



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Valéria Ferreira da Costa Borba

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DE
PLANTAS MEDICINAIS NATIVAS DA CAATINGA

Recife/PE, 2012



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Valéria Ferreira da Costa Borba

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DE PLANTAS MEDICINAIS NATIVAS DA CAATINGA

Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Recife/PE, 2012

B726a Borba, Valéria Ferreira da Costa.
Avaliação in vitro da atividade anticolinesterásica de plantas
medicinais nativas da Caatinga / Valéria Ferreira da Costa Borba. –
Recife: O autor, 2012.
62 folhas : il. ; 30 cm.

Orientador: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.
Inclui bibliografia e anexo.

1. Doença de Alzheimer. 2. Acetilcolinesterase. 3. Caatinga. I.
Amorim, Elba Lúcia Cavalcanti de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2012-221)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Recife, 06 de agosto de 2012.

Defesa de Dissertação de Mestrado de **Valéria Ferreira da Costa Borba** defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 06 de agosto de 2012 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Prof^a Dr^a Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

(Depto. de Ciências Farmacêuticas-UFPE)

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Prof^a. Dr^a. Jane Sheila Higino

(Depto. de Ciências Farmacêuticas-UFPE)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino

(Depto. de Antibióticos-UFPE)

Assinatura: _____



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Sílvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitor para assuntos de Pesquisa e Pós-graduação

Francisco de Souza Ramos

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice-diretor do Centro de Ciências da Saúde

Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalci José Brondani

Vice- Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antonio Rodolfo de Faria

Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Nereide Stela Santos Magalhães

Vice- Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Ana Cristina Lima Leite

Agradecimentos

A Deus que alimenta nossa alma e nos dá todas as condições de alcançarmos a felicidade.

A minha família, meus pais, irmão e esposo por toda a dedicação e apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

A orientadora Dra. Elba Lúcia pela orientação e disponibilidade em tornar possível a realização deste projeto.

As minhas amigas Graziela Marques, Evellyn Lopes, Talita Carvalho e minha prima Mônica Ferreira por todo incentivo e amizade durante a faculdade e que se estende até hoje.

A toda equipe do Laboratório de Produtos Naturais – LAPRONAT/ UFPE que mostra união e companheirismo na realização dos projetos, em especial Daniela Cabral, Valerium Thijan, Patrícia, Tadeu Peixoto e Tiago Araújo.

A CAPES pelo suporte financeiro durante a realização deste trabalho.

Dedico este trabalho aos meus pais,
João e Betânia, meu irmão Bruno e
ao meu esposo, Enio.

Lista de Figuras

Figura 1. Hipotrofia do hipocampo na Doença de Alzheimer	18
Figura 2. Síntese e hidrólise da acetilcolina	19
Figura 3. Centro amiloide circundado por um halo de neuritos formando a placa neurítica	21
Figura 4. Mecanismo de geração da amilóide na Doença de Alzheimer	22
Figura 5. Esquematização das reações ocorridas no método de Ellman	28

Lista de Tabelas

Tabela 1. Produtos inibidores da acetilcolina de origem natural e sintética	24
Tabela 2. Material vegetal selecionado para os testes anticolinesterásicos	30
Tabela 3. Rendimentos obtidos para os extratos metanólicos	34
Tabela 4. Resultados da atividade anticolinesterasica <i>in vitro</i> das 25 espécies analisadas obtidos pelo método em CCD e em microplaca	38

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

APP - Proteína precursora amilóide

A β - Peptídeo β -amilóide

Ach – acetilcolina

AchE - acetilcolinesterase

ATCI - iodeto de acetiltiocolina

BSA - Albumina de soro bovino

CCD - Cromatografia em camada delgada

ChE - Colinesterases

DA - Doença de Alzheimer

DP- Desvio Padrão

DTNB - 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)

I-AChE – Inibidores de Acetilcolinesterase

SNC- Sistema Nervoso Central

TAU - Proteína associada a microtúbulo

TRIS - tris(hidroximetil)aminometano

Resumo

A Doença de Alzheimer acomete a região do córtex cerebral e é caracterizada por transtornos de memória, atenção, julgamento, linguagem, tomada de decisões e desorientação têmporo-espacial. A hipótese colinérgica associa os efeitos dos distúrbios cognitivos encontrados nesta doença a um déficit colinérgico e o tratamento farmacológico atual consiste em aumentar os níveis de acetilcolina no cérebro utilizando substâncias inibidoras da acetilcolinesterase. Neste contexto, a busca por alternativas mais eficazes e que tragam menos efeitos colaterais dos que os produtos existentes no mercado, têm impulsionado pesquisadores em diversas partes do mundo. O objetivo deste trabalho visou encontrar novos agentes inibidores da enzima acetilcolinesterase em extratos metanólicos de espécies de plantas medicinais nativas da Caatinga. O material vegetal foi coletado na comunidade do Caarão, município de Altinho/PE e os ensaios anticolinesterásicos em cromatografia de camada delgada e em microplaca foram baseadas no método de Ellman. Dos 25 extratos testados, apenas 4% mostraram uma potente inibição da AChE (>50% inibição), 60% moderada (30–50% inibição) e 36% foram inativas (<30% inibição). Em relação ao porte das espécies estudadas, os resultados obtidos com as ervas foi observado baixa atividade inibitória em todas as espécies analisadas. Nas espécies arbustivas apresentaram uma moderada inibição em 80% das espécies testadas. Nas arbóreas apenas uma espécie apresentou alta inibição e as demais apresentaram uma atividade inibitória variando entre 31,25 a 46,72%. Dentre as amostras com potente e moderada inibição destacara-se os extratos metanólicos das cascas do caule de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., *Schinopsis brasiliensis* Engl., *Tephrosia purpurea* (L.) Pers e *Cedrela odorata* L. Portanto se faz necessário a continuação de investimentos em pesquisas neste bioma devido ao potencial farmacológico que suas plantas apresentam.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; acetilcolinesterase; Caatinga;

Abstract

The Alzheimer disease attacks the brain cortex region and it is marked through memory disruptions, attention ones, judgment ones, language ones, decision ones and time-space disorientation. The cholinergic hypothesis associates the effects of the cognitive disorders found in this disease with a cholinergic deficit and the actual pharmacological treatment consists of increasing the levels of acetylcholine in the brain using inhibitory substances of the acetylcholinesterase. So the search for more effective alternatives which have less side effects than the products that there are in the market motivated researchers in many parts over the world. The object of his project was found new inhibitory agents of acetylcholinesterase enzyme in methanolic extracts of medicinal native plant species of the caatinga. The vegetable material was collected in Caarão community, municipality which is in Altinho/PE, and the anticolinesterásicos material was done through thin layer chromatography microplate was based in Ellman's method. Only 4 % of the 25 plant species tested showed a strong inhibition of the AChE (>50 % inhibition), 60 % moderate (30-50% inhibition) and 36% were inactive (<30% inhibition). In relation to the postage of the species studied, in the results obtained were from the herd was watched low inhibitory activity in all analyzed species. In the shrub species showed a moderate inhibition in 80% of the species tested. In the trees we obtained inhibitory potential in only one specie and the others ones showed a inhibitory activity varying from 31,25 to 46,72%. Among the samples with strong or moderate inhibition made stand out the methanol extracts of the stalk's bark of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., *Schinopsis brasiliensis* Engl., *Tephrosia purpurea* (L.) Pers e *Cedrela odorata* L.

Keywords: Alzheimer disease; acetylcholinesterase; Caatinga

Sumário

1. Introdução	12
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. Revisão da literatura.....	15
3.1 Potencial medicinal da Caatinga	15
3.2 Demências e a Doença de Alzheimer	16
3.3 As sinapses colinérgicas	18
3.4 Aspectos Gerais da Doença de Alzheimer	20
3.5 Tratamentos utilizados na Doença de Alzheimer	23
3.6 Estudos sobre atividade anticolinesterásica das plantas	25
3.7 Método de Ellman para análise da atividade anticolinesterásica	27
4. Metodologia	29
4.1 Material Vegetal	29
4.2 Obtenção dos extratos	29
4.3 Preparo das soluções	31
4.4 Materiais e Equipamentos	32
4.5 Avaliação de inibição da acetilcolinesterase em cromatografia em camada delgada	32
4.5.1 Teste Positivo	32
4.5.2 Teste Falso-positivo	33
4.6 Avaliação de inibição da acetilcolinesterase em microplaca	33
5. Resultados e Discussão	34
5.1 Obtenção e rendimento dos extratos	34
5.2 Análise da atividade anticolinesterásica em CCD.....	35
5.3 Análise da atividade anticolinesterásica em microplaca	36
6. Considerações Finais.....	41
Referências	42
Anexo	50

1. Introdução

O crescimento da população de idosos, especialmente acima dos 80 anos de idade, tem sido relativamente maior do que quando comparado à população global. Este comportamento populacional tem sido encontrado tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Com isto a prevalência mundial de doenças neurodegenerativas tende a aumentar no futuro, pois o envelhecimento representa o principal fator de risco para o aparecimento da doença como Alzheimer e demência vascular (BRASILEIRO FILHO et al, 2011).

As doenças neurodegenerativas comprometem a substância cinzenta do cérebro e são caracterizadas principalmente pela perda progressiva de neurônios com alterações secundárias associadas à substância branca. As doenças degenerativas são comumente agrupadas de acordo com a região anatômica do sistema nervoso central que são inicialmente comprometidas. A Doença de Alzheimer mostra comprometimento proeminente na região do córtex cerebral (ROBBINS, et al, 2005).

A Doença de Alzheimer (DA) geralmente inicia-se com uma síndrome demencial caracterizada por transtornos de memória, atenção, julgamento, linguagem, tomada de decisões e desorientação têmporo-espacial. Na fase final da doença os pacientes apresentam-se bastante debilitados, com incontinência urinária e fecal, hipofagia e incapacidade de andar. A doença é progressiva e óbito geralmente acontece em torno do oitavo ano da evolução, geralmente por broncopneumonia (46 a 57%), doenças cardiovasculares (16%) e embolia pulmonar (14 a 17%) (BRASILEIRO FILHO, 2011).

A hipótese colinérgica foi estabelecida em 1976, nesta associa-se os sintomas cognitivos, funcionais e comportamentais presentes na DA, com a deficiência na neurotransmissão colinérgica ligada a perda dos neurônios colinérgicos. Essa hipótese direcionou a busca por tratamentos que fornecessem melhoria de qualidade de vida para os pacientes portadores desta doença (CUMMINGS; BACK, 1998).

Pesquisa com pacientes portadores da DA e com animais manipulados experimentalmente (com lesões colinérgicas) indicaram que o neurotransmissor colinérgico, acetilcolina (ACh), estava envolvido nos processos de memória. Estes estudos além fornecerem suporte a hipótese colinérgica, proporcionaram um direcionamento na busca de substâncias colinérgicas que auxiliassem no tratamento desta desordem. Uma recente revisão realizada por Klinkenberg e colaboradores em 2011, resumiu os diversos estudos que foram

realizados com animais e humanos que dão respaldo ao papel da acetilcolina cortical na atenção e cognição. Esta revisão lista os experimentos realizados em ratos com lesões colinérgicas, estudos neurofisiológicos em ratos, estudos farmacológicos em animais e estudos de neuroimagens em humanos (KLINKENBERG, 2011).

Atualmente o tratamento farmacológico mais utilizado para esta doença consiste em aumentar os níveis do neurotransmissor acetilcolina no cérebro utilizando substâncias inibidoras da acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima é responsável por catalisar a hidrólise da acetilcolina na sinapse colinérgica entre neurônios colinérgicos. Portanto, ao inibir esta enzima, será disponibilizará uma quantidade maior deste neurotransmissor para as sinapses colinérgicas (BARBOSA FILHO, et al, 2006; BERTÉ, 2009).

As plantas medicinais há muito tempo tem sido utilizadas e valorizadas na descoberta de medicamentos para diversas finalidades. E a busca por novos agentes inibidores da enzima acetilcolinesterase em plantas medicinais tem sido realizada em diversas partes do mundo. Barbosa Filho e colaboradores (2006) realizaram um levantamento de moléculas reportadas na literatura que tem apresentado esta atividade inibitória e encontraram um total de 260 moléculas de origem natural. Os compostos testados, que tem sido isolados e identificados pertencem na maioria à classe dos alcalóides (139), monoterpenos (27), cumarinas (18), triterpenos (17), flavonóides (14), benzenóides (13), diterpenos (8), heterociclos de oxigênio (5), sesquiterpenos (5), estilbenos (3), lignanas (2), compostos sulfúricos (2), proteicos (2), policíclicos (1), quinóides (1), benzoxazinona (1), carotenóides (1) e alicíclicos (1).

Neste contexto, a busca de produtos ativos inibidores de acetilcolinesterase tem sido realizada para encontrar alternativas mais eficazes e que tragam menos efeitos colaterais dos que os produtos já existem no mercado. E o Brasil dispõe de uma variedade de espécies de plantas nativas, que podem ser investigadas quanto a esta atividade.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade anticolinesterásica *in vitro* em extrato bruto metanólico de 25 espécies plantas medicinais nativas da Caatinga do estado de Pernambuco, Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção dos extratos metanólicos das 25 espécies vegetais nativas da Caatinga;
- Realizar uma triagem nos extratos metanólicos através do ensaio qualitativo em cromatografia de camada delgada baseado na metodologia de Ellman;
- Obter o percentual de inibição da atividade anticolinesterásica através do Ensaio com Microplaca.

3. Revisão da literatura

3.1 Potencial medicinal da Caatinga

Em diversas partes do mundo há a utilização de plantas medicinais no tratamento de enfermidades que acometem a espécie humana. Esta prática é realizada desde a idade antiga e atualmente, devido ao elevado custo de muitos medicamentos, a população de muitos países pobres e em desenvolvimento, que não tem acesso à medicina moderna, tem feito uso dos produtos naturais (AGRA, et al, 2007; ELISABETSKI, 1987; SIMÕES et al., 2003).

