

JAMES ANDREAS MAIER

**Efeitos do extrato etanólico e frações
purificadas de *Esenbeckia leiocarpa* Engl.
(Rutaceae) na atividade anticolinesterásica e
no comportamento de animais**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2010

JAMES ANDREAS MAIER

**Efeitos do extrato etanólico e frações
purificadas de *Esenbeckia leiocarpa* Engl.
(Rutaceae) na atividade anticolinesterásica e
no comportamento de animais.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: ELAINE MONTEIRO CARDOSO LOPES

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Maier, James Andreas

M217e Efeitos do extrato etanólico e frações purificadas de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) na atividade anticolinesterásica e no comportamento de animais / James Andreas Maier -- São Paulo, 2010.

70 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010

Bibliografia.

1. Fitoquímica. 2. Alcalóides. 3. Memória . I. Título

CDU: 581.19

A meus pais, simplesmente por existirem

A Dra. Elaine, sem a qual esse trabalho não existiria

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao Departamento de Ciência Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pela oportunidade oferecida, infra-estrutura, ou simplesmente por me aguentarem todo esse tempo.

À minha orientadora Dr^a. Elaine Monteiro Cardoso-Lopes, da qual eu precisaria escrever uma nova dissertação só com os motivos pelo qual eu deveria agradecê-la.

À Dr^a. Tânia Araújo Viel e ao Dr. Hudson de Sousa Buck, por tudo que me auxiliaram na Santa casa

À diretoria da pós-graduação do Instituto de Botânica, pela paciência comigo.

À diretoria da pós-graduação novamente, só para garantir.

À Cynthia Murakami e seus “cadernos mágicos” que muito me auxiliaram no ingresso a esse mestrado.

À Dr^a. Maria Claudia Marx Young e a Dr^a. Luce Maria Brandão Torres, por tudo que me ensinaram e me ajudaram nesses anos.

Ao Ms. (e futuro Dr.) Marcelo Rogério da Silva por tudo que me ensinou, principalmente pelo auxílio com a CLAE.

Aos Drs. Vanderlan da Silva Bolzani, Luis Octávio Regasini, Simone Yasue Simote, Norberto Peporine Lopes e José Rubens Pirani, pelo auxílio em diversos momentos decisivos desse trabalho, como identificação da espécie e de seus compostos.

Ao Glauco Ryodi Fukuda, por ser meu amigo e me fazer rir durante tanto tempo.

Ao Celso M. Jose, pois só poderia agradecê-lo logo em seguida do Glauco.

À Fernanda Susi Luccas, por ser minha “irmã não registrada em cartório”.

Ao Rodrigo Sant'Ana Cabral e a todos os "Rodrigos" dessa instituição.
Aos pós-graduandos e estagiários da Seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica e do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa, pois como trabalho com Doença de Alzheimer tenho todo o direito de esquecer nomes.
Aos que tentaram, sem sucesso, me fazer infeliz.
À minha querida namorada Thaís Nunes Vieira, por realmente estar do meu lado sempre e me fazer feliz.
Ao Monty Python, por me entreter nos momentos em que não estava estudando.

A todos, o meu muito obrigado.

De coração.

Índice

1.	Introdução	i
1.1.	O Gênero <i>Esenbeckia</i>	1
1.2.	<i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	2
1.3.	Inibidores da Acetilcolinesterase	3
1.4.	Memória	4
1.5.	Doença de Alzheimer	6
2.	Objetivos	11
2.1.	Geral	11
2.2.	Específicos	11
3.	Material e Métodos	12
3.1.	Material Botânico - <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	12
3.2.	Obtenção do Extrato Etanólico (EE) dos Caules de <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	12
3.3.	Obtenção da Fração Alcaloídica (FALC) de <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	12
3.4.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da FALC de <i>E. leiocarpa</i>	13
3.5.	Identificação dos Alcalóides de <i>E. leiocarpa</i>	14
3.6.	Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase	15
3.6.1.	Ensaio Qualitativo por Autografia	15
3.6.2.	Quantificação da Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase	15
3.7.	Estudos Comportamentais	16
3.7.1.	Teste de Atividade Locomotora	16
3.7.2.	Avaliação da Atividade Ansiolítica	17
3.7.3.	Avaliação dos Processos de Memória pelo Método de “Esquiva Inibitória”	17
3.8.	Análise Estatística	17
4.	Resultados e Discussão	19
4.1.	Resultados Fitoquímicos	19

4.1.1. Obtenção dos Extratos Etanólicos	19
4.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	20
4.1.3. Comparação dos Perfis Cromatográficos das FALCs obtidas por Maceração, ASE-TA e ASE-70	21
4.1.4. Identificação dos Alcalóides Obtidos da FALC	25
4.2. Resultados Farmacológicos	47
4.2.1. Efeito do Extrato Etanólico e Frações de <i>Esenbeckia leiocarpa</i> na Atividade Anticolinesterásica	47
4.2.2. Efeito dos Alcalóides Isolados de <i>Esenbeckia leiocarpa</i> na Atividade Anticolinesterásica	49
4.3. Estudos comportamentais	51
4.3.1. Atividade Locomotora	51
4.3.2 Atividade Ansiolítica	54
4.3.3. Avaliação dos processos de Memória	56
5. Conclusão	59
6. Resumo	60
7. Abstract	62
8. Referências Bibliográficas	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Método fitoquímico de extração da fração alcaloídica a partir do extrato etanólico dos caules de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e purificação da FALC em CLAE. Os números entre parênteses representam os rendimentos das frações, em massa, em relação à FALC (105 mg)..... 14
- Figura 2: Perfil cromatográfico em CLAE analítico da FALC obtida a partir do caule de *E. leiocarpa*. 20 µL da amostra de FALC (1 mg/mL) foram injetados em coluna de fase reversa Phenomenex C-18 (250 x 4,6 mm) utilizando fluxo de 1 mL/min. Os picos ALC 1, ALC 2, ALC 3, ALC 4 e ALC 5 e 6 foram identificados e testados para a atividade anticolinesterásica.....22
- Figura 3: Comparação dos perfis cromatográficos da fração alcaloídica obtida pelos três métodos de extração. O cromatograma em azul representa o método de maceração, o cromatograma em vermelho representa o método de ASE na temperatura ambiente e o cromatograma em verde representa o método de ASE a 70°C.24
- Figura 4a: Espectro de RMN de ¹H do ALC1, correspondente à fração 7, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado.28
- Figura 4b: Espectro de RMN de ¹H do ALC1, correspondente à fração 7, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado. Sinais desdobrados de 0.5 a 3.45 ppm.29
- Figura 4c: Espectro de RMN de ¹H do ALC1, correspondente à fração 7, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado. Sinais desdobrados, 7.2 a 8.6 ppm. Sinais desdobrados de 7.2 a 8.6 ppm.30

Figura 5a: Espectro de RMN de ^1H do ALC2, correspondente à fração 9, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado.	31
Figura 5b: Espectro de RMN de ^1H do ALC2, correspondente à fração 9, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado. Sinais desdobrados de 0.7 a 1.9 ppm.	32
Figura 5c: Espectro de RMN de ^1H do ALC2, correspondente à fração 9, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado. Sinais desdobrados de 6,5 a 8.5 ppm.	33
Figura 5d: Espectro de RMN de ^{13}C do ALC2, correspondente à fração 9, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado.	34
Figura 5e: Espectro de RMN de ^{13}C do ALC2, correspondente à fração 9, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado. Sinais desdobrados de 110 a 180 ppm.	35
Figura 7: Estrutura química dos alcalóides ALC 1 e ALC 2, únicos constituintes das frações 7 e 9 respectivamente. Na fração 7 - R= OCH ₃ e foi identificado como leiokinina A. Fração 9 - R=H e corresponde à leptomerina.	36
Figura 8a: Espectro de RMN de ^1H do ALC3, correspondente ao pico 10 utilizando espectrômetro INOVA -500 e solvente clorofórmio deuterado.	39
Figura 8b: Espectro de RMN de ^1H do ALC3, correspondente ao pico 10, utilizando como solvente o clorofórmio deuterado em aparelho espectrômetro INOVA -500. Sinais desdobrados, de 6,9 a 7,7 ppm.	40

