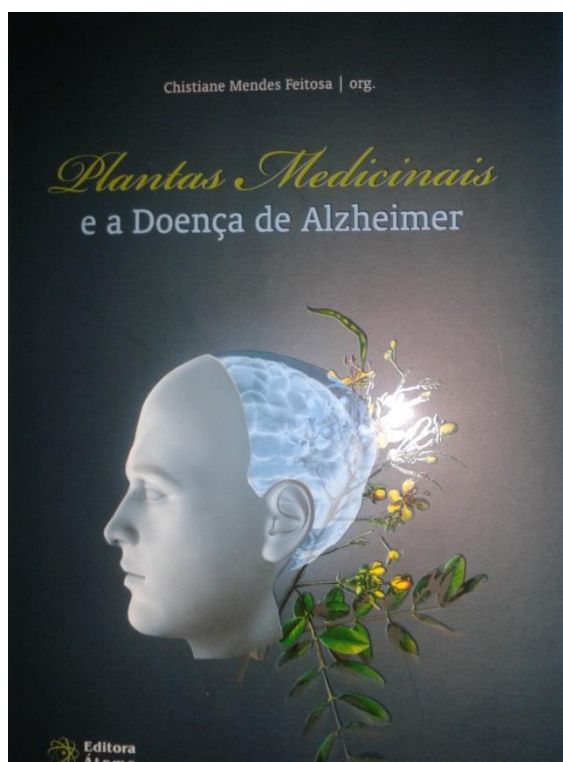
Abstract: The study of natural substances has increased in recent years in the search for compounds with pharmacological properties that can be used for the development of new drugs. The alkaloids, substances extracted natural sources, show promising pharmacological activities, including pharmacological activities for the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, whose treatment is based on the use of various drugs. Thus, the article aims to a technological prospecting of alkaloids that presented important properties in the treatment of neurodegenerative diseases, namely, antioxidant, anxiolytic, anti-inflammatory and antidepressant properties. A literature review was conducted in the databases PubMed, Science Direct, Scopus, Scielo and Google Academics using the following key words: alkaloids, pharmacology, neurodegenerative diseases, cholinesterase inhibitors, antidepressants, anti-inflammatories, anti-oxidant and anxiolytic. Articles, dissertations and theses published between 2003 and 2015 were selected. Several studies showed through *in vitro* or *in vivo* methods that many alkaloids extracted from plants showed anticholinesterase, antioxidant, anxiolytic, anti-inflammatory and antidepressant properties in the treatment of symptoms and progression of certain diseases such as Alzheimer's disease.



C.M. Feitosa

Keywords: Alkaloids, anticholinesterase, antidepressants, anti-inflammatories, antioxidant, anxiolytic, neurodegenerative disease.

CAPÍTULO DE UM LIVRO PUBLICADO EM;



CAPÍTULO DE UM LIVRO ACEITO - *OS ANTIOXIDANTES: ASPECTOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS NA TERAPIA DAS DOENÇAS* “Técnicas *in vitro* e *in vivo* para medir o potencial antioxidante dos compostos”

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245
4º andar Itaim Bibi 04531-012
São Paulo SP Brasil
Tel 55 11 3078-5366
Fax 55 11 3079-2707
www.blucher.com.br

São Paulo, 04 de julho de 2016.

CARTA DE INTERESSE

A Editora Blucher, inscrita no CNPJ 60.877.859/0001-05, IE 105.860.532.110, sediada na Rua Pedroso Alvarenga, 1245 – 4º andar, São Paulo, SP, Brasil, na figura de Edgard Blucher, declara seu interesse em publicar o trabalho organizado pela Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa, intitulado “Os antioxidantes: aspectos químicos e farmacológicos na terapia das doenças” e atesta, para os devidos fins, que tomará responsabilidade pelo projeto, em todos os processos pertinentes ao mesmo.