Desde a década de 90 há publicações de trabalhos científicos que associam o conhecimento acumulado de determinada cultura sobre a medicina tradicional à investigação de compostos químicos em plantas com atividade farmacológica. Estes estudos etnodirigidos tem ganhado um enorme valor, pois companhias farmacêuticas incentivam pesquisas com o intuito de descobrir novas drogas a partir de produtos naturais utilizados em comunidades tradicionais, estratégia que no Brasil, ainda é relativamente recente (REIS et al., 2004; SEIDL, 2001).

A Caatinga é um bioma dominado por um dos tipos de vegetação cuja distribuição é totalmente restrita ao Brasil. É classificada como uma floresta seca, verde apenas durante os períodos de chuva, com arbustos espinhosos e adaptada para solos áridos. A vegetação da Caatinga contempla os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais e possui uma área de aproximadamente 734.478 km² (ALBUQUERQUE; SILVA, 2005).

A idéia de improdutividade, ou seja, de uma fonte menor de recursos naturais geralmente está relacionada às áreas áridas e semi-áridas de todo o mundo e com a caatinga, não é diferente. Comumente este bioma está associada ao fornecimento de recursos madeireiros e medicinais, e pelas formas de obtenção de alguns desses produtos da natureza, se faz necessária a proteção total das áreas remanescentes, principalmente quando se considera o uso intenso de algumas espécies com esparsa distribuição e/ou pequenas populações (ALBUQUERQUE, 2001)

A comunidade do Caarão, localizado no município de Altinho, mesorregião Agreste central de Pernambuco possui um remanescente de vegetação caducifólia espinhosa (Caatinga). Nesta região, diversos estudos etnodirigidos têm sido realizados e verificado o

imenso potencial das plantas medicinais utilizadas na medicina popular local (ABUQUERQUE et al, 2010; SILVA et al, 2011; ARAUJO et al, 2012).

Nesta região o nosso grupo de pesquisa avaliou atividade antiproliferativa, capacidade antioxidante e presença de taninos em 14 plantas do nordeste semi-árido do Brasil. Os melhores resultados de atividade antioxidantes e altos níveis de taninos foram encontrados em *Poincianella pyramidalis*, *Jatropha mollissima* e *Anadenanthera colubrina*. E as espécies *Annona muricata*, *Lantana camara*, *Handroanthus impetiginosus* e *Mentzelia aspera* apresentaram atividade antiproliferativa (MELO, et. al, 2010).

Ainda neste bioma foram analisadas diversas plantas conhecidas tradicionalmente pela comunidade com indicações antimicrobianas, antidiabéticas, antidiarréicas e sugeridas relações com a presença de metabólitos secundários como flavonoides e taninos em sua constituição (SIQUEIRA, et al., 2012). Além de outras pesquisas avaliando as atividades farmacológicas em diversas espécies vegetais nativas da Caatinga, também foi estudado as influências que este habitat poderia provocar no potencial farmacológico ao analisar as concentrações de determinado metabólito nas diferentes estações do ano (ARAUJO, et al., 2012).

Tendo em vista a importância das pesquisas com as plantas medicinais para a descoberta de novos fármacos e seu uso como fitoterápicos, e considerando o grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos é possível obter novas substâncias com propriedades terapêuticas proporcionando a população uma nova opção de tratamento de diversas doenças (GAZONI, 2009).

3.2 Demências e a Doença de Alzheimer

A classificação para demências e distúrbios do movimento, até há alguns anos atrás, eram feitas de acordo com a apresentação clínica: doença na qual a manifestação clínica principal constitui a síndrome demencial (doença de Alzheimer); doença que possui síndrome demencial associada a distúrbio do movimento (doença de Parkinson, doença de Huntington, paralisia supranuclear progressiva); doenças que apresentam exclusivamente com distúrbio do movimento (ataxia espinocerebelares). Em outros textos de Patologia essas doenças são denominadas neurodegenerativas e classificadas de acordo com a região anatômicas do SNC mais afetada: córtex cerebral, núcleos da base, sistema espinocerebelar, e neurônios motores (BRASILEIRO FILHO, 2011).

A Doença de Alzheimer foi caracterizada em 1907 por um neuropatologista alemão chamado Alois Alzheimer. Ele a descreveu como sendo uma afecção neurodegenerativa progressiva e irreversível de aparecimento insidioso, que acarreta perda da memória e diversos distúrbios cognitivos (SMITH, 1999). Esta doença, como exposto anteriormente é a principal causa de demências, sendo considerada como uma desordem sistêmica que afeta principalmente o cérebro (HARMAN, 2000).

Em cerca de 90 a 95% dos casos de DA o acometimento é tardio e esporádico, ou seja, acontece após 60 anos de idade e não tem relação familiar. A incidência de casos precoces, com pessoas por volta dos 40 anos é baixa, apenas 5 a 10% dos casos, mostrando recorrência familiar (HARMAN, 2000). A DA predomina em mulheres de idade mais avançada, tem distribuição universal e é uma das principais doenças no idoso (SMITH, 1999; BRASILEIRO FILHO, 2011).

O sistema límbico é responsável primordialmente por controlar as emoções e secundariamente participa das funções de aprendizagem e memória. Esta doença é marcada por desnervação colinérgica do córtex cerebral e nos casos mais graves nos lobos temporais e áreas límbica e paralímbica adjacentes. O hipocampo é o alvo vulnerável nesta doença e particularmente atingido precocemente (DINELEY; PARRI; HERNANDEZ, 2011).

Pallas & Camins (2006), descreveram os três estágios desta doença. O primeiro estágio caracteriza-se pelo acometimento dos neurônios colinérgicos do sistema límbico, particularmente aqueles localizados no hipocampo que correspondem à zona de memória no cérebro. Com isto há uma perda de 25% do volume resultando em perda do elo entre a memória a curto e longo prazo. No segundo estágio a perda continua na zona do hipocampo e em outras zonas do sistema límbico, neste estágio há uma perda de memória recente e dificuldade de comunicação. No último estágio, há um acometimento de cerca de 60% do hipocampo (Figura 1) e quase não é possível uma recuperação de informação (BRASILEIRO FILHO, 2011). Neste ponto, a doença ataca os neurônios colinérgicos em todo o córtex cerebral destruindo assim, as memórias ali armazenadas. A pessoa esquece seu passado, amigos e família (PALLAS; CAMINS, 2006).

Nos anos 70 a Hipótese Colinérgica sugeriu que uma disfunção de acetilcolina em neurônio no cérebro contribuía substancialmente para os sintomas da demência, como o declínio cognitivo, em pacientes com a Doença de Alzheimer (CLAASSEN, 2011; BERTÉ, 2009).

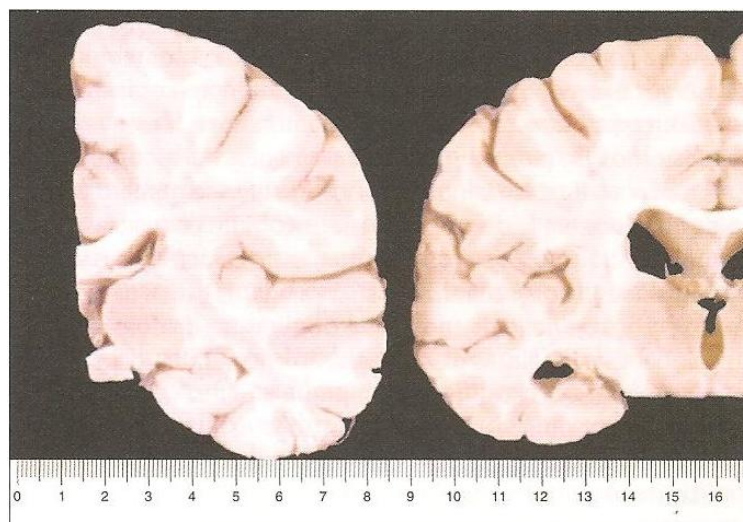


Figura 1. Hipotrofia do hipocampo na Doença de Alzheimer. Comparar com cérebro normal (à esquerda da figura) (BRASILEIRO FILHO, 2011).

Posteriormente, no início da década de 80, diversos estudos foram realizados com o objetivo de investigar o papel colinérgico na inervação e no controle dos vasos sanguíneos cerebrais desde que esses vasos aparentavam ser envolvidos por fibras nervosas oriundas tanto dos nervos da glia periféricos quanto de neurônios cerebrais intrínsecos. Baseados na importância da inervação perivascular na perfusão cerebral e sabendo que nos portadores de Alzheimer há uma perda de terminações nervosas colinérgicas perivasculares e que o fluxo sanguíneo cerebral é prejudicado, surgiu a Hipótese Colinérgica-Vascular (CLAASSEN, 2006; CLAASSEN, 2011).

3.3 As sinapses colinérgicas

A sinapse colinérgica caracteriza-se por possuir a acetilcolina como neurotransmissor. Esse tipo de sinapse é o mais comum e está em numerosas localizações no sistema nervoso, como nas sinapses entre o neurônio e neurônio no SNC, entre neurônio pré- e pós-ganglionares dos sistemas simpático e parassimpático, entre neurônio e músculo estriado(sistema nervoso dito voluntário) e entre neurônio pós-ganglionar e músculo liso ou miocárdio ou glândula (SILVA; et al, 2002).

O neurotransmissor acetilcolina é sintetizado no citosol do neurônio a partir da acetil coenzima-A e da colina. Depois de formado é se armazenado em vesículas nas terminações nervosas e é liberado na célula pré- sináptica após despolarização do neurônio colinérgico. Ao

ser liberada na fenda sináptica, a acetilcolina encontra-se com os receptores pré e pós-sinápticos, podendo ser ligada a um receptor ou degradada. Esse contato leva a ativação de vias bioquímicas dentro da célula. A ACh é um transmissor excitatório em eletroplacas de peixes elétricos, fibras musculares, gânglios autonômicos, algumas células glandulares e muitos neurônios do SNC (BERTÉ, 2009; SILVA; et al, 2002; FONSECA, 2011).

O receptores de ACh são ou estão em macromoléculas na encontradas nas membranas pré- e pós-sináptica. Estes receptores são classificados como nicotínicos e muscarínicos e a molécula da ACh possui a característica de flexibilidade, sua conformação pode variar de acordo com a afinidade específica com o tipo de receptor que tenha que interagir (XIA, WANG, 2012). Os nicotínicos estão presentes nas sinapses entre o neurônio e os músculos estriados e também nas sinapses ganglionares. Já os muscarínicos em ação nas sinapses colinérgicas neuromiocardia, neuromuscular lisa (nas vísceras), neuroglandular, neuronal (em certos circuitos do sistema nervoso (SILVA; et al, 2002).

Ao atravessar a fenda sináptica, a ACh é exposta a presença de uma enzima que hidrolisa o éster ligado a molécula, formando colina e um grupo acetato, conduzindo assim a perda da atividade estimulatória. Cerca de 50 % da colina produzida é recaptada pelo termina axônico para a síntese de mais moléculas de ACh, podendo este processo de síntese e hidrólise ser observado na Figura 2 (BERTÉ, 2009; FONSECA, 2011).

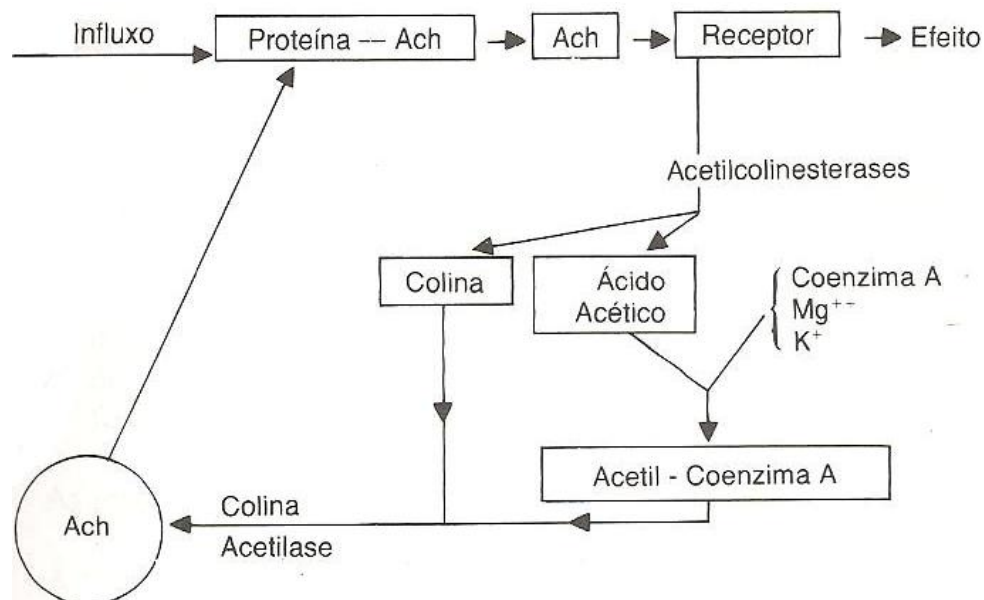


Figura 2. Síntese e hidrólise da acetilcolina. (SILVA; et al, 2002)

Estas enzimas responsáveis pela hidrólise da ACh são chamadas de colinesterases (ChE), a de maior importância é a acetilcolinesterase (AChE), também conhecida como colinesterásica verdadeira ou específica ou eritrocítica, é uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas a junção neuromuscular, possuindo um papel regulatório na neurotransmissão colinérgica. Já as pseudocolinesterase ou também chamadas de inespecíficas, se conhecem a butirilcolinesterase e a propilcolinesterase, encontradas no fígado, soro sanguíneo, cérebro, associadas a células gliais e capilares e alguns neurônios (SILVA; et al, 2002; (XIA, WANG, 2012).