Figura 8c: Espectro de RMN de ^{13}C do ALC3, correspondente à fração 10, utilizando o espectrômetro INOVA-500. Sinais desdobrados de 55 a 60 ppm.	41
Figura 9a: Espectro de RMN de ^1H do ALC4, correspondente ao pico 11, utilizando equipamento INOVA -500 e solvente clorofórmio deuterado.	42
Figura 9b. Espectro de RMN de ^{13}C do ALC4, correspondente à fração 11 utilizando equipamento INOVA -500 e solvente clorofórmio deuterado.	43
Figura 10: Estrutura química dos alcalóides ALC 3 e ALC 4, correspondentes aos picos 10 e 11, respectivamente. A substância (majoritária) contida no pico 10, na qual $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{OCH}_3$; $\text{R}_3 = \text{H}$, foi identificado como kokusaginina. A substância contida no pico 11, na qual $\text{R}_1 = \text{H}$; $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OCH}_3$, foi identificado como esquimianina.	44
Figura 11: Espectro de RMN de ^{13}C dos ALC4 e ALC 5 (mistura), correspondente ao pico 12, realizado em espectrômetro INOVA -500 e utilizando clorofórmio deuterado como solvente.	46
Figura 15: Estrutura química dos alcalóides ALC 5 e ALC 6 presentes no pico 12. $\text{R} = \text{H}$ corresponde ao alcalóide maculina. $\text{R} = \text{OCH}_3$ corresponde ao alcalóide flindersiamina.	47
Figura 13: Cromatoplaça do extrato etanólico de caules de <i>E. leiocarpa</i> e resíduo, fração hexânica (50 μg), porção básica, FALC e padrão galantamina revelada para a detecção de atividade inibidora da acetilcolinesterase. 1. Extrato etanólico bruto (200 μg), 2. Resíduo (50 μg), 3. FHex (50 μg), 4. Porção básica (50 μg), 5. FALC (50 μg), 6. Galantamina (0,5 μg).	48
Figura 14: Avaliação quantitativa da atividade inibidora da acetilcolinesterase do extrato etanólico e frações hexânica e alcaloídica (0,75 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dos caules de <i>Esenbeckia</i>	

leiocarpa. Os valores foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (em % de inibição da enzima acetilcolinesterase). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.....49

Figura 15: Atividade inibidora da acetilcolinesterase por cromatografia de camada delgada das 14 frações purificada da FALC de *E. leiocarpa*. A. Foto do cromatográfico em λ 254 nm e B. Foto do cromatograma revelado para a atividade inibidora da acetilcolinesterase.....50

Figura 16. Avaliação quantitativa da atividade inibidora da acetilcolinesterase de alcalóides isolados dos caules de *Esenbeckia leiocarpa*. Os valores foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (em % de inibição da enzima acetilcolinesterase). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.....51

Figura 17: Efeito da FALC (10 mg/Kg e 40mg/Kg, *i.p.*) sobre a movimentação horizontal (deambulação) na atividade exploratória espontânea de camundongos, a atividade locomotora foi analisada a cada minuto através de ANOVA com dois critérios de classificação seguido por Teste de Bonferroni. * estatisticamente diferente do controle $p<0,05$; ** estatisticamente diferente do controle $p<0,01$; *** estatisticamente diferente do controle $p<0,001$53

Figura 18: Efeito da FALC (10 mg/ Kg, *i.p.*) sobre a atividade exploratória dos animais medida pela duração total da movimentação vertical (*rearing*) no actômetro. ANOVA seguido por Dunnett. ** estatisticamente diferente do controle $p<0,01$; *** estatisticamente diferente do controle $p<0,001$53

Figura 19: Efeitos da FALC (10 mg/ Kg, *i.p.*) sobre a atividade exploratória medida pelo tempo de imobilização e auto-limpeza dos camundongos. ANOVA seguido de Dunnett. *** estatisticamente diferente do controle $p<0,001$ 54

Figura 20: Efeito da FALC (10 e 40 mg/Kg, *i.p.*) sobre a atividade ansiolítica, medida pelo tempo de permanência nos braços abertos (A) e braços fechados (B) no labirinto em cruz elevado. Teste t Student não-pareado. **estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$ 55

Figura 21: Efeito da FALC (10 e 40 mg/ Kg, *i.p.*) sobre a atividade ansiolítica, medida pelo número de mergulhos de cabeça (“head-dipping”). ANOVA seguido de Dunnet. **estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$ 56

Figura 22: Efeito da FALC (10 e 40 mg/ Kg, *i.p.*) sobre a atividade ansiolítica, medida pelo número de mergulhos de cabeça (“head-dipping”). ANOVA seguido de Dunnet. *estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$ 56

Figura 23: Efeito da FALC (10 e 40 mg/ Kg, *i.p.*) sobre a aquisição da memória. ANOVA não-pareado (Kruskal-Wallis) seguido de teste de comparação múltipla de Dunn. Diferença estatística comparada com controle salina. *estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$; **estatisticamente diferente do controle $p < 0,01$; ***estatisticamente diferente do controle $p < 0,001$ 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massas do extrato etanólico (EE) e da fração alcaloídica (FALC) e rendimentos do EE e da FALC em relação ao pó do caule e EE, respectivamente, obtido pelos três processos de extração: maceração, ASE extração à temperatura ambiente (ASE TA) e ASE extração a 70 °C (ASE 70).	20
Tabela 2. Tempo de retenção, massas e rendimento das frações obtidas, da purificação em CLAE preparativo, da FALC (105,0 mg) de <i>E. leiocarpa</i>	23
Tabela 3a: Dados de RMN de ^{13}C dos alcalóides ALC 1 e ALC 2 referente aos alcalóides leiokinina A e leptomerina, respectivamente.	26
Tabela 3b: Dados de RMN de Hidrogênio dos alcalóides ALC 1 e ALC 2, correspondentes à leiokinina A e leptomerina, respectivamente, comparados com a literatura.....	27
Tabela 4a: Dados de RMN de ^{13}C dos alcalóides furoquinolínicos, ALC 3 e ALC 4, correspondentes aos picos 10 e 11 respectivamente, e comparação com dados da literatura.....	38
Tabela 4b: Dados de RMN de ^1H dos alcalóides furoquinolínicos, ALC 3 e ALC 4, correspondentes aos picos 10 e 11, respectivamente.....	38
Tabela 5: Dados de RMN de ^1H dos alcalóides furoquinolínicos ALC5 e ALC6 que estão em mistura na fração 12.	45

1. Introdução

1.1.O Gênero *Esenbeckia*

As plantas superiores constituem uma de nossas mais importantes fontes naturais de alimentos, fibras, madeira, óleos, essências, corantes, além de diversos compostos de importância farmacêutica. Aproximadamente 25% dos compostos ativos prescritos nos EUA e Inglaterra foram isolados de plantas superiores. Embora as plantas sejam fontes renováveis, em algumas espécies, a quantidade de metabólitos biossintetizada não é suficiente para atender à crescente demanda da indústria farmacêutica (Cragg *et al.* 1993).

A família Rutaceae contém espécies de importância econômica, sendo as mais notáveis as do gênero *Citrus*, representado pelas frutas cítricas de interesse comercial (limão, laranja, tangerina, lima, etc.) e também é fonte de diversos óleos essenciais utilizados na perfumaria. Um exemplo notável de grande importância para a medicina pertence ao gênero *Pilocarpus* que sintetiza grandes concentrações de pilocarpina, alcalóide usado no tratamento do glaucoma (Chase *et al.* 1999).

A família Rutaceae possui aproximadamente 155 gêneros e 1600 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, porém são mais abundantes na América tropical, Sul da África e Austrália. No Brasil, a família está representada por cerca de 29 gêneros e 182 espécies, sendo algumas de importância medicinal, ecológica e econômica (Barroso *et al.* 1986).

As rutáceas são usualmente plantas lenhosas, com folhas estipuladas, apresentando mais de dois óvulos por carpelo, disco nectarífero (algumas vezes modificado em ginóforo), raramente apresenta mais que o dobro de estames por sépala ou pétala e ovário súpero (Chase *et al.* 1999).