Os inibidores das colinesterases (I-ChE) são as principais drogas licenciadas atualmente para o tratamento específico da DA. Seu uso baseia-se na hipótese colinérgica e visa o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina, através da inibição das suas principais enzimas catalíticas, a acetil e a butirilcolinesterase. Têm efeito sintomático discreto sobre a cognição, algumas vezes beneficiando também certas alterações não-cognitivas da demência (FORLENZA, 2005).

3.4 Aspectos Gerais da Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer é multifatorial e está associada a injúrias severas em diferentes processos bioquímicos e fisiológicos no cérebro. Os mais relatados estão relacionados a fatores genéticos, apoptose neuronal, deposição β -amilóide em placas senis e vasos cerebrais, emaranhados neurofibrilares decorrentes da hiperfosforilação da proteína TAU, e diminuição sináptica, diminuição de neurotransmissores, alterações neurotróficas, disfunção neuroimune, reações neuroinflamatórias, reações de excitotoxicidade, alteração no metabolismo do cálcio, formação de radicais livres primários ou na formação de espécies reativas cerebrovasculares (DELL'ANTONE; BRAGADIN; ZATTA, 1995; CACABELOS, et al, 2000; PASCUAL, et al, 2011).

Segundo Iqbal e colaboradores (2010) cerca de 1% dos casos de DA tem origem genética, com padrão de herança autossômica dominante, devido à mutação em determinados genes, formam proteínas alteradas:

- a) proteína precursora do amilóide (localizada o cromossomo 21);

- b) presenilina-1(localizada no cromossomo 14), o tipo familiar mais comum;
- c) presenilina-2(localizada no cromossomo 1).

Na síndrome de Down, na qual a trissomia do cromossomo 21 triplica o gene da proteína precursora do amilóide, favorece o aparecimento de alterações neuropatológicas similares às da DA nos portadores desta doença em adultos jovens e de demência em torno dos 40 a 70 anos de idade (BRASILEIRO FILHO, 2011).

Em 99% dos casos de DA são de início tardio e esporádico e não são associadas a nenhum tipo de mutação conhecida. A forma esporádica da DA está envolvida em diversos mecanismos etiopatogênicos o mais comum, associado ao alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (gene localizado no cromossomo 19), atua como fator de risco para o aparecimento da DA, todavia apenas sua presença não é necessária para o desenvolvimento da patologia. Outros fatores de risco estão associados a inflamações, traumas na cabeça, diabetes bem como baixo metabolismo de glicose cerebral (ROBBINS, et al, 2005; IQBAL, 2010);

Na DA prevalecem dois achados neuropatológicos no cérebro post-mortem que são as placas amilóides senis, principalmente compostas de depósitos extracelulares do peptídeo beta-amilóide ($A\beta$), e emaranhados intracelulares de neurofibrilas, compostos de proteína *tau* hiperfosforilada (BARRANTES, 2009; MORAES, 2008; TARAZI, 2012). Na Figura 3, é possível visualizar a deposição de placas amilóides (A) e inclusões intracelulares (B).

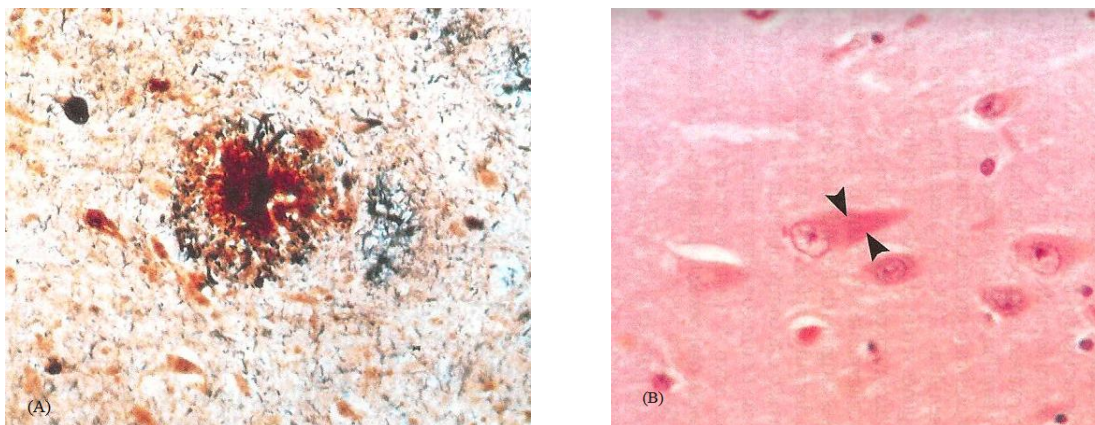


Figura 3. Centro amilóide circundado por um halo de neuritos formando a placa neurítica (A) e aglomerados de neurofibrilas no interior dos neurônio (B) (ROBBINS, et al 2005).

O peptídeo $A\beta$ é formado a partir da proteína precursora de amilóide (APP) através de clivagem enzimática pela β -secretase e γ -secretase. Em indivíduos normais o peptídeo $A\beta$ 40 representa o principal componente do total de peptídeos $A\beta$ no cérebro, no entanto em

pacientes acometidos pela doença de Alzheimer, outro tipo de peptídeo, A β 42, torna-se muito maior, causando vários prejuízos, pois este é altamente fibrinogênico e tem efeitos tóxicos aos neurônio (BARRANTES, 2009; TARAZI, 2012).

A APP é uma proteína transmembranar neuronal, com locais potenciais para clivagem por três enzimas distintas (α , β , γ -secretase), como mostrado em A, na Figura 4. O domínio A β se estende do lado extracelular da proteína até o domínio transmembranar. Quando a APP é clivada pela α -secretase (B), a clivagem subsequente pela γ -secretase não origina A β . No entanto quando a clivagem inicial é pela β -secretase, seguida pela γ -secretase (C) resulta na produção de A β , que podem então se agregar e formar fibrilas. Em qualquer das vias, a clivagem intramembranosa pela γ -secretase segue-se a clivagem em um ponto localizado mais próximo da extremidade-N da proteína (ROBBINS, et al, 2005).

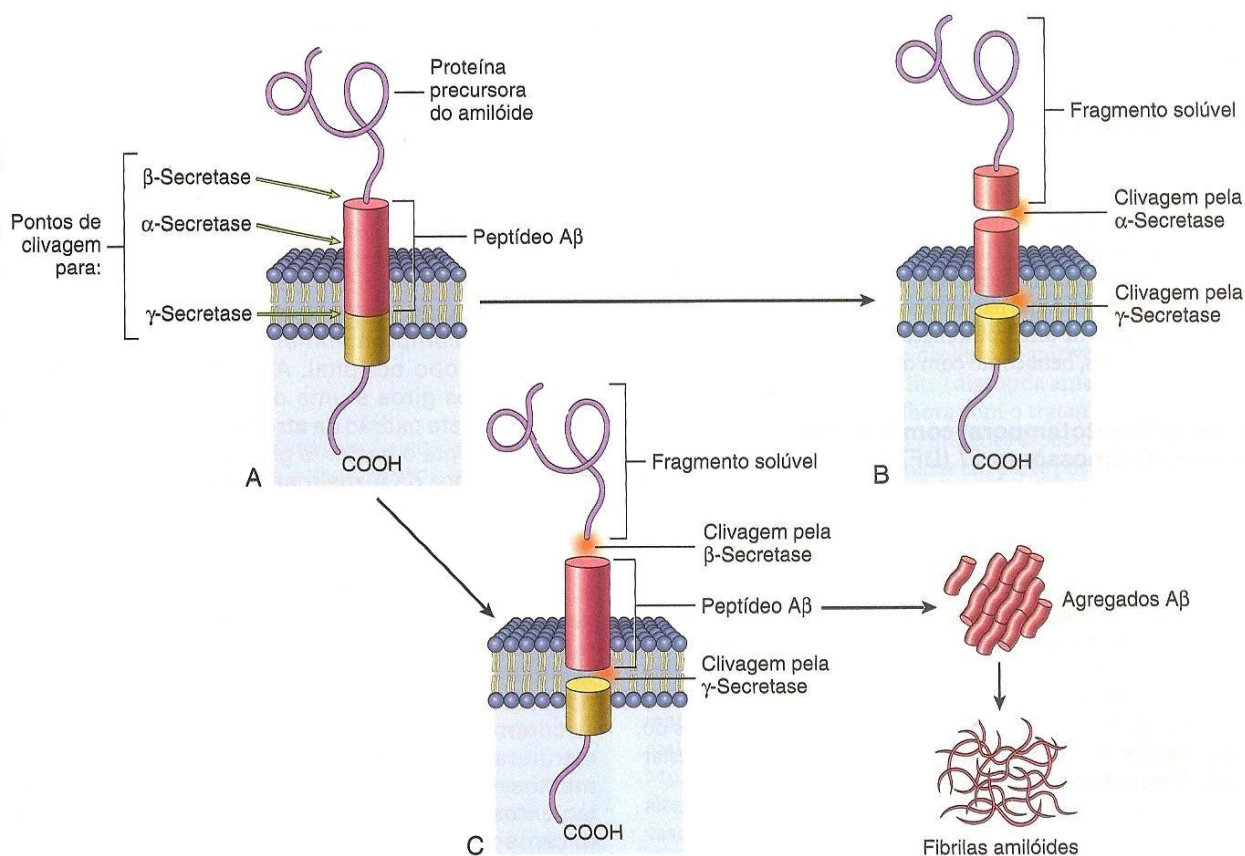


Figura 4. Mecanismo de geração da amiloide na Doença de Alzheimer (ROBBINS, et al, 2005).

Há também linhas de pesquisas que sugerem o envolvimento de receptores colinérgicos na disfunção cognitiva da DA. Estudos indicaram que os receptores muscarínicos são amplamente distribuídos em áreas cerebrais, como córtex piriforme, córtex somato-sensorial secundário, e algumas regiões límbicas, incluindo hipocampo, córtex prefrontal e

córtex motor primário sugerindo um envolvimento dos receptores muscarínicos na disfunção de cognição na DA.

Os receptores nicotínicos, também estão sendo alvo de estudos na correlação entre os receptores colinérgicos e a DA. Principalmente o receptor AChR tipo 7 que é altamente expresso em regiões no cérebro relevantes para memória e que está envolvido nos processos de informações sensoriais, como os neurônios colinérgicos do foramen basal que projetam para o hipocampo e o córtex (CLOSS, 2004; WANG, 2008; BARRANTES, et al, 2009; DINELEY, 2011; XIA; WANG, 2012).

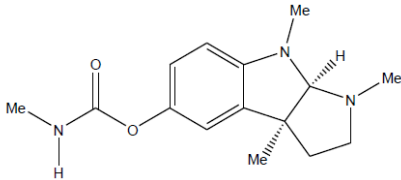
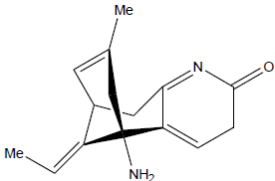
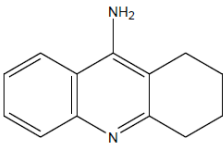
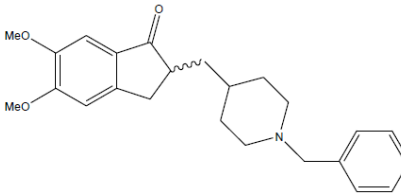
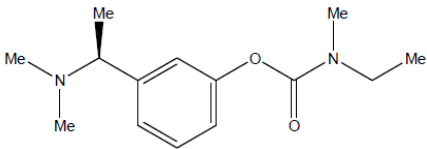
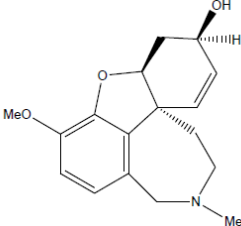
3.5 Tratamentos utilizados na Doença de Alzheimer

Pesquisas realizadas a partir da década de 70 revelaram que os sistemas cerebrais que utilizam acetilcolina encontram-se gravemente comprometidos nesses pacientes, o que serviu de base para a introdução da terapêutica de base colinérgica da doença. Os inibidores da acetilcolinesterase foram os primeiros medicamentos que demonstraram ser úteis para o tratamento da DA em ensaios clínicos controlados contra Placebo (ALMEIDA,1998)

Infelizmente, atualmente não existe um tratamento capaz de parar completamente ou retardar a progressão da doença (McDONALD; CRAIG & HONG 2011). No entanto, estes inibidores de colinesterase promovem um alívio aos sintomas e são licenciadas atualmente para o tratamento específico desta doença. São elas, a tacrina, galantamina, donepezil, rivastigmina, mostradas na Tabela 1. A resposta aos I-ChE é heterogênea, sendo que alguns pacientes beneficiam-se muito, enquanto outros, muito pouco (FORLENZA, 2005).

Outra droga que foi desenvolvida para melhorar as condições de saúde do portador da DA, foi metrifonato que é um inibidor irreversível da acetilcolinesterase. No entanto este medicamento apresentou sérios efeitos colaterais.

Tabela 1. Produtos inibidores da acetilcolina de origem natural e sintética.