A família é caracterizada pela diversidade de metabólitos secundários, incluindo os terpenóides, furocumarinas e alguns alcalóides, que apresentam toxicidade contra insetos e atividade anti-alimentar (Jacobsen 1989). Alcalóides furoquinolínicos, derivados do ácido antranílico, são os tipos de alcalóides mais encontrados e com maior variedade estrutural na família Rutaceae (Sackett *et al.* 2007).

No extrato hexânico da casca de *Esenbeckia almawillia* Kaastra foram isolados e identificados os alcalóides 2-alkilquinolin-4-ônico, derivados do ácido cinâmico e isopimpinina. No extrato clorofórmico deste mesmo material foram identificados dois alcalóides novos 2-arylquinolin-4-ônico (3-metoxi-4,5- metilendioxifenil-1-metilquinolin-4-ona e 8-metoxi-2-(3'-metoxi-4,5-metilendioxifenil)-1-metilquinolin-4-ona) e chalepina

(Oliveira *et al.* 1995). Das raízes de *E. almawillia* foram isolados os alcalóides 3,3-diisopentenil-N-metil-2,4-quinoldiona, maculina e 3'-metoxigraveolina, a amida (E)-N-isobutil-3-metoxi-4,5-metilenodioxicinamoilamida, as flavonas gardenina B e nevadensina e o sesquiterpeno intermediol (Barros-Filho *et al.* 2007).

O estudo químico das folhas de *Esenbeckia belizensis* Lundell permitiu o isolamento e identificação de decaprenol, β -sitosterol, óxido de cariofileno, espatulenol, lupenona, friedelina, friedelanol e os alcalóides kokusaginina e flindersiamina (Rios *et al.* 1992). Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*, dos alcalóides isolados de *E. belizensis*, demonstraram que a kokusaginina possui toxicidade moderada ($LC_{50}=367\text{ppm}$) e a flindersiamina não apresenta toxicidade ($LC_{50}<1000\text{ppm}$) (Rios *et al.* 1992).

Das raízes de *Esenbeckia grandiflora* Mart. foram isolados três alcalóides conhecidos (kokusaginina, flindersiamina e maculina), duas furanocumarinas, pimpinelina, xantotoxina e a 4-metoxi-1-metilquinolin-4-ona, isolada pela primeira vez no gênero por Oliveira *et al.* (1996).

Nos extratos orgânicos das partes aéreas de *Esenbeckia pentaphylla* Griseb. foram isolados N-metilflindersina, flindersiamine, kokusagine, escopoletina, 4-metoxi-1-metil-2-quinolona, 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-benzaldeído e edulina (Simpson & Jacobs 2005).

1.2. *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

Esenbeckia leiocarpa Engl. (Rutaceae) é uma espécie arbórea comum em Florestas Semidecíduais do Estado de São Paulo e conhecida em algumas regiões como guarantã. A espécie se desenvolve à sombra, é decídua e apresenta distribuição espacial agregada na forma de reboleiras que podem se estender por centena de metros; a polinização é miofíllica, com fecundação cruzada obrigatória (Crestana *et al.* 1982, Seoane *et al.* 2000). Sua estrutura arbórea possui tronco reto que pode atingir de 20 a 30 metros e sua madeira é pesada; é encontrada do sul da Bahia até São Paulo. A espécie não tolera, quando jovem, insolação direta, motivo pelo qual não é encontrada em formações secundárias (Lorenzi 1992). O fruto é autocórico, podendo ser lançado até cinco metros de distância da planta mãe. Como a miofilia e a autocoria são pouco eficientes em termos de distância de dispersão, os indivíduos dentro das subpopulações devem apresentar um maior grau de parentesco entre si do que os indivíduos entre subpopulações, ou seja, deve haver estrutura genética dentro das subpopulações (Seoane *et al.* 2000).

Das raízes de *E. leiocarpa*, foram isolados os alcalóides maculina, flindersiamina e kokusaginina, bastante freqüentes no gênero *Esenbeckia*, dictamnina, 4-metoxi-2-(3'-pentil)

quinolina, 1,4-dihidro-1-metil-2-(3'-pentil)quinolin-4-ona, nove derivados indólicos como 7-isopentenilindol, 6-isopentenilindol, 5-isopentenilindol, annonidina A, annonidina C, 7-indolcarbaldeído, 7-indolmetanol, leiocarpol e leiocarpadiol, as três lignanas, sesamina, metilpiperitol e liriotesinol, a cumarina (+)-marmesina e metil-4-isopreniloxi-trans-cinamato (Monache *et al.* 1989). A continuidade desse último trabalho permitiu a identificação de três derivados indólicos, leiocarpatriol A, leiocarpatriol B, leiocarpona e duas amidas (A - C₂₀H₂₁NO₄ e B - C₁₉H₁₉NO₄) (Monache *et al.* 1990). Dois novos alcalóides foram isolados das folhas de *E. leiocarpa*, leiokinina A e leiokinina B (Nakatsu *et al.* 1990).

Devido à presença desses alcalóides nas folhas dessa planta, o mono-carvoeiro ou muriqui (*Brachyteles arachnoides*) evita se alimentar das suas folhas, embora *E. leiocarpa* seja uma das espécies mais abundantes em seu habitat.

Os extratos clorofórmicos de *E. leiocarpa* demonstraram atividade anti-alimentar em larvas de lagarta-rosada, *Pectinophora gossypiella* (Nakatsu *et al.* 1990).

1.3. Inibidores da Acetilcolinesterase

As plantas produzem uma vasta diversidade de compostos orgânicos, sendo que, a grande maioria não parece participar diretamente de seu crescimento e desenvolvimento. Esses compostos distribuídos em classes, como alcalóides, terpenóides, compostos fenólicos e cumarinas, tradicionalmente chamados de metabólitos secundários, estão distribuídos em diversos grupos taxonômicos dentro do Reino Plantae e suas funções ainda não estão completamente compreendidas. Dentre essas, os alcalóides têm grande relevância para a medicina por possuírem atividades biológicas importantes e servirem de modelos moleculares para a síntese de novos fármacos (Croteau *et al.* 2000).

Os fármacos inibidores da acetilcolinesterase (AChE) ou anticolinesterásicos afetam tanto as sinapses colinérgicas periféricas quanto as centrais. Os anticolinesterásicos são classificados de acordo com seu tempo de inibição e estabilidade do complexo enzima-fármaco.

Os anticolinesterásicos reversíveis são representados principalmente por aminas mono e bis-quaternárias e derivados do ácido carbâmico. O endrofônio é um composto monoquaternário de amônio que se liga apenas ao sítio aniônico da AChE. Essa ligação é facilmente reversível e sua ação é breve, por isso denominado de anticolinesterásico de ação curta. Pertencem ao grupo dos anticolinesterásicos de duração média, a neostigmina, piridostigmina, fisostigmina, amina terciária encontrada na fava-de-calabar. Estes fármacos

são carbamil-ésteres e possuem grupos básicos que se ligam ao sítio aniônico da AChE (Siman & Susman 2000, Rang *et al.* 2007).

Outros inibidores da ACHE apresentam mecanismos diferentes de ação, destacando-se as acridonas, tacrina e velnacrina que são inibidores não competitivos. O donepezil é uma piperidina e possui características competitivas e não competitivas, enquanto que a galantamina, um alcalóide fenantrênico além de um inibidor competitivo de AChE é um modulador alostérico de receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR), elevando a liberação da ACh pela ativação dos receptores pré-sinápticos (DeLucia & Oliveira-Filho 2004, Siman & Susman 2000).

Os anticolinesterásicos irreversíveis são representados por compostos organofosforados, como o diflos, o paration e o ecotiopato. Com exceção do ecotiopato, os IACHÉ irreversíveis são apolares, bastante lipossolúveis, portanto, absorvidos por mucosas e usados como inseticidas. A AChE se torna muito estável quando é inativada pelos anticolinesterásicos irreversíveis e a recuperação da atividade enzimática depende da síntese de novas moléculas da enzima (Marrs 1993, Siman & Susman 2000).

Periféricamente, os IACHÉs aumentam a atividade da ACh nas sinapses pós-ganglionares parassimpáticas, aumentando a secreção das glândulas salivares, lacrimais, brônquicas e gastrointestinais, aumentam a atividade peristáltica, causam broncoconstrição, bradicardia, hipotensão e queda da pressão intra-ocular (Cummings 2000).

Os inibidores de acetilcolinesterase reversíveis que atravessam a barreira hematoencefálica, aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), EUA, são utilizados no tratamento da doença de Alzheimer (DA) como a tacrina (Cognex[®]), donepezil (Aricept[®]), rivastigmina (Exelon[®]) e a galantamina (Reminyl[®]) (Almeida 1998, Racchi *et al.* 2003).

A diversidade estrutural dos IACHÉs e a possibilidade de explorar diversos modos de ação têm estimulado estudos químicos de diversas espécies de plantas e microorganismos. (Viegas Jr. *et al* 2005)

1.4. Memória

Segundo Izquierdo (2002) memória é a aquisição, formação, conservação e a evocação de informações. A aquisição é também chamada de aprendizagem, a evocação é chamada de recordação, lembrança ou recuperação. O aprendizado é uma alteração relativamente permanente do comportamento de um organismo, como resultado da experiência. Já a memória refere-se à habilidade de recordar ou reconhecer experiências anteriores, ocorrendo a representação mental dessas experiências.

A memória pode ser dividida em dois tipos: memória implícita e explícita, na memória implícita o indivíduo consegue demonstrar conhecimento ou habilidade, mas não pode resgatar explicitamente as informações; e a memória explícita, onde o indivíduo consegue encontrar determinado objeto e indicar a consciência de que o objeto é correto. Os circuitos neurais subjacentes a essas formas de memória são diferentes. De modo geral, a memória explícita envolve as estruturas temporais mediais, num sistema constituído pelo córtex pré-frontal, lobo medial temporal e regiões relacionadas. As conexões do neocórtex vão até o córtex endorinal e voltam para o neocórtex, deste modo, as regiões temporais mediais devolvem para as regiões sensoriais corticais as experiências sensoriais, mantendo-as ativas no cérebro. Alguns neurotransmissores produzidos no tronco encefálico como a acetilcolina, 5-hidroxitriptamina (5-HT) e a noradrenalina são importantes nesse tipo de transmissão. A memória implícita inclui principalmente os núcleos basais e o neocórtex, a conexão do córtex com os gânglios basais é unidirecional, portanto o neocórtex não recebe diretamente as informações relacionadas à atividade dos núcleos basais. A dopamina participa indiretamente da formação da memória implícita. Um terceiro tipo de memória é a memória emocional, que possui características de ambos os tipos de memória, seus circuitos são únicos, pois incluem a amígdala (Squire 1987, Wishaw 1989, Kolb & Whishaw 1998, McDermott 2002).

A memória de trabalho é a que usamos para entender a realidade que nos rodeia e pode efetivamente formar ou evocar outras formas de memória (Izquierdo, 2002). Essa memória depende da atividade elétrica de neurônios do córtex pré-frontal, localizado na frente da área motora, e não persiste além disso. Quando cessa a ativação dos neurônios pré-frontais, a memória de trabalho também cessa. Os neurônios do córtex pré-frontal se ativam em resposta às experiências de cada momento, e sua estimulação dura enquanto dura a experiência; às vezes persiste um pouco mais (Izquierdo 2004). A memória de curta duração dura de segundos a horas e é vulnerável a traumatismos cranianos e eletrochoques convulsivos, algo que não ocorre com as memórias de longa duração, que duram dias, anos ou décadas (Izquierdo, 2002).

Os experimentos de Quervain & Parassotiropolos (2005) indicam que a variabilidade genética dos homólogos humanos para as moléculas sinalizadoras relacionadas à memória contribui para as diferenças do desempenho de memória interindividuais e ativações cerebrais relacionadas a memória.

Gais & Born (2003) afirmam que o processo de consolidação da memória é beneficiado pelo sono. Estudos sugerem que a consolidação da memória de longa duração pode ter como base o reprocessamento do novo material adquirido nas ligações hipocampal e cortical durante o sono. A atividade colinérgica é conhecida como um pré-requisito para o

desempenho da memória, A redução da atividade colinérgica induzida por drogas anticolinérgicas ou doenças como o Alzheimer impede o funcionamento correto da memória.

Vários trabalhos também sugerem que as projeções colinérgicas são essenciais para a plasticidade glutamatérgica e aprendizado. Colgin *et al.*(2002) demonstrou que curtos períodos de intensa atividade colinérgica induzem mudanças duradouras no sistema colinérgico e de alguma forma isso se estende para o sistema glutamatérgico. Sugere-se também que a glicose tem importante papel na formação da memória pois além de sua função essencial nas funções metabólicas, a glicose produz substrato para a síntese de ACh e outros neurotransmissores. Seu metabolismo é crítico para a produção de acetil-CoA, um precursor da ACh; a redução do nível de glicose no sangue resulta em uma diminuição da síntese de ACh no cérebro. Estudos mostraram uma maior afinidade hipocampal na captação de ACh após tarefas de trabalho envolvendo memória espacial (Ragozzino *et al.*1996).

1.5. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez em 1907 pelo patologista alemão Alois Alzheimer. Esta patologia é caracterizada por uma desordem neurodegenerativa progressiva de grande impacto sócio-econômico e que dura em média 8,5 anos entre os sintomas clínicos da doença e a morte (Esiri 1996). A DA acomete aproximadamente 1,5% da população com idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-89 e 39% acima dos 90 anos, afetando aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo (Viegas *et al.* 2004). O paciente com Alzheimer apresenta demência progressiva com envolvimento da linguagem, comportamento e memória (Katzman & Jackson 1991). A investigação bioquímica sistêmica do cérebro de pacientes portadores da DA começou no final da década de 1960 e início da década de 1970, estes trabalhos mostraram um déficit substancial neocortical da colina acetiltransferase, enzima responsável pela síntese de ACh. Também foi observado redução na captação de colina e perda do pericário dos neurônios colinérgicos nos núcleos basais de Meynert (Francis *et al.* 1999).

Em portadores de Alzheimer ocorrem mudanças histológicas cerebrais como a formação de placas amilóides extracelulares, que consistem em depósitos extracelulares amorfos da proteína β -amilóide (A β), e apresentam também emaranhados neurofibrilares intraneurais constituídos por filamentos de uma proteína fosforilada associada à microtúbulos (*Tau*) (Cummings *et al.* 1998, Lee, 2001). O déficit colinérgico em doentes com Alzheimer é bem caracterizado, ocorrendo perda localizada de neurônios, principalmente no hipocampo e parte basal do prosencéfalo. A perda de neurônios nos núcleos basais do prosencéfalo

usualmente excede 75% do total da população de neurônios em análises post-mortem (Whitehouse *et al.* 1981, Whitehouse *et al.* 1982, Rang *et al.* 2007). Acredita-se que a perda de neurônios colinérgicos no córtex frontal e hipocampo seja a causa da deficiência cognitiva e perda da memória de curto prazo. A morte de neurônios colinérgicos leva a redução de 80 a 90% da produção de colina-acetil-transferase no hipocampo e córtex temporal e entre 40 e 70% nos córtex parietal e frontal (Davies 1978, Guela & Mesulam 1994).

A Doença de Alzheimer é caracterizada microscopicamente pela presença de placas amilóides extracelulares, consistindo em depósitos amorfos da proteína β -amilóide ($A\beta$) e aglomerados neurofibrilares intraneurais, formado por filamentos da proteína tau (Tau), uma forma fosforilada de proteína associada ao microtúbulo. Ambos são agregados protéicos resultantes do enovelamento errado de proteínas nativas (Selkoe 2004, Selkoe & Schenk 2003, Rang 2007).