Drogas	Características	Estrutura química
Fisostigmina	Alcalóide indólico isolado das sementes da espécie <i>Physostigma venenosum</i> (Fabaceae), foi o inibidor reversível de colinesterase mais estudado nas fases iniciais de desenvolvimento de fármacos antidemência. Possui efeitos hepatotóxicos (CABRAL, 2011).	
Huperzina A	Isolada primeiramente em 1986 da planta <i>Huperzia serrata</i> (thumb), utilizada na medicina chinesa. Alcalóide com potente atividade anticolinesterásica, um inibidor reversível e seletivo. Apresenta longa duração e efeitos colaterais colinérgicos periféricos mínimos, em doses terapêuticas (BARBOSA FILHO, 2006).	
Tacrina	Primeira droga aprovada nos EUA para o tratamento de DA. Amina sintética, um inibidor de colinesterase reversível que demonstrou uma melhora na cognição e comportamento dos pacientes com Alzheimer, porém apresentou efeitos colaterais severos.	
Donezepil	Derivado sintético do alcalóide piperidina, inibidor reversível que promove uma melhora cognitiva significativa e retarda os sintomas progressivos da doença. Efeitos colaterais colinérgicos como náuseas, diarreia e constipação	
Rivastigmina	Inibidor sintético e pseudo-irreversível da acetilcolinesterase do tipo carbamato, apresentou em pesquisas pré-clínicas significativa seletividade pelo sistema nervoso central (SNC), produzindo efeitos benéficos significantes para a cognição.	
Galantamina	Inibe a AChE de forma reversível, competitiva e modula de forma alostérica os receptores nicotínicos de acetilcolina. Seus efeitos colaterais incluem problemas gastrointestinais de média intensidade	

3.6 Estudos sobre atividade anticolinesterásica das plantas

O interesse em descobrir novas alternativas de tratamento para a Doença de Alzheimer tem impulsionado pesquisadores em diversas partes do mundo a realizarem testes *in vitro* e *in vivo* com produtos de origem natural para avaliar a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Alguns resultados são expostos em IC₅₀ e outros em percentual de inibição. São considerados extratos com atividade anticolinesterásica *potente* àqueles que obtiverem mais de 50% de inibição da enzima acetilcolinesterase, *moderada*, com percentuais variando entre 30 – 50% e *baixa* ou *nenhuma* inibição, resultados abaixo de 30%(STEENKAMP; ADEWUSI, 2011).

Young (2008) e colaboradores realizaram uma triagem em 17 espécies de plantas da Mata Atlântica brasileira analisando os extratos brutos etanólico de folhas e galhos para as atividades antifúngica, reparo do DNA e inibição da acetilcolinesterase. Entre as espécies analisadas os extratos de *Tetrastylidium grandifolium* (galhos) e *Sloanea guianensis* (folhas e galhos) apresentaram atividade anticolinesterásica maiores que 50% no ensaio quantitativo.

Também no Brasil, Trevisan e colaboradores (2003) realizaram um estudo de extratos (aquoso, hidroalcoólico, etanólico, metanólico, acetato de etila, clorofórmico, hexânico) de 58 plantas pertencentes a vários gêneros e famílias (*Amburana*, *Anacardium*, *Auxemma*, *Bauhinia*, *Bowdicha*, *Cecropia*, *Cordia*, *Croton*, *Dalechampia*, *Egletes*, *Lippia*, *Lonchocarpus*, *Mimosa*, *Momordica*, *Paullinia*, *Philodendron*, *Plathymenia*, *Plathymiscium*, *Protium*, *Pterodon*, *Simarouba*, *Solanum*, *Triphasia*, *Vanillosmopsis*, *Verbezina*, *Vitex*). Os melhores resultados de inibição foram encontrados nos extratos etanólicos das espécies *Amburana cearensis* (casca do caule), *Auxemma glazioviana* (caule), *Lippia sidoides* (folhas), com percentuais de inibição de 100, 100 e 77%, respectivamente. A casca do caule da espécie *Plathymenia reticulata* tendo o hexano como solvente extrator apresentou uma inibição da enzima de 88%.

A busca por inibidores de acetilcolinesterase também foi realizada na Tailândia através de extratos metanólicos de 32 espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional com as finalidades neurotônicas e de rejuvenescimento. O extratos das raízes de *Stephania suberosa* Forman. e *Tabernaemontana divaricata* (L.) R.Br. ex Roem.&Schult. na concentração de 0.1 mg/ml inibiram mais de 90% a atividade da enzima. Nesta mesma concentração obtiveram resultados satisfatórios para os extratos das folhas das espécies *Piper interruptum* Opiz.,

sementes de *Piper nigrum* L., cascas das raízes de *Butea superba* Roxb. E raízes de *Cassia fistula* L. que mostraram uma atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase entre 50 e 60% (INGKANINAN et al, 2003).

Na África do Sul, um grupo de pesquisadores analisou 12 espécies de plantas utilizadas na medicina popular para tratamento de distúrbios neurológicos. Para estas espécies foram investigadas quanto atividade anticolinesterásica e atividade antioxidante e destas cinco espécies apresentaram ativas para as duas atividades testadas (STEMKAMP; ADEWUSI, 2011)

Adersen e colaboradores (2006) na Dinamarca fizeram uma triagem pelo método colorimétrico de Ellman para identificar a atividade anticolinesterásica em 11 espécies de plantas utilizadas popularmente para melhoria da cognição e memória. Foram analisados os extratos aquosos e metanólicos destas espécies e os resultados obtidos indicaram uma significativa inibição da enzima para os extratos metanólicos de *Corydalis cava*, *Corydalis intermedia*, *Corydalis solida* ssp. *laxa* e *Corydalis solida* ssp. *slivenensis*.

Em geral a família *Solanaceae* tem sido bastante citada em trabalhos por algumas de suas espécies apresentarem uma forte atividade inibidora da AChE, como é o caso da *Withania somnifera* (PRASHANTH et al, 2007). Na Colômbia através de uma triagem em espécies de 5 famílias (*Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Melastomataceae*, *Rubiaceae* e *Solanaceae*) e os melhores resultados para a inibição desta enzima foram para os extratos metanólicos de *Solanum leucocarpum* Dunal (IC_{50} = 204.59 mg/l) e *Witheringia coccoloboides* (Damm.) Hunz (IC_{50} = 220.68 mg/l), pertencentes à família *Solanaceae* (NIÑO, 2006).

Na Índia foram avaliados os extratos aquosos e metanólicos de algumas espécies de plantas medicinais tradicionais da Índia utilizadas para tratamento do declínio cognitivo, aumento da memória ou relatadas por exibir atividade no Sistema Nervoso Central. Dos 38 extratos metanólicos testados, apenas 15.7% mostraram uma potente inibição da AChE (>50% inibição), 5.2% moderada (30–50% inibição) e 78.95% foram inativas (<30% inibição). Dentre as amostras com potente inibição destacaram-se os extratos metanólicos de *Semecarpus anacardium*, *Embelia ribes*, *Withania somnifera*, *Nardostachys jatamansi*, *Ficus religiosa* e *Tinospora cordifolia* (PRASHANTH, 2007).

Óleos essenciais, extratos etanólicos e decoctos de 10 espécies oriundas do interior de Portugal também foram investigadas quanto à inibição da acetilcolinesterase. Das espécies analisadas algumas são utilizadas na medicina popular como *Melissa officinalis*, *Paronychia*

argentea, *Sanguisorba minor*, *Hypericum undulatum* e *Malva silvestris*, outras com finalidade de condimentos, *Laurus nobilis* and *Mentha suaveolens* e por último as espécies aromáticas *Salvia officinalis*, *Lavandula angustifolia* e *Lavandula pedunculata*. Os melhores resultados de inibição obtidos para as frações de óleos essenciais foram para *Melissa officinalis* e *Mentha suaveolens* com percentual de inibição acima de 50%. *Laurus nobilis*, *Hypericum undulatum*, e *Sanguisorba minor* mostraram atividade semelhante nas frações etanólicas com valores de inibição de 64%(1 mg/mL), 68%(0.5 mg/mL) e 78%(1 mg/mL), respectivamente. Já para os decoctos as espécies *Lavandula pedunculata*, *Mentha suaveolens* e *Hypericum undulatum* apresentaram 68, 69 e 82% (5 mg/mL), respectivamente (FERREIRA, et al, 2006) .

Diante destes estudos pela busca de novas alternativas terapêuticas para a doença de Alzheimer no mundo e com a rica variedade de espécies de plantas nativas da Caatinga desenvolvemos este trabalho com objetivo de encontrar possíveis agentes inibidores da acetilcolinesterase em nossa região.

3.7 Método de Ellman para análise da atividade anticolinesterásica

O método fotométrico de Ellman e colaboradores descrito em 1961 é bastante difundido e muito utilizado em diversas análises atualmente.

O princípio deste método consiste em determinar a atividade anticolinesterásica através da mensuração da taxa de produção de tiocolina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase, equação mostrada na Figura 5. Com a continuação da reação, o produto formado, tiocolina, e o reagente de Ellman, ácido 5,5 – ditiois-2-nitrobenzóico (DTNB), reagem produzindo o ânion amarelo. A taxa da produção do composto colorido é realizada em espectrofotômetro UV/VIS em 412 ou 405nm. Este método é bastante sensível e pode ser aplicado a pequenas quantidades de tecido e em baixas concentrações da enzima. O substrato utilizado é a acetiltiocolina, análogo do substrato natural. (ELLMAN, 1961).

Baseados no princípio da reação descrita por Ellman, Rhee e colaboradores (2001) desenvolveram um método para detecção de substâncias inibidoras através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Este método qualitativo é bastante útil para realização de triagem em diversas amostras ao mesmo tempo e possui a vantagem da rapidez nos resultados, além das informações como a localização desta atividade em extratos e frações (SEIDL, 2010; REIST, 2008).

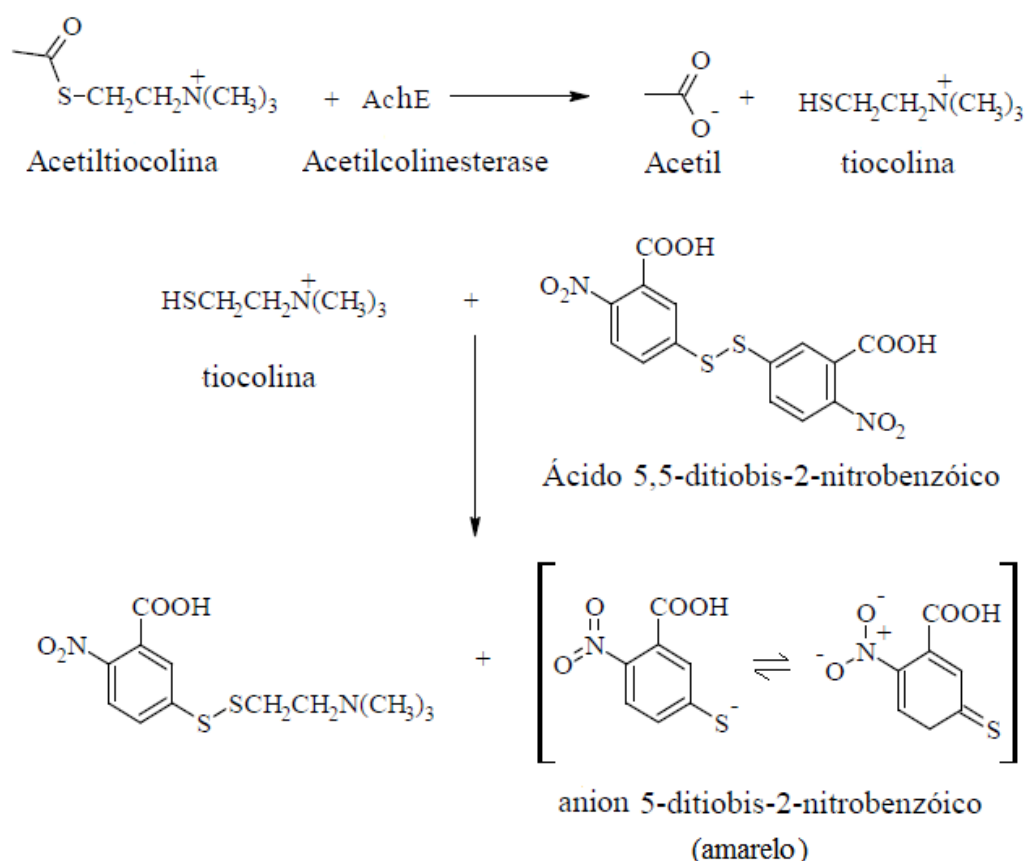


Figura 5. Esquematização das reações ocorridas no método de Ellman.

Há também outro método que realiza uma triagem da atividade anticolinesterásica utilizando a cromatografia em camada delgada, baseado em uma reação diferente onde o reagente acetato de naftila é o substrato que sofre quebra pela acetilcolinesterase formando o 1-naftol, o qual continua a reagir com o reagente colorimétrico sal Fast Blue B para formar um sal de diazônio de coloração violeta. Bem como na metodologia de Ellman (1961) modificada por Rhee(2001), os inibidores são diretamente detectados na cromatoplaça pela formação de manchas brancas sobre o fundo, neste caso, violeta. Esse método foi desenvolvido por Martson e colaboradores em 2002 (MARTSON, et al, 2002).

Irth (2006) descreve uma metodologia para triagem para inibidores da acetilcolinesterase em extratos naturais através de Cromatografia Líquida de Alta Performance – espectrometria de massa, baseado no mesmo princípio de Ellman. Além deste, outros métodos surgiram, como ensaios fluorimétricos utilizando subtratos fluorogênicos (Rhee et al., 2003a), detecção potenciométrica ou eletroquímica (Kaneda et al., 1985), mas a maioria destes possui o mesmo princípio de Ellman.

4. Metodologia

4.1 Material Vegetal

As plantas para o estudo foram selecionadas a partir de um banco de dados, previamente realizado pelo Laboratório de Etnobotânica Aplicada, localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco. O critério de escolha das plantas baseou-se nos ensaios dos respectivos extratos, já em estudos no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE. A tabela 2 relaciona as espécies selecionadas, indicando a parte utilizada nos experimentos. As excidatas foram depositadas no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho, localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

As coletas foram realizadas em um remanescente de vegetação caducifólia espinhosa (Caatinga) localizado no município de Altinho, mesorregião Agreste central de Pernambuco. Este município encontra-se há 163 km do Recife, possui área total de 454.486 km² e clima Bsh (semi-árido quente) (IBGE, 2000). Seus limites estendem-se ao norte com Caruaru e São Caetano, ao sul Ibirajuba, Panelas e Cupira, a leste Agrestina e a oeste, Cachoeirinha.

A coleta das espécies foi realizada na zona rural deste município, mais precisamente na comunidade de Carão (08°35'13,5"S e 36°05'34,6"W) a 469 m acima do nível do mar, localizada a 16 km do centro urbano.

As partes das plantas selecionadas para este estudo foram baseadas nos usos populares destas plantas e em estudos fitoquímico realizados em trabalhos anteriores da equipe do nosso laboratório indicaram a presença de alcalóides em algumas espécies o que poderia oferecer maior probabilidade de encontrar atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase. Com isto foram utilizadas folhas, raízes, tronco e cascas de caule como especificado na Tabela 2 a seguir.

4.2 Obtenção dos extratos

As amostras, de no mínimo três indivíduos, foram coletas com base nas partes indicadas popularmente, secas a temperatura ambiente, trituradas, submetidas à extração por solvente metanólico ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. O solvente foi removido sob pressão reduzida. Os rendimentos da extração também foram calculados.

Tabela 2. Material vegetal selecionado para os testes anticolinesterásicos.

Espécie	Família	Nome Popular	Hábito	Parte Usada
<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A. C. Sm.	<i>Fabaceae</i>	Cumaru	Árvore	Casca
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	<i>Mimosaceae</i>	Angico	Árvore	Casca
<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.	<i>Caesalpiniaceae</i>	Jucá	Árvore	Casca
<i>Cedrela odorata</i> L.	<i>Meliaceae</i>	Cedro	Árvore	Casca
<i>Cereus jamacaru</i> DC.	<i>Cactaceae</i>	Mandacaru	Árvore	Tronco
<i>Chloroleucon extortum</i> Barneby & J.W. Grimes	<i>Mimosaceae</i>	Jurema branca	Árvore	Casca
<i>Croton blanchetianus</i> Baill.	<i>Euphorbiaceae</i>	Marmeleiro	Arbusto	Casca
<i>Erythrina velutina</i> Willd.	<i>Fabaceae</i>	Mulungu	Árvore	Casca
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	<i>Caesalpiniaceae</i>	Jatobá	Árvore	Casca
<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill.	<i>Euphorbiaceae</i>	Pinhão-bravo	Arbusto	Casca
<i>Manihot dichotoma</i> Ule	<i>Euphorbiaceae</i>	Maniçoba	Arbusto	Casca
<i>Maytenus rigida</i> Mart	<i>Celastraceae</i>	Bom nome	Árvore	Casca
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	<i>Mimosaceae</i>	Jurema preta	Árvore	Casca
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	<i>Anacardiaceae</i>	Aroeira	Árvore	Casca
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	<i>Solanaceae</i>	Pára raio	Arbusto	Folhas
<i>Rhamnidium molle</i> Reissek	<i>Rhamnaceae</i>	Sassafráz	Árvore	Casca
<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	<i>Anacardiaceae</i>	Baraúna	Árvore	Casca
<i>Serjania lethalis</i> A. St.-Hil.	<i>Sapindaceae</i>	Ariú	Erva	Folhas
<i>Sideroxylum obtusifolium</i> (Roem. & Schult.) T.D. Penn	<i>Sapotaceae</i>	Quixaba	Erva	Casca
<i>Solanum aculeatissimum</i> Jacq.	<i>Solanaceae</i>	Gogóia	Erva	Completa
<i>Spondias tuberosa</i> Arruda	<i>Anacardiaceae</i>	Umbú	Árvore	Casca
<i>Syagrus</i> sp.	<i>Arecaceae</i>	Catolé	Árvore	Raiz
<i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Standl.	<i>Bignoniaceae</i>	Pau d'arco	Árvore	Casca
<i>Tephrosia purpurea</i> (L.) Pers.	<i>Fabaceae</i>	Sena	Arbusto	Folhas
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	<i>Rhamnaceae</i>	Juá	Árvore	Casca

4.3 Preparo das soluções

- Soluções Tampão

Tampão A: 50 mM Tris/HCl pH 8, Tampão B: 50mM Tris/HCl pH 8, contendo 0,1% Albumina sérica bovina (BSA), Tampão C: 50 mM Tris/HCl pH 8, contendo 0,1M de NaCl e 0,02 M de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

-Enzima

Acetilcolinesterase Tipo VI-S obtida de *Electroparus electricus* (pó liofilizado, 292 U/mg sólido, 394 U/mg proteína, Sigma-Aldrich, lote: 041M7009V). Foi utilizada na concentração de 5U/mL em Tampão A para CCD e 0,22U/mL em Tampão B para microplaca.

- Substrato

Iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (Sigma-Aldrich®, lote: BCBB6404) foi o substrato utilizado nos ensaios. Para CCD foi utilizado a uma concentração de 1mM de ATCI em Tampão A, e para microplaca a 15 mM em água Millipore.

- Reagentes colorimétricos

Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®, lote: 67496HVM) ou reagente de Ellman foi utilizado nos ensaio a 1mM em Tampão A para o ensaio em CCD e em microplaca 3 mM em tampão C.

-Inibidor anticolinestrerásico de referência

Fisostigmina (Eserina base livre, Sigma Aldrich, lote: BCBC4171V) na concentração de 0,027mg/mL para ambos os testes.

4.4 Materiais e Equipamentos

- Placas de cromatografia em camada delgada:

- Placas de Óxido de alumínio para cromatografia de camada delgada DC - KArten ALF, 0,2 mm de espessura, Riedel-deHaën.
- Placas de Sílicagel 60 F254, 0,2 mm DC-Alufolien Merck.

- Leitor de Microplaca

Placas de poliestireno com 96 poços (300 µl/TPP®) e o equipamento Leitora automática de microplacas 96 poços ThermoPlate (Mod. TP-Reader) foi utilizada para medir a absorvância em 412 nm para a reação enzimática no ensaio em microplaca.

4.5 Avaliação de inibição da acetilcolinesterase em cromatografia em camada delgada

Os extratos brutos das amostras foram analisados na concentração de 10mg/mL em metanol para a cromatografia em camada delgada. Utilizou-se placas de óxido de alumínio (Riedel-deHaën.) e placas de sílica gel, usando como sistema eluente a mistura de CHCl_3 :MeOH, 8:2 v/v. Como controle positivo de inibição da acetilcolinesterase foi utilizado a fisostigmina 0,027mg/mL em metanol.

4.5.1 Teste Positivo

Alíquotas de 2,5µL de cada amostra e do padrão foram aplicadas na placa de sílica gel e também na placa de óxido de alumínio. Após o desenvolvimento da cromatografia pelo eluente, a atividade inibitória das amostras foram avaliadas pelo método de Ellman, (1961) modificado por Rhee, 2001, onde borrifa-se a placa com as soluções de 1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2- nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman) e 1 mM de iodeto de acetilticolina (ACTI) aguardando por 3 min. Após secar, borrifou-se a enzima 3 U/mL e, em 10 min, apareceu a coloração amarela, mas onde houve inibição da enzima, observou-se um halo branco. Esta coloração desaparece em torno de 20 - 30 min.

4.5.2 Teste Falso-positivo

Da mesma forma que o teste anterior alíquotas de 2,5µL das mesmas amostras e do padrão foram aplicadas na placa de sílica gel e também na placa de óxido de alumínio. Após o desenvolvimento da cromatografia pelo eluente, a atividade inibitória das amostras foram avaliadas pelo método de Rhee e colaboradores(2003), onde borrifa-se a placa com as soluções de 1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2- nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman) e 1 mM de iodeto de acetiltiocolina (ACTI) aguardando secar por 3 min.

Após secar, borrifou-se a placa com uma sequência diferente dos mesmos reagentes do teste positivo. Primeiro foi borrifado a solução de reagente de Ellman e, após secagem, uma solução de substrato (ACTI) e da enzima AChE 3 U/mL pré-aquecida a 37 °C por 10 minutos, foi borrifada na placa. Em alguns minutos apareceu a coloração amarela na placa, observou-se se houve a presença de halos brancos.

Este teste deve ser feito concomitantemente com teste positivo para poder diferenciar se as manchas brancas são resultantes de inibição ou houve inibição química entre a tiocolina e o DTNB (Rhee et al., 2003b).

4.6 Avaliação de inibição da acetilcolinesterase em microplaca

A avaliação da atividade inibitória da AchE foi baseado no método de Ellman(1961) modificado por Rhee (2001) que utiliza uma Leitora automática de microplacas 96 poços ThermoPlate (Mod. TP-Reader), absorvância a 412nm. Neste teste nas 96 cavidades da placa, adicionaram-se 25 µL de ATCI 15mM em água; 125 µL de DTNB ou reagente de Ellman 3mM em Tampão C; 50 µL de Tampão B; 25 µL da amostra(10mg/mL) a ser analisada, dissolvida em MeOH, diluída 10 vezes em Tampão A; mediu-se a absorvância a cada 18 s por 9 vezes. Adicionou-se 25 µL da enzima AchE(0,22 U/mL); mediu-se novamente a absorvância a cada 18 s por 9 vezes.

Os aumentos em absorvância, devido à hidrólise espontânea, foram corrigidos através da subtração da absorvância da reação antes de se adicionar a enzima com a absorvância da reação depois de se adicionar a enzima. A porcentagem de inibição calculou-se pela comparação das absorvâncias das amostras em relação ao branco (10% MeOH no tampão A) pela equação utilizada por Steenkamp, e colaboradores (2011).

Neste teste a enzima hidrolisou o substrato acetiltiocolina, gerando como produto a tiocolina, que reage com o reagente de Ellman, produzindo 2-nitrobenzoato-5-mercaptopiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato, que podem ser detectados a 412 nm.

5. Resultados e Discussão

5.1 Obtenção e rendimento dos extratos

A extração do material vegetal seja casca de caules, folhas, raízes e caules das amostras foi realizada com 5g do material vegetal para 100 mL de metanol em maceração por 72h e em seguida o material foi submetido à rotaevaporação e os rendimentos obtidos estão expostos na Tabela 3.

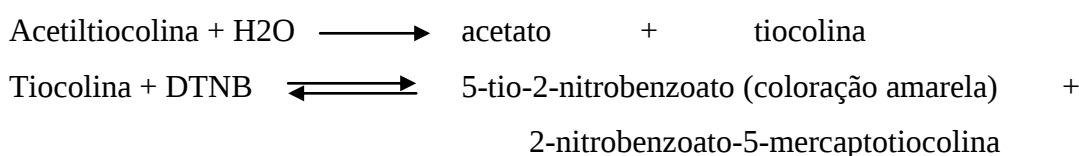
Tabela 3. Rendimentos obtidos para os extratos metanólicos.

Espécie	Parte Usada	Rendimento (%)
<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A. C. Sm.	Casca	16,33
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	Casca	60,63
<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.	Casca	37,65
<i>Cedrela odorata</i> L.	Casca	22,84
<i>Cereus jamacaru</i> DC.	Tronco	1,80
<i>Chloroleucon extortum</i> Barneby & J.W. Grimes	Casca	9,34
<i>Croton blanchetianus</i> Baill.	Casca	14,7
<i>Erythrina velutina</i> Willd.	Casca	31,18
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Casca	33,02
<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill.	Casca	39,87
<i>Manihot dichotoma</i> Ule	Casca	5,00
<i>Maytenus rigida</i> Mart	Casca	32,62
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	Casca	26,10
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	Casca	35,95
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	Folhas	28,00
<i>Rhamnidium molle</i> Reissek	Casca	7,96
<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	Casca	30,55
<i>Serjania lethalis</i> A. St.-Hil.	Folhas	22,70
<i>Sideroxylum obtusifolium</i> (Roem. & Schult.) T.D. Penn	Casca	15,40
<i>Solanum aculeatissimum</i> Jacq.	Planta	11,25
<i>Spondias tuberosa</i> Arruda	Casca	18,36
<i>Syagrus</i> sp.	Raiz	7,66
<i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Standl.	Casca	15,70
<i>Tephrosia purpurea</i> (L.) Pers.	Folhas	8,08
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	Casca	14,25

5. 2 Análise da atividade anticolinesterásica em CCD

Para as análises em CCD os extratos foram analisados a uma concentração de 10mg/mL de metanol e o padrão Inibidor fisostigmina a 0,027mg/mL em metanol.

Na placa após borrifar as soluções com o reagente de Ellman e ACTI) aguardou-se a secagem por cerca de 3 min e em seguida borrifou-se a enzima acetilcolinesterase e, em 10 min, apareceu a coloração amarela, mas onde houve inibição da enzima, observou-se um halo branco, baseados no método de Ellman:



Para os ensaios em CCD, a intensidade das manchas brancas nas placas foram classificadas de 0 a 3. Os resultados foram classificados de acordo com a intensidade da mancha de inibição, em que 0 (não houve inibição), 1(baixa inibição), 2(moderada inibição) e 3 (potente inibição).

Houve dificuldade na visualização dos resultados, pois as manchas mostram-se muito suaves, mas mesmo assim não impediu que pudéssemos obter os resultados. Realizamos estes testes em dois tipos de placa, em sílica gel e em placa de óxido de alumínio. A visualização das manchas foi possível em ambos os tipos de placa, no entanto em sílica gel a coloração amarela estava intensa as áreas em branco melhores de avaliar. O trabalho realizado por Rhee e colaboradores (2001) afirma que a visualização se torna melhor na placa de óxido alumínio quando não há aplicações pontuais e quando não há eluição de solventes antes da avaliação anticolinesterásica, sendo recomendada neste último caso, a placa de sílica gel (RHEE, et al., 2001).

Os dois testes realizados em CCD foram capazes de reconhecer pontos que indicam resultados falso-positivos. Tanto os resultados positivos quanto os resultados da inibição química entre o DTNB e a tiocolina, no teste falso-positivo estão expostos na Tabela 4. Estes resultados falso-positivos são atribuídos a compostos como aldeídos e aminas presentes nos extratos que inibem a reação entre o reagente de Ellman e substrato oriundo da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase (RHEE,et al, 2003).