Os depósitos amilóides consistem em agregados de $A\beta$ contendo 40 ou 42 resíduos. Estudos indicam que a razão $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ se correlaciona com o aparecimento das placas senis em DA familiar, se caráter genético e hereditário, e com a DA relacionada diretamente com o envelhecimento (Shelton *et al.* 2009). Ambas as proteínas se agregam para formar as placas, porém a $A\beta_{42}$ é a maior responsável pela formação das placas. As proteínas $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$ são produzidas por clivagem proteolítica de uma proteína precursora da proteína amilóide (PPA) mais longa que é clivada por secretases. Normalmente a α -secretase age para liberar o grande domínio extracelular como PPA solúvel (sPPA) e possui funções tróficas, o que pode ser chamado de “via fisiológica”. A formação de $A\beta$ envolve a clivagem em dois pontos, incluindo um no espaço intermembranoso da PPA, pelas β e γ -secretases. A γ -secretases é um complexo intramembranoso de várias proteínas que cliva a PPA em pontos diferentes, gerando fragmentos de diferentes dimensões (Selkoe 2004, Selkoe & Schenk 2003). Entre essas proteínas temos a presenilina 1 (PS1) e presenilina 2, são proteínas politópicas que estão relacionadas com a mediação da γ -secretases. Mutações na PS1 estão associadas ao Alzheimer familiar, pois levam a um aumento na produção de $A\beta_{42}$, da “via amiloidogênica” (Li, 2000). Segundo a Hipótese da Cascata Amilóide as mudanças graduais no estado estacionário da $A\beta$ iniciam uma cascata de eventos. O aumento de $A\beta_{42}$ pela clivagem da PPA causa a formação de oligômeros que causam crescentes e permanentes mudanças na função sináptica. Em paralelo formam-se depósitos microscópicos difusos de $A\beta$ no parênquima cerebral, inicialmente de forma não fibrilar. Quando essas placas difusas começam a adquirir forma fibrilar de $A\beta$ é observada uma resposta inflamatória local, com aparecimento de astrócitos e micróglia. Esse evento resulta em stress oxidativo, alteração da homeostase iônica entre outras mudanças bioquímicas. Emaranhados neurofibrilares são

induzidos pela alteração de quinases e fosfatases, contribuindo para o descontrole de sistemas fisiológicos, como alguns transportes axonais. A cascata culmina em grande disfunção sináptica/neural e morte celular levando a demência progressiva e tauopatia (Haass & Selkoe, 2007, Rang *et al.* 2007).

Outra proteína importante no contexto bioquímico da DA é a Tau, proteína que compõe os agregados neurofibrilares. A proteína tau está associada aos microtúbulos juntamente com outras proteínas de microtubulos (MAPs) como a MAP1 e MAP2. Na DA e em outras tauopatias a Tau é anormalmente fosforilada e depositada intracelularmente com filamentos helicoidais pareados. Quando as células morrem esses filamentos formam agregados neurofibrilares extracelulares. Como a relação entre os agregados neurofibrilares e as placas A β não é muito precisa novas hipóteses do processo fisiopatológico da DA surgiram (Iqbal *et al.* 2009).

Segundo a Hipótese da Transdução Metabólica a DA e outras tauopatias dependem de uma predisposição genética e são ativadas por alguns fatores ambientais, afetando uma ou mais vias de transdução resultando em um desequilíbrio na fosforilação e desfosforilação de proteínas, como a hiperfosforilação da Tau. Em doentes com Alzheimer o desequilíbrio entre fosforilação/desfosforilação dos neurônios afetados é responsável em parte pelo decréscimo das Tau-fosfatases. Essa complexa sequência de eventos relacionadas com a fosforilação pode levar a mutação de proteínas transmembranas como APP, PP1 e PP2 (Iqbal *et al.* 2009).

A terapia mais eficaz contra a DA tem sido o tratamento com inibidores de AChE. Estas substâncias agem estabilizando as funções cognitivas em um período de cerca de um ano em aproximadamente 50% dos pacientes. Em alguns pacientes, cerca de 20%, esta estabilidade cognitiva pode se manter por um período maior que 24 meses (Giacobini 2003). Esta abordagem é denominada “Hipótese Colinérgica da Doença de Alzheimer” e propõe que a degeneração dos neurônios colinérgicos dos núcleos basais do prosencéfalo associada à perda de neurotransmissão colinérgica no córtex cerebral e em outras áreas contribui para a deterioração das funções cognitivas observadas em pacientes com DA. Acreditava-se que a terapêutica baseada em inibidores de colinesterases se limitava a melhorar a transmissão colinérgica pelo aumento de acetilcolina sem interferir na cascata neurodegenerativa da doença, apenas amenizando alguns sintomas da doença (Bartus *et al.* 1982, Bullock *et al.* 2005). Porém, pesquisas recentes mostraram que a acetilcolinesterase (AChE) apresenta um papel importante na deposição da proteína A β , algumas vezes em função catalítica, a AChE pode influenciar a formação fibrilar da proteína, sendo que este efeito independe da atividade normal de hidrólise da enzima e está associada com o sítio aniônico periférico (DeFerrari *et*

al. 2001). Estudos sugerem que agentes colinérgicos podem ativar vias não-amiloidogênicas com potencial para prevenir a formação da proteína β -amilóide (Racchi *et al.* 2004).

Alguns fármacos anticolinesterásicos utilizados para o tratamento da DA estão em desenvolvimento e outros já são bem conhecidos. A tacrina, isolada a mais de 40 anos, foi a primeira droga aprovada pela FDA em 1993. A tacrina é um anticolinesterásico que se liga ao sítio aniônico da enzima e apresenta atividade farmacológica adicional nos níveis de monoaminas e canais iônicos. Essa substância aparentemente melhora a função cognitiva, e os déficits comportamentais em portadores de DA em doses de 80-160 mg.dia⁻¹ com uma significativa relação dose-resposta. O aumento de transaminases durante o tratamento em alguns pacientes pode ter significância clínica e tem limitado seu uso. Pode também haver uma hiperestimulação do sistema colinérgico periférico manifestando-se como desconforto gastrointestinal, dores abdominais, náuseas, vômito e diarreia (Racchi *et al.* 2004, Francis *et al.* 1999).

O donezepil, um derivado da piperidina, é inibidor reversível da acetilcolinesterase, não competitivo, com alta afinidade para AChE e baixa afinidade para BuChE. Este fármaco se liga ao sítio aniônico da enzima e atua tanto de forma competitiva como não-competitiva. O tratamento de animais, com doses de 5 a 10 mg.dia⁻¹, tem mostrado melhora significativa da cognição comparadas com placebo. Os efeitos benéficos na cognição são observados em experiências de curtos e longos períodos mostrando um adiamento significativo na progressão dos sintomas. Porém, este fármaco também causa os efeitos colaterais colinérgicos típicos como náuseas, vômito, constipação e diarreia (Racchi *et al.* 2004, Francis *et al.* 1999).

A rivastigmina é um inibidor pseudo-irreversível da acetilcolinesterase, que se liga ao sítio esterásico da enzima. Estudos pré-clínicos demonstraram melhora na cognição e significativa seletividade para o SNC. Doses de 612 mg/dia mostraram melhora na cognição, atividades diárias e comportamento de pacientes com DA em estágio moderado. Os efeitos colaterais são os esperados com a terapia anticolinesterásica, principalmente os efeitos colaterais do sistema gastrointestinal que costumam ocorrer na fase inicial do tratamento, com doses altas, mas diminuem na fase de manutenção quando a dosagem é reduzida (Francis *et al.* 1999).

A última droga aprovada pela FDA para o tratamento da DA foi a galantamina, um alcalóide terciário fenantrênico isolado de *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae), que inibe a AChE de forma reversível, competitiva e modula de forma alostérica os receptores nicotínicos da acetilcolina (Almeida 1998). Estudos sobre a eficácia de galantamina demonstraram que em doses baixas, 16 a 24 mg/dia, produz efeitos benéficos no tratamento dos sintomas cognitivos e não-cognitivos da DA, apresentando uma farmacocinética favorável com uma

meia-vida relativamente curta (aproximadamente 7 h) e alta biodisponibilidade. Seus efeitos colaterais incluem problemas gastrointestinais de média intensidade (Almeida 1998, Racchi *et al.* 2004).

A terapia com inibidores de colinesterases, principalmente o donepezil, rivastigmina e galantamina, também poderia ter efeitos positivos no tratamento de outras doenças como a deficiência cognitiva leve (MCI), Demência com Corpos de Lewy (DCL) (a segunda maior causa de demência após a DA), Mal de Parkinson, demência vascular, Síndrome de Down, lesões traumáticas cerebrais, Mal de Korsakoff, entre outros distúrbios ligados à memória (Giacobini 2003).

Tratamentos correlacionados com o metabolismo PPA/A β também estão sendo estudados para o tratamento da DA. Abordagens relacionadas com a inibição das secretases mostraram que há dificuldade em se encontrar moléculas inibidoras da β -secretase de baixo peso molecular capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica e a inibição de γ -secretases pode afetar proteínas sinalizadoras como as Notch e outros receptores de membrana. Outra proposta seria a produção de anticorpos de imunização da A β , porém testes em ratos transgênicos para a produção de PPA mostraram uma resposta inflamatória indesejada no sistema nervoso central (Hardy & Selkoe, 2002).

Atualmente, abordagens relacionadas à homeostase do colesterol com dieta equilibrada e uso crônico de redutores de colesterol estão associadas com menor incidência de DA devido à redução da síntese da A β . O uso de antioxidantes, com propriedades neuroprotetoras ou neurotróficas até o momento não demonstrou melhora cognitiva significativa em seres humanos (Hardy & Selkoe, 2002).

Portanto, o tratamento clínico válido para pacientes com DA, continua sendo a intervenção sintomática baseada em inibidores de acetilcolinesterase e fármacos adjuvantes para melhorar os distúrbios comportamentais (Hardy & Selkoe, 2002).

A busca de inibidores da acetilcolinesterase, para o tratamento da Doença de Alzheimer, em extratos de espécies vegetais da flora brasileira, já vem sendo realizada pelo grupo, inclusive com uma patente que contempla o desenvolvimento de um medicamento a partir de uma espécie vegetal nativa (Patente DEINPI-010247, 08-10-03). Nesse sentido, este trabalho surgiu do projeto temático “Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Novos Fármacos - Fase II” dentro do programa BIOTA/FAPESP, cujos objetivos principais são a descoberta de fármacos de alto valor comercial, a conservação e o desenvolvimento sustentável dos biomas Cerrado e Mata Atlântica do Estado de São Paulo.

2. Objetivos

2.1. Geral

Realizar o estudo químico de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. direcionado para a obtenção dos compostos responsáveis pela atividade inibidora de acetilcolinesterase.

2.2. Específicos

1. Avaliar o potencial anticolinesterásico do extrato etanólico de caules de *E. leiocarpa*.
2. Fracionar o extrato etanólico e monitorar as frações com a atividade anticolinesterásica.
3. Purificar por CLAE os compostos ativos presentes na fração alcaloídica (FALC).
4. Identificar por métodos espectrométricos os compostos puros
5. Avaliar a fração alcaloídica nas atividades locomotora, memória e ansiedade.

3. Material e Métodos

3.1. Material Botânico - *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

A coleta dos caules (ramos caulinares sem folhas) de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. foi realizada na Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”(CUASO – USP), São Paulo, em janeiro de 2007. Após a triagem, o material foi colocado em estufa para secagem com circulação de ar à temperatura de 40 °C. O material seco foi moído em moinho de facas para obtenção do pó (Moinho de facas TE 625 Tipo Cróton, Marca TECNAL, Mesh 20).

Uma exsiccata da planta encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da USP sob o número SPF 1169.

3.2. Obtenção do Extrato Etanólico (EE) dos Caules de *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

Foram separados 1000g de pó do caule de *E. leiocarpa*, divididos em duas porções de 500 g e submetidos à maceração com etanol (EtOH), adicionando cerca de 1500 mL do solvente ao material, à temperatura ambiente. A cada 7 dias a solução etanólica foi filtrada e o solvente renovado, este processo foi repetido por sete vezes (Figura 1). Após a filtração, a solução etanólica obtida foi concentrada em evaporador rotatório (BUCHI), separada em pequenos recipientes e levada ao banho-maria (60 °C) para eliminação completa do etanol e obtenção do extrato etanólico (EE) bruto seco.

Paralelamente, duas porções de 120 g do pó do caule de *E. leiocarpa* foram submetidas à extração usando etanol como solvente em sistema automático ASE 300 (*Accelerated Solvent Extractor*, DIONEX). Neste processo, as 120 g do pó do caule foram divididas em três celas (30g/ cela) e submetidas a dois processos de extração: o primeiro à temperatura ambiente (ASE-TA) e o segundo a 70 °C (ASE-70), ambos com um ciclo de extração de 20 minutos e sob pressão de 1500 psi (N₂). A eficiência dos três métodos de extração para obtenção do EE foi realizada através do cálculo do rendimento das massas e comparação dos perfis cromatográficos das frações alcaloídicas obtidas de cada processo.

3.3. Obtenção da Fração Alcaloídica (FALC) de *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

O EE obtido pelos três métodos de extração foi ressuspensão em água ácida HCl (0,1 M) e filtrado, o processo foi repetido 7 vezes. A fase aquosa ácida foi particionada com 60 mL de n-hexano (7 vezes), as soluções hexânicas foram concentradas em evaporador rotatório dando origem à FHex. A fase aquosa ácida foi alcalinizada até pH 10 com hidróxido de amônio e particionada com 60 mL de clorofórmio até esgotamento dos alcalóides (7 vezes) (Figura 1). A fração clorofórmica resultante foi concentrada em evaporador rotatório e banho-maria, obtendo-se a fração alcaloídica (FALC). O extrato etanólico, o resíduo insolúvel do EE, a fração hexânica (FHex), a fração alcaloídica (FALC) e a fração aquosa alcalina foram avaliadas quanto a atividade anticolinesterásica.

A FALC foi transformada em cloridrato utilizando-se água ácida até pH 2 (HCl 0,1 M) obtendo-se a FALC-Cl, este procedimento foi necessário para o tratamento dos animais.

3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da FALC de *E. leiocarpa*

A padronização do processo de purificação da FALC foi realizada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Varian Pro Star 310 com loop de 20 µL, usando uma coluna de fase reversa Phenomenex C-18 (250 x 4,6 mm). 20 µL da amostra de FALC na concentração de 1 mg/mL foram injetados utilizando fluxo de 1 mL/min, usando como fase móvel ACN:MeOH:H₂O (10:45:45). As três frações alcaloídicas, obtidas a partir da maceração, ASE-TA e ASE-70, foram analisadas em CLAE analítico para comparação dos perfis cromatográficos.

Para a purificação em CLAE preparativo, a FALC foi diluída em MeOH na concentração de 10 mg/mL e submetida a CLAE de fase reversa utilizando o sistema Varian Prep-Star 400, com coluna preparativa Shimadzu ODS (250 x 21,2 mm), fluxo de 8 mL/min, a fase móvel foi a mesma utilizada na CLAE analítica e o detector de UV a 242 nm. A separação dos compostos por CLAE preparativa foi realizada no Instituto de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto sob supervisão do Dr. Norberto Peporine Lopes.