5.3 Análise da atividade anticolinesterásica em microplaca

A partir dos resultados qualitativos encontrados no teste em CCD, fizemos a análise no método de Microplaca para as amostras que apresentaram manchas de inibição.

Para as análises em microplaca os extratos a 10mg/mL em metanol foram diluídos para 1mg/mL em Tampão A. E para o controle negativo (branco), utilizou-se metanol 10% em Tampão A. O padrão positivo, fisostigmina, foi utilizado nas seguintes concentrações: 0,027mg/mL; 0,081mg/mL; 0,135mg/mL; 0,270mg/mL; 0,810mg/mL; 1,35mg/mL em metanol.

O percentual de inibição da enzima acetilcolinesterase das amostras foi calculado baseado na seguinte equação (STEENKAMP, 2011):

$$\% \text{Inibição} = 1 - (A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}}) \times 100$$

Onde A_{amostra} é a absorbância das amostras contendo o extrato e A_{controle} é a absorção do branco [metanol em Tampão A (50 mM Tris-HCl), pH 8].

Para os ensaios em microplaca, os extratos cuja inibição enzimática for maior ou igual a 50% (potentes inibidores), moderados (entre 30 e 50% de inibição) e baixos (abaixo de 30% de inibição) são considerados candidatos a futuros fracionamentos.

Pela análise da Tabela 2, pode-se considerar que apenas 4% dos extratos brutos testados seriam candidatos a um fracionamento bio-guiado, para isolamento de princípios ativos capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase.

A análise estatística através do teste de Pearson indicou que os resultados qualitativos correlacionaram-se com os resultados quantitativos ($r = 0,5435$; $p < 0,05$). Reist, et al (2008) avaliaram a correlação entre a metodologia que utiliza a CCD com o teste em microplaca e 50 % dos compostos investigados foram classificados como ativos para o teste microplaca, entretanto mostraram-se inativos em CCD e cerca de 2% foram avaliados como ativos em CCD e inativos em microplaca. Estas divergências podem ser explicadas pela interação da AChE ou outros componentes do ensaio com a sílica na CCD, resultando em afinidade alterada da enzima para os compostos.

A espécie que apresentou melhor atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase foi a espécie *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir com percentual de inibição de 53, 37%. Muitos grupos indígenas do semi-árido pernambucano consideram a jurema preta, como é conhecida

popularmente, uma planta sagrada, cercada de profundo respeito e de todo um cerimonial, com as populações dessa planta tendendo a ser protegidas. Contudo, é uma planta muito apreciada pela qualidade de sua madeira, sendo muito utilizada para confecção de cercas e fabrico de carvão (ALBUQUERQUE, 2002).

Entre os metabólitos secundários presentes em *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir estão os alcalóides 5-hidroxi-triptana e N,N-dimetiltriptana que foram isolados da casca do caule (SOUZA, et al, 2008) que podem estar relacionado com a atividade anticolinesterásica apresentada, já que os estudos apontam que mais de 50% das espécies de origem vegetal que apresentam esta atividade estão associados à este metabólito (BARBOSA FILHO, et al, 2006).

Em 60% das espécies apresentaram atividade anticolinesterásica moderada. Entre elas se destacaram *Schinopsis brasiliensis* Engl. e *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All pertencentes a família *Anacardiaceae* que já estão sendo analisadas em trabalhos paralelos em nossa equipe, o potencial anticolinesterásico em outras concentrações do extrato e extraída por meio de outros solventes.

Estas últimas espécies merecem atenção, pois foram apontadas em um estudo acerca da importância relativa de espécies arbóreas medicinais da caatinga pernambucana com um dos os maiores valores de importância relativa entre as 22 espécies terapêuticas analisadas. Ao mesmo tempo, estas espécies mais importantes, do ponto de vista etnobotânico, são também as mais vulneráveis devido à exploração sistemática que vêm sofrendo. *Schinopsis brasiliensis* Engl. e *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All constam na lista de espécies ameaçadas de extinção e merecem atenção especial no desenvolvimento de técnicas de manejo sustentável, visando retorno econômico e garantindo a conservação (ALBUQUERQUE; SILVA 2005).

Os solventes extratores podem influenciar nos resultados obtidos, como é o caso de *Amburana cearensis* que em nosso trabalho apresentou uma atividade moderada com 37,51% de inibição com extrato metanólico da casca do caule. No entanto, o trabalho realizado por Trevisan e colaboradores (2003) analisou o extrato etanólico da mesma parte desta planta em uma concentração de 2,3mg/mL e obteve 100% de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Tabela 4. Resultados da atividade anticolinesterásica in vitro das 25 espécies analisadas obtidos pelo método em CCD e em microplaca

Espécie (10mg/mL)	Família	Parte Usada	CCD	Inibição Química (Falso-positivo)	% Inibição ± D.P
<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A. C. Sm.	<i>Fabaceae</i>	Casca	1	0	37,51 ± 6,64
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	<i>Mimosaceae</i>	Casca	3	0	35,08 ± 4,73
<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.	<i>Caesalpinaceae</i>	Casca	3	0	44,82 ± 3,75
<i>Cedrela odorata</i> L.	<i>Meliaceae</i>	Casca	2	0	43,44 ± 4,04
<i>Cereus jamacaru</i> DC.	<i>Cactaceae</i>	Tronco	0	0	25,21 ± 3,90
<i>Chloroleucon extortum</i> Barneby & J.W. Grimes	<i>Mimosaceae</i>	Casca	3	2	42,18 ± 5,14
<i>Croton blanchetianus</i> Baill.	<i>Euphorbiaceae</i>	Casca	1	0	39,43 ± 7,53
<i>Erythrina velutina</i> Willd.	<i>Fabaceae</i>	Casca	1	0	37,67 ± 4,25
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	<i>Caesalpinaceae</i>	Casca	3	0	18,19 ± 1,58
<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill.	<i>Euphorbiaceae</i>	Casca	1	3	42,72 ± 7,20
<i>Manihot dichotoma</i> Ule	<i>Euphorbiaceae</i>	Casca	0	2	34,10 ± 15,12
<i>Maytenus rigida</i> Mart	<i>Celastraceae</i>	Casca	0	0	21,30 ± 5,00
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	<i>Mimosaceae</i>	Casca	3	0	53,37 ± 4,38
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	<i>Anacardiaceae</i>	Casca	1	0	42,64 ± 3,48
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	<i>Solanaceae</i>	Folhas	0	0	27,92 ± 5,76
<i>Rhamnidium molle</i> Reissek	<i>Rhamnaceae</i>	Casca	0	0	24,70 ± 5,84
<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	<i>Anacardiaceae</i>	Casca	2	0	46,72 ± 4,02
<i>Serjania lethalis</i> A. St.-Hil.	<i>Sapindaceae</i>	Folhas	0	0	27,95 ± 6,08

<i>Sideroxylum obtusifolium</i> (Roem. & Schult.) T.D. Penn	<i>Sapotaceae</i>	Casca	0	2	29,81 ± 6,28
<i>Solanum aculeatissimum</i> Jacq.	<i>Solanaceae</i>	Planta	0	0	29,66 ± 6,34
<i>Spondias tuberosa</i> Arruda	<i>Anacardiaceae</i>	Casca	2	0	42,94 ± 3,09
<i>Syagrus sp.</i>	<i>Arecaceae</i>	Raiz	0	2	35,53 ± 5,23
<i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Standl.	<i>Bignoniaceae</i>	Casca	0	2	19,80 ± 2,39
<i>Tephrosia purpurea</i> (L.) Pers.	<i>Fabaceae</i>	Folhas	2	0	43,33 ± 5,79
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	<i>Rhamnaceae</i>	Casca	2	2	31,25 ± 5,10

Resultado Positivo: Alta inibição: 3; Moderada inibição: 2; Baixa inibição: 1;

Sem inibição: 0

DP – Desvio Padrão

Da mesma forma ao serem avaliados os extratos aquosos e metanólicos de *Semecarpus anacardium*, *Embelia ribes*, *Withania somnifera*, *Nardostachys jatamansi*, *Ficus religiosa* e *Tinospora cordifolia*, espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional na Índia, os resultados obtidos demonstraram uma potente inibição a acetilcolinesterase em extrato metanólico e baixíssima ou quase nulas quando comparadas aos seus extratos aquosos (PRASHANTH, 2007).

Em relação ao porte das espécies estudadas, os resultados obtidos com as ervas foi observado baixa atividade inibitória em todas as espécies analisadas. Nas espécies arbustivas apresentaram uma moderada inibição em 80% das espécies testadas. Com o porte arbóreo obtivemos um bom potencial inibitório em apenas uma espécie e entre as demais 64% delas apresentaram uma atividade inibitória variando entre 31,25 a 46,72%.

6. Considerações Finais

Este trabalho trouxe uma contribuição para a elucidação de alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Alzheimer, além de expor a problemática, no intuito de sensibilizar a comunidade científica para encontrar métodos mais eficazes para tratar desta enfermidade.

Ressaltamos ainda a riqueza de recursos naturais presente no nordeste brasileiro, em especial o bioma Caatinga, que de acordo com vários estudos realizados na região tem mostrado uma enorme fonte de diversas substâncias medicinais.

Com os resultados encontrados nesta pesquisa, se faz necessário realizar testes anticolinesterásico com as frações contendo alcaloides da casca do caule de *Mimosa tenuiflora* (Willd.), no intuito de verificar a intensidade da inibição destas frações. Bem como desenvolver estudos farmacológicos *in vivo* e também realizar a avaliação de toxicidade.

Referências

- ADSERSEN, A.; GAUGUIN, B.; GUDIKSEN, L.; JÄGER, A. K. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology** 104 (2006) 418–422
- AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383–395, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Acta bot. bras.** v.16, n.3, p. 273-285, 2001
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste de Pernambuco(nordeste do Brasil).Interciencia, v.27, n.7, 2002
- ALBUQUERQUE, U. P.; SILVA, A. C. O. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta Bot. Bras.** v.19 n.1 São Paulo Jan./Mar. 2005
- ALMEIDA, O. P. Tratamento da Doença de Alzheimer: Avaliação crítica sobre o uso de Anticolinesterásicos. **Arq Neuropsiquiatr.** v.,56, n.(3-B), p.688-696, 1998.
- ARAUJO, T.A.S.; CASTRO, V. T. N. A, AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondias tuberosa*. **Pharm Biol.**, v. 50,n. 6, p. 754-9, 2012.
- DELL'ANTONE, P., BRAGADIN, M.; ZATTA, P. Anticholinesterasic drugs: tacrine but not physostigmine, accumulates in acidic compartments of the cells. **Biochimica et Biophysica Acta.**v. 1270, p. 137-141, 1995.

BERTÉ, TALITA ELISA. Estudo da atividade anticolinesterásica dos compostos taraxerol e ácido ursólico: implicações sobre o processo de memória. **Dissertação de Mestrado**. 100f Universidade do Vale Itajaí, Itajaí –SC (2009).

BARBOSA FILHO, J. M.; MEDEIROS, K.C.P.; DINIZ, M.F.F.M.; BATISTA, L.M.; ATHAYDE FILHO, P. F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; SILVA ALMEIDA, J.R.G.; QUINTAS JUNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.16, n.2, P. 258-285, 2006.

BARRANTES, F.J.; BORRONI, V.; VALLÉS, S. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor–cholesterol crosstalk in Alzheimer’s disease. **FEBS Letters**, v. 584, p. 1856–1863, 2010.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 8ed. Pág. 973 – 976. Guanabara Koogan, 2011.

CABRAL, R S. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anticolinesterásica de *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani (Rutaceae). **Dissertação de mestrado**. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2011

CACABELOS, R.; ALVAREZ, A.; LOMBARDI, V.; FERNANDEZ-NOVOA, L.; CORZO, L. *et al.* Pharmacological treatment of Alzheimer disease: from psychotropic drugs and cholinesterase inhibitors to pharmacogenomics. **Drugs Today (Barc)**. v.36, n.7, p.415-499, 2000.

CLAASSEN ,J. A, JANSEN, R. W. Cholinergically mediated augmentation of cerebral perfusion in Alzheimer’s disease and related cognitive disorders: the cholinergic-vascular hypothesis. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**; v. 61, p. 267–71, 2006.

CLAASSEN, J.A.H.R.; VAN BEEK, A.H.E.A. The cerebrovascular role of the cholinergic neural system in Alzheimer's disease. **Behavioural Brain Research** v. 22,p. 537–542,2011

CLOS, M.V.; ROMAN, S.; BADIA, A.; CAMPS, P. Potentiation effects of (±)huprine X, a new acetylcholinesterase inhibitor, on nicotinic receptors in rat cortical synaptosomes. **Neuropharmacology**. v. 46, p. 95–102, 2004.

CUMMINGS, J. L.; BACK C. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. **Am J Geriat Psychiat**. V. 6, p. S64-S78, 1998.

DINELEY, K. T.; PARRI, H. R.; HERNANDEZ, C. M. Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 931–942, 2011.

ELISABETSKY, E. From indigenous disease concepts to laboratory working hypothesis: the case of "Nerve Tonics" from the Brazilian Amazon. **Inern. Found. Sci., Prov. Rep. series**. Grev. Turegatan, Stockholm, Sweden, v. 19, p. 11438, 1987

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

FERREIRA, A.; PROENÇA, C.; SERRALHEIRO, M. L.M.; ARAÚJO, M.E.M. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. **Journal of Ethnopharmacology**. v.108, n. 1, p. 31–37, 2006.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Rev. Psiqu. Clín.** v.32, n.3, p. 137-148, 2005

FONSECA, J. L. Síntese de análogos de diidrocurmarina e avaliação da atividade anticolinesterásica. Universidade Estadual de Goiás. **Dissertação de Mestrado** Anápolis - GO, 2011.

GAZONI, V. F. Análise fitoquímica e avaliação do efeito anticolinesterásico do extrato e compostos isolados da *Rapanea ferruginea*. **Dissertação de mestrado**, Itajaí/SC, 2009.

HARMAN, D. Alzheimer's Disease: A Hypothesis on pathogenesis. **J. Amer. Aging Assoc.** v. 23, p. 147 – 171, 2000.

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

IQBAL, K.; Grundke-IQBAL, I. Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies. **Alzheimer's & Dementia**, v.6, p. 420–424, 2010.

IRTH, H.; DE JONG, C. F.; DERKS, R. J.E.; BRUYNEEL, B.; NIESSEN, W. High-performance liquid chromatography–mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. **Journal of Chromatography A**, 1112 (2006) 303–310

IRTH, R.; DE JONG, C. F.; DERKS, R. J. E.; BRUYNEEL, B.; NIESSEN, W. High-performance liquid chromatography–mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. **Journal of Chromatography A**, 1112 (2006) 303–310.

KLINKENBERG, I.; SAMBETH, A.; BLOKLAND, A. Acetylcholine and attention. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 430–442, 2011.

MARTSON, A.; KISSLING, J. HOSTETTMANN. A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. **Phytochemical analysis**, v.13, p. 51–54, 2002.

MELO, J.G.; ARAUJO, T. A. S.; CASTRO, V. T. N. A.; CABRAL, D. L. V.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C.; AMORIM, E. L. C. ALBUQUERQUE, U. P. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v.15, n.12, p.8534-42, 2010.

McDONALD, R. J.; CRAIG, L. A.; HONG, N. S. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, n. 35, p. 1397–1409, 2011.

MORAES, L. T. Prospecção de substâncias ativas de *Serjania erecta* Radlk como estimulantes da memória. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

NIÑO, J.; HERNÁNDEZ, J. A.; CORREA, Y. M.; MOSQUERA, O. M. In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 101(7): 783-785, November 2006

PASCUAL, M., BALIÑO, P., ALFONSO-LOECHES, S., ARAGÓN, C.M., GUERRI, C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. **Brain Behav. Immun.** V.25 (Supl. 1), p. S80–S91, 2011.

PALLAS, M.; CAMINS, A. Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. **Curr Pharm Design**, v.12, p. 4389-4408, 2006.

PRASHANTH, D.; VINUTHA,B.; SALMA, K.; SREEJA, S.L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMITA,A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology** 109 (2007) 359–363.

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

RHEE, I. K.; VAN RIJN, R. M.; VERPOORTE, R. Qualitative Determination of False-positive Effects in the Acetylcholinesterase Assay using Thin Layer Chromatography. **Phytochem. Anal.** 14, 127–131 (2003)

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. Cap. 3, p. 45-74.

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

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; **PATOLOGIA** – Bases Patológicas das Doenças. 7ª edição. Ed. Elsevier, p. 1451-1457, 2005.

SEIDL, P. R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 1, p. 145-150, 2001.

SEIDL, C. PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS INIBIDORAS DA ACETILCOLINESTERASE. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná/PR, 2010.

SILVA, PENILDON & colaboradores. **Farmacologia**. 6ª Edição. Editora Guanabara Koogan, p. 227 – 275, 2002

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** – Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 5 ed. Porto Alegre / Florianópolis: UFRGS / UFCS, p. 291 – 320, 2003.

SIQUEIRA, C. F.; CABRAL, D.L.V.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; AMORIM, E.L.C.; MELO, J. G.; ARAUJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U.P. Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2012 .

SMITH, M. A. C. Doença de Alzheimer. **Rev. Bras. Psiquiatr. Genética** - v. 21, 1999.

STEENKAMP, V.; ADEWUSI, E.A. In vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. p. 829-835, 2011.

TARAZI, F. I.; THAYEB, H.O.; YANG, H. D.; PRICE, B. H. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 134, p. 8–25, 2012.

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

WANG, Q., ZENGIN, A., YING, W., NEWELL, K.A., WANG, P., YEO, W., WONG, P.T., YENARI, M.A., HUANG, X.F., Chronic treatment with simvastatin upregulates muscarinic M1/4 receptor binding in the rat brain. **Neuroscience**, v.154, n.3, p. 1100–1106, 2008.

XIA, Y.; WANG, Q.; XU, Y; YAN, J.; ZHOU, P.; LI, J.; GAO, H. Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 97, p.1–13, 2012.

YOUNG, M. C. M.; CARDOSO-LOPES, E. M.; CARREIRA, R. C.; AGRIPINO, D. G.; TORRES, L. M. B.; CORDEIRO, I.; BOLZANI, V. S.; DIETRICH, S. M. C. Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest - Ilha do Cardoso State Park. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18 (Supl.): 655-660, Dez. 2008

Anexo

Artigo 1: Investigação da atividade anticolinesterásica *in vitro* de plantas medicinais nativas da Caatinga, Nordeste do Brasil.

Submetido a Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

Investigação da atividade anticolinesterásica *in vitro* de plantas medicinais nativas da Caatinga, Nordeste do Brasil

Investigation *in vitro* of anticholinesterase activity of medicinal plants native from Caatinga, Northeast Brazil

Valéria Ferreira da Costa Borba^{1*}, Valérium Thijam Nobre de Almeida e Castro¹,
Patrícia Maria da Silva Neri¹, Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho¹, Elba Lúcia
Cavalcanti de Amorim¹

1 – Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil

Autor correspondente: Valéria Ferreira da Costa Borba – Laboratório de Produtos Naturais - Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco – Recife - PE - Brasil. Fone (81) 2126 – 8511. e-mail: valeria.borba@hotmail.com

Título resumido: Atividade anticolinesterásica em plantas da Caatinga

ABSTRACT

The cholinergic hypothesis associates the effects of the cognitive disorders found in Alzheimer disease with a cholinergic deficit and the actual pharmacological treatment consists of increasing the levels of acetylcholine in the brain using inhibitory substances of the acetylcholinesterase. However several of these medicines have undesirable effects to the patients. So the search for more effective alternatives motivated researchers in many parts over the world. The object of his project was found new inhibitory agents of acetylcholinesterase enzyme in methanolic extracts of medicinal native plant species of the caatinga. The vegetable material was collected in Caarão community, municipality which is in Altinho/PE. AchE activity was done through thin layer chromatography and microplate assay based in Ellman's method. Only 4 % of the 25 plant species tested showed a strong inhibition of the AChE (>50 % inhibition), 60 % moderate (30-50% inhibition) and 36% were inactive (<30% inhibition). In relation to the postage of the species studied, in the results obtained were from the herd was watched low inhibitory activity in all analyzed species. In the shrub species showed a moderate inhibition in 80% of the species tested. In the trees we obtained inhibitory potential over 50% in only a specie and the others ones showed a inhibitory activity varying from 31,25 to 46,72%. Among the samples with strong or moderate inhibition made stand out the methanol extracts of the stalk's bark of *Mimosa tenuiflora* (Willd.)

Poir., *Schinopsis brasiliensis* Engl., *Tephrosia purpurea* (L.) Pers e *Cedrela odorata* L.

Keywords: Alzheimer Disease; acetilcholinesterase; Caatinga

RESUMO

A hipótese colinérgica associa os efeitos dos distúrbios cognitivos encontrados na Doença de Alzheimer a um déficit colinérgico e o tratamento farmacológico atual consiste em aumentar os níveis de acetilcolina no cérebro utilizando substâncias inibidoras da acetilcolinesterase. No entanto, muitos destes medicamentos, trazem efeitos indesejáveis aos pacientes. Neste contexto, a busca por alternativas mais eficazes e que tragam menos efeitos colaterais dos que os produtos existentes no mercado, têm impulsionado pesquisadores em diversas partes do mundo. O objetivo deste trabalho visou encontrar novos agentes inibidores da enzima acetilcolinesterase em extratos metanólicos de espécies de plantas medicinais nativas da Caatinga. O material vegetal foi coletado na comunidade do Caarão, município de Altinho/ PE e os ensaios anticolinesterásicos em cromatografia de camada delgada e em microplaca foram baseadas no método de Ellman. Das 25 espécies de plantas testadas, apenas 4% mostraram uma potente inibição da AChE (>50% inibição), 60% moderada (30–50% inibição) e 36% foram inativas (<30% inibição). Em relação ao porte das espécies estudadas, os resultados obtidos com as ervas foi observado baixa atividade inibitória em todas as espécies analisadas. Nas espécies arbustivas apresentaram uma moderada inibição em 80% das espécies testadas. Nas arbóreas obtivemos potencial inibitório acima de 50% em apenas uma espécie e as demais apresentaram uma atividade inibitória variando entre 31,25 a 46,72%. Dentre as amostras com potente e moderada inibição destacara-se os extratos metanólicos das cascas do caule de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., *Schinopsis brasiliensis* Engl., *Tephrosia purpurea* (L.) Pers e *Cedrela odorata* L.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; acetilcolinesterase; Caatinga

INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas comprometem a substância cinzenta do cérebro e são caracterizadas principalmente pela perda progressiva de neurônios. A Doença de Alzheimer é a principal causa de demências, sendo considerada como uma desordem sistêmica que afeta principalmente o cérebro (Robbins et al, 2005; Harman,

2000). A Doença de Alzheimer é multifatorial e está associada a injúrias severas em diferentes processos bioquímicos e fisiológicos no cérebro. Os relatos mais frequentes estão relacionados a fatores genéticos, apoptose neuronal, deposição β -amilóide em placas senis e vasos cerebrais, emaranhados neurofibrilares decorrentes da hiperfosforilação da proteína TAU, diminuição sináptica,

diminuição de neurotransmissores, alterações neurotróficas, disfunção neuroimune, reações neuro-inflamatórias, reações de excitotoxicidade, alteração no metabolismo do cálcio, formação de radicais livres primários ou na formação de espécies reativas cerebrovasculares (ANTONE et al., 1995; CACABELOS et al., 2000; PASCUAL et al., 2011).

Atualmente não existe um tratamento capaz de parar completamente ou retardar a progressão da doença (McDONALD et al., 2011). Inibidores colinesterásicos promovem um alívio aos sintomas e são licenciadas atualmente para o tratamento específico desta doença (FORLENZA, 2005), entretanto, estes medicamentos apresentam preços elevados e muitas vezes efeitos adversos, como náusea, vômitos, cefaléia, diarreia, tontura, etc. A descoberta de anticolinesterásicos isolados de plantas, como a huperzina A, galantanina e fisostigmina, despertaram o interesse científico e econômico, os quais poderiam se tornar uma alternativa para o tratamento de doenças autodegenerativas do sistema nervoso. Para isto, várias pesquisas têm sido realizadas e a avaliação biológica tornou-se uma das mais significantes

ferramentas para a descoberta de novos anticolinesterásicos. Dentre os bioensaios rápidos e sensíveis, a utilização da enzima AchE é uma alternativa para a detecção e seleção de amostras com ação anticolinesterásica (BARBOSA FILHO et al., 2006; TREVISAN et al., 2003).

Na busca de alternativas mais eficazes e que tragam menos efeitos colaterais que os medicamentos disponíveis no mercado, este trabalho teve como objetivo avaliar 25 espécies de plantas nativas da Caatinga com possível atividade anticolinesterásica.

2. Materiais e métodos

2.1. Química e Equipamentos

- Soluções Tampão

Tampão A: 50 mM Tris/HCl pH 8, Tampão B: 50mM Tris/HCl pH 8, contendo 0,1% Albumina sérica bovina (BSA), Tampão C: 50 mM Tris/HCl pH 8, contendo 0,1M de NaCl e 0,02 M de $\text{mgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

-Enzima

Acetilcolinesterase Tipo VI-S obtida de *Electroparus electricus* (pó liofilizado, 292 U/ mg sólido, 394 U/ mg proteína, Sigma-Aldrich, lote: 041M7009V). A enzima acetilcolinesterase liofilizada foi

dissolvida em tampão A para preparar uma solução estoque 1000 U/mL e, posteriormente diluída em tampão A para obter uma solução de enzima 5 U/mL para ser utilizada no ensaio em CCD. Já para o ensaio em microplaca foi diluída em tampão B para obter uma solução de enzima 0,22 U/mL.

- Substrato

Iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (Sigma-Aldrich®, lote: BCBB6404) foi o substrato utilizado nos ensaios. Para CCD foi utilizado a uma concentração de 1mM de ATCI em Tampão A, e para microplaca a 15 mM em água Millipore.

- Reagentes colorimétricos

Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®, lote: 67496HVM) ou reagente de Ellman foi utilizado nos ensaio a 1mM em Tampão A para o ensaio em CCD e em microplaca 3 mM em tampão C.

-Inibidor anticolinestrelástico de referência

Fisostigmina (Eserina base livre, Sigma Aldrich, lote: BCBC4171V)

- Placas de cromatografia em camada delgada:

- Placas de Oxido de alumínio para cromatografia de camada delgada DC - KArten ALF, 0,2 mm de espessura, Riedel-deHaën.

- Placas de Sílicagel 60 F254, 0,2 mm DC-Alufolien Merck.

- Leitor de Microplaca

Placas de poliestireno com 96 poços (300 µl/TPP®) e o equipamento Leitora automática de microplacas 96 poços ThermoPlate (Mod. TP-Reader) foi utilizada para medir a absorbância em 412 nm para a reação enzimática no ensaio em microplaca.

2.2. Material vegetal

As plantas para o estudo foram selecionadas a partir de um banco de dados, previamente realizado pelo Laboratório de Etnobotânica Aplicada, localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco. As coletas foram realizadas em um remanescente de vegetação caducifólia espinhosa (Caatinga) localizado no município de Altinho, mesorregião Agreste central de Pernambuco, Brasil.