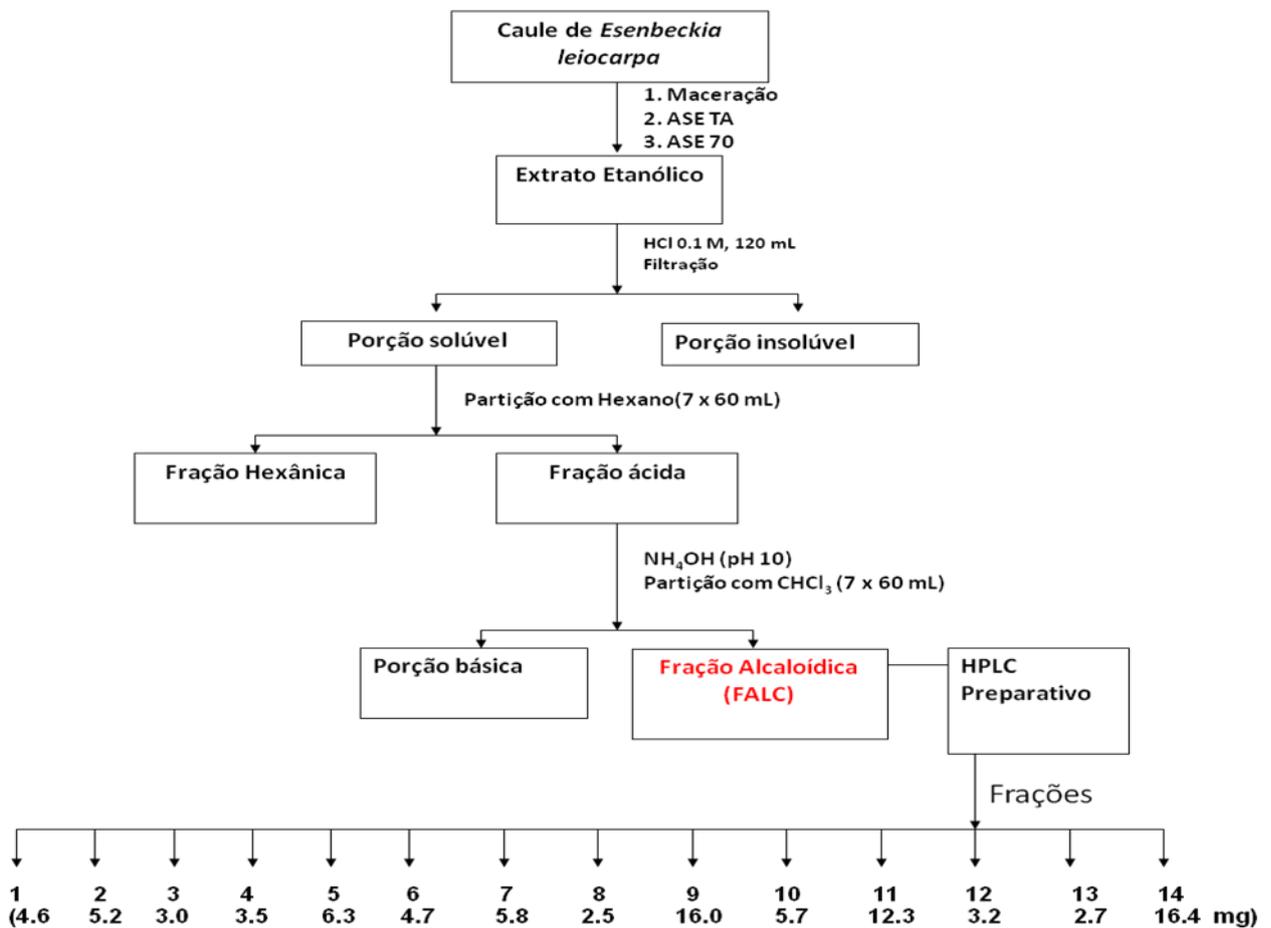


Figura 1: Método fitoquímico de extração da fração alcaloídica a partir do extrato etanólico dos caules de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e purificação da FALC em CLAE. Os números entre parênteses representam os rendimentos das frações, em massa, em relação à FALC (105 mg).

3.5. Identificação dos Alcalóides de *E. leiocarpa*

Os alcalóides purificados foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (^1H , ^{13}C e DEPT) e 2D (1H-1H gCOSY, gHMBC e gHMBC) em espectrômetro Varian INOVA 500 (11,7T) nas frequências de 500 MHz para ^1H -RMN e 125 MHz para ^{13}C -RMN, utilizando clorofórmio deuterado (CDCl_3) como padrão interno. Estas análises foram

realizadas no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho de Araraquara sob a supervisão da Dra. Vanderlan da Silva Bolzani.

3.6. Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase

3.6.1. Ensaio Qualitativo por Autografia

Amostras do extrato bruto (200 µg), das frações semi-purificadas e frações purificadas (50 µg) foram analisadas por CCD de sílica gel F₂₅₄ (Merck). Como controle positivo foi utilizado 0,5 µg de galantamina. Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com uma solução da enzima acetilcolinesterase (6,66 U) acrescida de albumina bovina fração V (0,1%). Logo após, a placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos, e em seguida borrifada com uma mistura da solução etanólica de acetato de 1-naftila (5 mL; 0,25%) e aquosa do sal Fast Blue B (20 mL; 0,25%) (Marston *et al.* 2002).

O aparecimento de mancha branca sobre um fundo roxo da placa cromatográfica indica inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase.

Os cromatogramas obtidos foram observados em λ 254 e 366 nm e fotografados com câmera Epson. Os valores do fator de retenção (Rf) foram calculados onde houve inibição da atividade enzimática, observados pela presença de halos brancos sobre o fundo roxo.

3.6.2. Quantificação da Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase

A quantificação da atividade inibidora da acetilcolinesterase do EE, da FHex, da FALC e dos compostos isolados foi realizada usando um leitor KC4-Biotek para microplaca de 96 cavidades, baseado no método de Ellman (Ellman *et al.* 1961). Nas 96 cavidades da microplaca, foram adicionados 25 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 125 µL de DTNB dissolvido na solução C (3 mM), 50 µL da solução B e 25 µL da amostra de extrato dissolvida em metanol e diluída 10 vezes na solução A para obter uma concentração final de 0,2 mg/mL (Rhee *et al.* 2001; Trevisan *et al.* 2003). A absorbância foi medida a 405 nm a cada 30 segundos por três vezes. Em seguida, foram adicionados 25 µL da enzima acetilcolinesterase (0,22 U/mL) e a absorbância medida novamente após 10 e 20 minutos de incubação da enzima. A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada através da comparação

das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao branco (10% de MeOH na solução A, considerada atividade total da AChE, 100%).

Soluções - A: Tris/HCl 50 mM, pH=8; **B:** Tris/HCL 50 mM, pH=8, com 0,1% de albumina bovina fração V; **C:** Tris/HCl 50 mM, pH=8, com 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl₂ .6H₂ O.

3.7. Estudos Comportamentais

Estes testes foram realizados no Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP) sob a supervisão da Dra. Tânia Araújo Viel.

Para todos os testes foram utilizados camundongos C57/Black6, machos de 8 a 10 semanas de idade e peso médio de 23 g, após 15 a 20 dias de ambientação no biotério do Departamento da FCMSCSP. Os animais eram provenientes do biotério central da UNIFESP (CEDEME).

3.7.1. Teste de Atividade Locomotora

A atividade locomotora foi avaliada utilizando-se um actômetro eletrônico Ugo Basile modelo 7430. O equipamento consiste de uma caixa de acrílico transparente (35 x 23 x 20 cm) com um conjunto de sensores horizontais para registro da atividade locomotora (deambulação) e um conjunto de sensores verticais para registrar os movimentação vertical (*rearing*). Os camundongos foram separados em 4 grupos para a realização dos tratamentos:

Grupo A: oito animais tratados com solução salina (NaCl 0,9%) acrescida de 4% de EtOH.

Grupo B: oito animais tratados com FALC 10 mg/kg dissolvida em solução fisiológica com 4% de EtOH.

Grupo C: nove animais tratados com FALC 40 mg/kg dissolvida em solução fisiológica com 4% de EtOH.

Grupo D: oito animais tratados com galantamina 2 mg/ kg (GAL).

Os tratamentos com a FALC foram realizados por via intraperitoneal (*i.p.*). Após 10 minutos da aplicação, cada camundongo foi colocado individualmente no actômetro e a locomoção medida imediatamente, por 5 minutos. Durante esse período, os comportamentos de auto-limpeza (“grooming”), imobilidade e defecação, como índice de emocionalidade, também foram observados.

3.7.2. Avaliação da Atividade Ansiolítica

Para esse teste foi utilizado o labirinto em cruz elevado (LCE) de quatro braços. O equipamento consiste em um labirinto de madeira, composto por dois braços abertos e dois fechados. Após 10 minutos de tratamento dos animais com as soluções aplicadas por via *i.p.*, os mesmos foram colocados no centro do labirinto e foram medidos o número de entradas nos braços abertos e fechados, o tempo de permanência em cada braço (aberto e fechado), assim como o número de imersões de cabeça (“head-dipping”) e defecações. Os animais foram observados por 5 minutos e os dados analisados no *software* GraphPad Prism 5. Os tratamentos dos grupos de camundongos foram semelhantes ao teste de atividade locomotora, com alteração apenas no número de animais de cada grupo.

Grupo A: dez animais; Grupo B: dez animais; Grupo C: dez animais e Grupo D: nove animais.