2.3. Extração

As amostras vegetais foram secas a temperatura ambiente e após serem pulverizadas com moinho vertical de facas foram submetidas à extração utilizando metanol como solvente por

um período de 72h. Posteriormente removeu-se o solvente através de evaporação rotativa, obtendo o extrato bruto metanólico. A identificação das espécies foi realizada por botânicos do Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho, localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde se encontram depositadas as exsiccatas.

3. Metodologia

3.1. Ensaio qualitativo

Os extratos brutos das amostras foram analisados na concentração de 10 mg/mL em metanol para a cromatografia em camada delgada. Foram utilizadas placas de óxido de alumínio e placas de sílica gel, utilizando como sistema eluente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (8:2, v/v). Como controle positivo de inibição da acetilcolinesterase foi utilizada fisostigmina 0,027 mg/mL em metanol.

Teste Positivo

Alíquotas de 2,5 μL de cada amostra e do padrão foram aplicadas na placa de sílica gel e também na placa de óxido de alumínio. Após o desenvolvimento da cromatografia pelo eluente, a atividade inibitória das amostras foi avaliada pelo método de

Ellman et al. (1961) modificado por Rhee et al. (2001), onde borrifam-se a placa com as soluções de 1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman) e 1 mM de iodeto de acetiltiocolina (ACTI). Após 3 minutos para secagem da placa, borrifou-se a enzima a 3 U/mL e, após 10 minutos, forma-se uma coloração amarela. Nos locais, onde há inibição da enzima observa-se um halo branco. Esta coloração desaparece em torno de 20 - 30 min.

Teste Falso-Positivo ou Inibição Química

Da mesma forma que o teste anterior, alíquotas de 2,5 μL das mesmas amostras e do padrão foram aplicadas na placa de sílica gel e também na placa de óxido de alumínio. Após o desenvolvimento da cromatografia pelo eluente e secagem, borrifou-se a placa com uma sequência diferente dos mesmos reagentes do teste positivo. Inicialmente foi borrifado a solução de reagente de Ellman e, após secagem, uma solução de substrato (ACTI) e da enzima AchE 3 U/mL pré-aquecida a 37 °C por 10 minutos. Em alguns minutos formou-se uma

coloração amarela na placa com presença de halos brancos.

Este teste foi realizado concomitantemente com teste positivo para poder diferenciar se as manchas brancas são resultantes de inibição da acetilcolinesterase ou se houve inibição química entre a tiocolina e o DTNB (Rhee et al., 2003b).

3.2. Ensaio em microplaca

A avaliação da atividade inibitória da AchE foi baseado no método de Ellman et al. (1961), modificado por Rhee et al. (2001). Neste teste, nas 96 cavidades da placa, adicionaram-se 25 µL de ATCI 15mM em água; 125 µL de DTNB ou reagente de Ellman 3mM em Tampão C; 50 µL de Tampão B; 25 µL da amostra (10 mg/mL) a ser analisada, dissolvida em MeOH, diluída 10 vezes em Tampão A; mediu-se a absorbância a cada 18 s por 9 vezes. Adicionou-se 25 µL da enzima AchE (0,22 U/mL); mediu-se novamente a absorbância a cada 18 s por 9 vezes.

Os aumentos em absorbância, devido à hidrólise espontânea, foram corrigidos através da subtração da absorbância da reação antes de se adicionar a enzima com a absorbância da reação depois de se adicionar a

enzima. A porcentagem de inibição calculou-se pela comparação das absorbâncias das amostras em relação ao branco (10% MeOH no tampão A) pela equação utilizada por Steenkamp et al. (2011).

Neste teste a enzima hidrolisou o substrato acetiltiocolina, gerando como produto a tiocolina, que reage com o reagente de Ellman, produzindo 2-nitrobenzoato-5- mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato, que podem ser detectados a 412 nm.

4. Resultados e discussão

Para os ensaios em CCD, a intensidade das manchas brancas nas placas foram classificadas de 0 a 3 e expostos na Tabela 1. A visualização das manchas foi possível em ambos os tipos de placa, no entanto, na placa de sílica gel a coloração amarela estava mais intensa e as áreas em branco melhores de visualizar. O trabalho realizado por Rhee et al. (2001) afirma que a visualização se torna melhor na placa de óxido alumínio quando não há aplicações pontuais e quando não há eluição de solventes antes da avaliação anticolinesterásica, sendo recomendada neste último caso, a placa de sílica gel

(RHEE et al., 2001). Também foram observados resultados falso-positivos em *Chloroleucon extortum* Barneby & J.W. Grimes, *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill e *Ziziphus joazeiro* Mart. Este tipo de resultado é atribuído a possíveis compostos, como aldeídos e aminas, presentes nos extratos que possibilitam a inibição da reação entre o reagente de Ellman e o substrato oriundo da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase (RHEE et al., 2003).

Para os ensaios em microplaca, os extratos com inibição enzimática maior ou igual a 50% são considerados potentes inibidores e entre 50 e 30% são moderados inibidores, sendo ambos considerados candidatos a futuros fracionamentos. Abaixo de 30% possuem baixa inibição. Pela análise da Tabela 1, pode-se observar que apenas 4% dos extratos brutos testados seriam candidatos a um fracionamento bio-guiado para isolamento de princípios ativos capazes de inibir a enzima AchE. A análise estatística através do teste de Pearson indicou que os resultados qualitativos correlacionaram-se com os resultados quantitativos ($r = 0,5435$; $p < 0,05$).

Excluindo os resultados falso-positivos, ainda foram encontramos

divergências entre o resultado da cromatografia em camada delgada (CCD) e na microplaca. Reist et al. (2008) avaliaram a correlação entre a metodologia que utiliza a CCD com o teste em microplaca e 50% dos compostos investigados foram classificados como ativos para o teste microplaca, entretanto mostraram-se inativos em CCD e cerca de 2% foram avaliados como ativos em CCD e inativos em microplaca. Estas divergências podem ser explicadas pela interação da AchE ou outros componentes do ensaio com a sílica na CCD, resultando em afinidade alterada da enzima para os compostos.

Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir foi a espécie que apresentou melhor atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase tanto em CDD quanto no teste em Microplaca, apresentando percentual de inibição de 53,37%. Muitos grupos indígenas do semi-árido pernambucano consideram a jurema preta, como é conhecida popularmente, uma planta sagrada, cercada de profundo respeito e de todo um cerimonial, com as populações dessa planta tendendo a ser protegidas. Contudo, é uma planta muito apreciada pela qualidade de sua madeira, sendo

muito utilizada para confecção de cercas e fabrico de carvão (ALBUQUERQUE & ANDRADE, 2002). Trabalhos realizados com extratos do pó da casca do caule de jurema preta confirmam a presença de alcalóides nesta parte da planta, Bezerra et. (2011). De acordo com Souza et al. (2008), os alcalóides 5- hydroxi-triptamina e N,N-dimetiltriptamina foram isolados da casca do caule de *M. tenuiflora*.

Os solventes extratores podem influenciar nos resultados obtidos, como é o caso do extrato metanólico da casca do caule de *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Sm. que apresentou uma inibição moderada (37,51%). No entanto, o trabalho realizado por Trevisan et al. (2003) analisou o extrato etanólico da mesma parte desta planta em uma concentração de 2,3 mg/mL e obteve 100% de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Tabela 1. Atividade anticolinesterásica dos extratos metanólicos de 25 espécies de plantas nativas da Caatinga na concentração de 10 mg/mL pelo método de Ellman modificado por Rhee em CCD e em microplaca.

Espécie (Família)	Parte Usada	Positivo	Falso-positivo	% Inibição ± D.P
<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A. C. Sm. (<i>Fabaceae</i>)	Casca	1	0	37,51 ± 6,64
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan (<i>Mimosaceae</i>)	Casca	3	0	35,08 ± 4,73
<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. (<i>Caesalpiniaceae</i>)	Casca	3	0	44,82 ± 3,75
<i>Cedrela odorata</i> L. (<i>Meliaceae</i>)	Casca	2	0	43,44 ± 4,04
<i>Cereus jamacaru</i> DC. (<i>Cactaceae</i>)	Tronco	0	0	25,21 ± 3,90
<i>Chloroleucon extortum</i> Barneby & J.W. Grimes (<i>Mimosaceae</i>)	Casca	3	2	42,18 ± 5,14
<i>Croton blanchetianus</i> Baill. (<i>Euphorbiaceae</i>)	Casca	1	0	39,43 ± 7,53
<i>Erythrina velutina</i> Willd. (<i>Fabaceae</i>)	Casca	1	0	37,67 ± 4,25
<i>Hymenaea courbaril</i> L. (<i>Caesalpiniaceae</i>)	Casca	3	0	18,19 ± 1,58
<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill. (<i>Euphorbiaceae</i>)	Casca	1	3	42,72 ± 7,20

<i>Manihot dichotoma</i> Ule (<i>Euphorbiaceae</i>)	Casca	0	2	34,10 ± 5,16
<i>Maytenus rigida</i> Mart (<i>Celastraceae</i>)	Casca	0	0	21,30 ± 5,00
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir. (<i>Mimosaceae</i>)	Casca	3	0	53,37 ± 4,38
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão (<i>Anacardiaceae</i>)	Casca	1	0	42,64 ± 3,48
<i>Nicotiana glauca</i> Graham (<i>Solanaceae</i>)	Folhas	0	0	27,92 ± 5,76
<i>Rhamnidium molle</i> Reissek (<i>Rhamnaceae</i>)	Casca	0	0	24,70 ± 5,84
<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. (<i>Anacardiaceae</i>)	Casca	2	0	46,72 ± 4,02
<i>Serjania lethalis</i> A. St.-Hil. (<i>Sapindaceae</i>)	Folhas	0	0	27,95 ± 6,08
<i>Sideroxylum obtusifolium</i> (Roem. & Schult.) T.D. Penn (<i>Sapotaceae</i>)	Casca	0	2	29,81 ± 6,28
<i>Solanum aculeatissimum</i> Jacq. (<i>Solanaceae</i>)	Planta	0	0	29,66 ± 6,34
<i>Spondias tuberosa</i> Arruda (<i>Anacardiaceae</i>)	Casca	2	0	42,94 ± 3,09
<i>Syagrus</i> sp. (<i>Arecaceae</i>)	Raiz	0	2	35,53 ± 5,23
<i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Standl. (<i>Bignoniaceae</i>)	Casca	0	2	19,80 ± 2,39
<i>Tephrosia purpurea</i> (L.) Pers. (<i>Fabaceae</i>)	Folhas	2	0	43,33 ± 5,79
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. (<i>Rhamnaceae</i>)	Casca	2	2	31,25 ± 5,10

Resultado Positivo: 3- Elevada inibição; 2 - Moderada inibição; 1 - Baixa inibição. 0 - Ausência de inibição.

DP – Desvio Padrão

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esses resultados podem contribuir para a elucidação de alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Alzheimer. Entretanto, se faz necessário testar frações contendo os alcalóides presentes na casca do caule de *Mimosa tenuiflora* (Willd.), a fim de verificar o potencial anticolinesterásico dos compostos isolados, bem como, desenvolver estudos farmacológicos *in vivo* e também realizar a avaliação de toxicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE-Brasil pelo suporte técnico e o apoio financeiro da CAPES durante a realização deste projeto.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE UP; ANDRADE LHC. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. *Acta bot. bras.* 2002;16(3):273-285.
- ALBUQUERQUE UP; MONTEIRO JM; AMORIM ELC. Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.) : a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Braz. Arch. of Biol. and Tech.* 2008; 51(5): 937-947, 2008.
- BARBOSA FILHO JM; MEDEIROS KCP; DINIZ MFFM; BATISTA LM; ATHAYDE-FILHO PF; SILVA MS; CUNHA EVL; ALMEIDA JRGS; QUINTANS-JÚNIOR LJ. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*.2006; 16(2): 258-285.
- BEZERRA DAC; RODRIGUES FFG; COSTA JGM; PEREIRA AV; SOUZA EO; RODRIGUES OG. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret E *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. *Acta Scient. Biol. Scien. Maringá.* 2011; 33(1): 99-106.
- CACABELOS R; ALVAREZ A; LOMBARDI V; FERNANDEZ-NOVOA L; CORZO L. Pharmacological treatment of Alzheimer disease: from psychotropic drugs and cholinesterase inhibitors to pharmacogenomics. *Drugs Today (Barc)*.2000; 36 (7): 415-499.
- ELLMAN GL; COURTNEY, KD; ANDRES, V; FEATHERSTONE R M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961;7: 88-95.
- FORLENZA OV. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Rev. Psiq. Clín.* 2005; 32 (3): 137-148.

- HARMAN D. Alzheimer's Disease: A Hypothesis on pathogenesis. *J. Amer. Aging Assoc.* 2000; 23:147 – 171.
- MCDONALD RJ; CRAIG LA; HONG NS. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2011; 35:1397–1409.
- PASCUAL M, BALIÑO P, ALFONSO-LOECHES S, ARAGÓN CM, GUERRI C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain Behav. Immun.* 2011; 25(Suppl. 1): S80–S91.
- REIST M; DI GIOVANNI S; BORLOZ A; URBAIN A; MARSTON A; HOSTETTMANN K; CARRUPT PA. *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. *Europ. J. Pharm. Sci.* 2008; 33:109–119.
- RHEE I K; VAN DE MEENT M; INGGANINAN K; VERPOORTE R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatogr. A.* 2001; 915: 217–223.
- RHEE IK; VAN RIJN RM; VERPOORTE R. Qualitative Determination of False-positive Effects in the Acetylcholinesterase Assay using Thin Layer Chromatography. *Phytochem. Anal.* 2003;14:127–131.
- TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de alzheimer. *Quím. Nova.* 2003; 26 (3) : 301-304.
- SOUZA RSO; ALBUQUERQUE UP; MONTEIRO JM; AMORIM ELC. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2008; 51(5): 937-947.