3.7.3. Avaliação dos Processos de Memória pelo Método de “Esquiva Inibitória”

Para avaliação dos processos de memória foi utilizado o equipamento de esquiva inibitória (modelo Ugo Basile, Itália) que consiste em uma gaiola dividida em dois compartimentos iguais, sendo um claro, provido de uma lâmpada branca de 40 Watts, e outro escuro, separados por uma porta-guilhotina. Os animais foram colocados individualmente na parte iluminada da gaiola para avaliar a memória recente. Foi medida a latência, em segundos, para os animais passarem para o compartimento escuro. No lado escuro, o animal recebeu um choque de 0,5 mA por 2 seg, deflagrado pelas barras metálicas localizadas na base desse compartimento. A latência máxima permitida para cada animal foi de 298,0 segundos.

Os animais do Grupo A (n=10), Grupo B (n=10), Grupo C (n=10) e Grupo D (n=9) foram retirados do labirinto em cruz elevado (atividade ansiolítica) e submetidos ao treino na esquiva inibitória onde a latência foi calculada. Um novo teste foi feito 24 horas depois do treino e outro após 7 dias.

3.8. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias. A comparação entre o grupo controle e as concentrações da FALC foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. A comparação entre o grupo controle e o controle

positivo do teste foi realizada pelo teste “t Student”. Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Os valores de IC_{50} (concentração que inibe em 50% a atividade da acetilcolinesterase) dos alcalóides foram determinados através de uma curva concentração-resposta e análise de regressão não linear.

4. Resultados e Discussão

4.1. Resultados Fitoquímicos

4.1.1. Obtenção dos Extratos Etanólicos

Os resultados em massas e rendimentos em porcentagem do extrato etanólico e da FALC, em relação ao pó do caule e EE, respectivamente, obtidos a partir dos três métodos de extração estão apresentados na Tabela 1.

O rendimento da extração etanólica do pó do caule (1000 g) de *E. leiocarpa* por maceração durante 7 dias foi de 3,57% (35,79 g de EE) (Tabela 1). A alcalinização do EE (23,925 g), obtido por maceração, até pH 10 e partição com CHCl_3 originou a fração alcaloídica (FALC) com massa de 0,497 g (2,07%) (Tabela 1).

O rendimento da extração etanólica de 120 g do pó do caule usando o extrator automático ASE a temperatura ambiente e ASE 70 °C, durante 20 minutos, foi de 1,61% (1,932 g de EE) e 2,53% (3,045 g de EE), respectivamente. A alcalinização do EE, 1,932 g (ASE TA) e 3,045 g (ASE 70), até pH 10 e partição com CHCl_3 originou as FALCs com massas de 0,073 g (3,77%) e 0,146 g (4,79%), respectivamente (Tabela 1).

O melhor rendimento do EE obtido da extração por maceração se deve ao fato do material ter sido exposto ao solvente por um tempo maior, neste processo o etanol permaneceu em contato com o pó do caule durante sete dias e o solvente foi renovado por 7 vezes. Segundo Richter *et al.* (1996) e Kaufmann & Christen (2002), material vegetal exposto a um volume maior de solvente por um período mais longo auxilia na obtenção de maiores massas de extratos pois há mais tempo para o solvente extrair as substâncias presentes na matriz e a troca constante dos solventes aumenta a eficiência da extração.

A FALC obtida a partir do ASE-70 teve um maior rendimento devido ao aumento da temperatura e pressão. O uso de altas temperaturas aumenta a capacidade do solvente de solubilizar as amostras. A introdução de solvente em fluxo pode aumentar o gradiente de concentração entre a solução presente na célula e a superfície da matriz da amostra. O aumento da temperatura pode também romper a forte interação matriz-soluto causada por forças de van der Waals, pontes de hidrogênio e atração dipolo-dipolo. Por reduzir a viscosidade, o aumento de temperatura pode diminuir a tensão superficial do soluto, do solvente e da matriz da amostra, facilitando o contato do solvente com o analito. O uso de pressão pode auxiliar a extração de materiais presos em poros e regiões da matriz que não são

alcançados em condições atmosféricas, como alguns compartimentos subcelulares (Ong *et al.* 2000, Richter *et al.* 1996). A utilização de pressão para a extração de alcalóides é importante já que os mesmos costumam ser produzidos e armazenados em regiões como vesículas, pró-vacúolos, vacúolos e regiões restritas na membrana do retículo endoplasmático (Hashimoto & Yamada, 1994). Brachet *et al.*(2001) demonstraram uma maior eficiência na extração do alcalóide cocaína e benzoilecgonina das folhas de *Eritrhoxylum coca* L. à temperatura de 80 °C e pressão de 20MPa, utilizando ASE.

Outra vantagem do método ASE é a redução do volume de solvente usado (Ong *et al.* 2000, Richter *et al.* 1996). Na maceração foi utilizado um total de 10.500 ml para 500 g de pó de caule seco, o equivalente a 21 ml de solvente para cada grama de pó. Tanto o método ASE TA quanto o método ASE 70 utilizam 50 ml de solvente para cada cela com 40 g de pó de caule seco, o que equivale a 1,25 ml de solvente por grama de pó.

Tabela 1: Massas do extrato etanólico (EE) e da fração alcaloídica (FALC) e rendimentos do EE e da FALC em relação ao pó do caule e EE, respectivamente, obtido pelos três processos de extração: maceração, ASE extração à temperatura ambiente (ASE TA) e ASE extração a 70 °C (ASE 70).

Amostra	Massas do material (g) e Rendimento (%) por Processo de Extração		
	Maceração	ASE TA	ASE 70 °C
Pó do caule	1000,000	120,000	120,000
EE	35,798 (3,57%)	1,932 (1,61%)	3,045 (2,53%)
FALC	0,497 (2,07%)	0,073 (3,77%)	0,146 (4,79%)

4.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Depois de otimizado em CLAE analítica o sistema de eluente para a separação dos alcalóides (FALC) em CLAE analítico (Figura 2), foi realizada a purificação da FALC em sistema CLAE preparativo. A FALC de *E. leiocarpa* (m = 105,0 mg) foi dissolvida em metanol (10 mg/mL) e submetida a purificação em CLAE preparativo usando como fase móvel acetonitrila:metanol:água (10:45:45), com detector de UV 242 nm e fluxo de 8 mL/min, originando 14 frações (Frações 1 – 14).

A Tabela 2 mostra o tempo de retenção, as massas e a recuperação (%) das 14 frações obtidas da FALC por CLAE preparativa, em negrito estão as frações majoritárias que podem ser observados também no perfil cromatográfico da CLAE analítica (Figura 2). O pico 9, com tempo de retenção de 19,32 min e massa de 16,0 mg, foi o que apresentou melhor rendimento. As 14 frações obtidas foram avaliadas para a detecção da atividade anticolinesterásica por autografia e para as frações mais ativas a atividade IChE foi quantificada. As frações 7, 9, 10, 11 e 12 foram analisadas por ^1H RMN e ^{13}C RMN para a identificação dos alcalóides.

4.1.3. Comparação dos Perfis Cromatográficos das FALCs obtidas por Maceração, ASE-TA e ASE-70

Os perfis cromatográficos das FALCs obtidas a partir dos três métodos de extração estão apresentados na Figura 3. O perfil cromatográfico da FALC obtida a partir da maceração está representado em azul e é o mesmo apresentado na Figura 2. Em vermelho está o perfil cromatográfico da FALC obtida a partir do método ASE TA e em verde o perfil cromatográfico da FALC obtida a partir do método ASE 70. As FALCs obtidas a partir dos três métodos de extração apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, com seis picos majoritários (Figura 3).

Não há diferença significativa nos perfis cromatográficos das FALCs obtidas a partir dos três métodos, demonstrando que não houve alteração nos constituintes da FALC obtidas sob pressão e temperatura elevadas. Considerando essa afirmação, o método ASE 70 demonstrou maior eficiência em termos de economia de solvente, tempo de extração e rendimento da FALC, corroborando com os resultados de Richter *et al.* (1996) e Brachet *et al.*(2001), que obtiveram melhor rendimento de alcalóides sob temperatura e pressão elevadas.

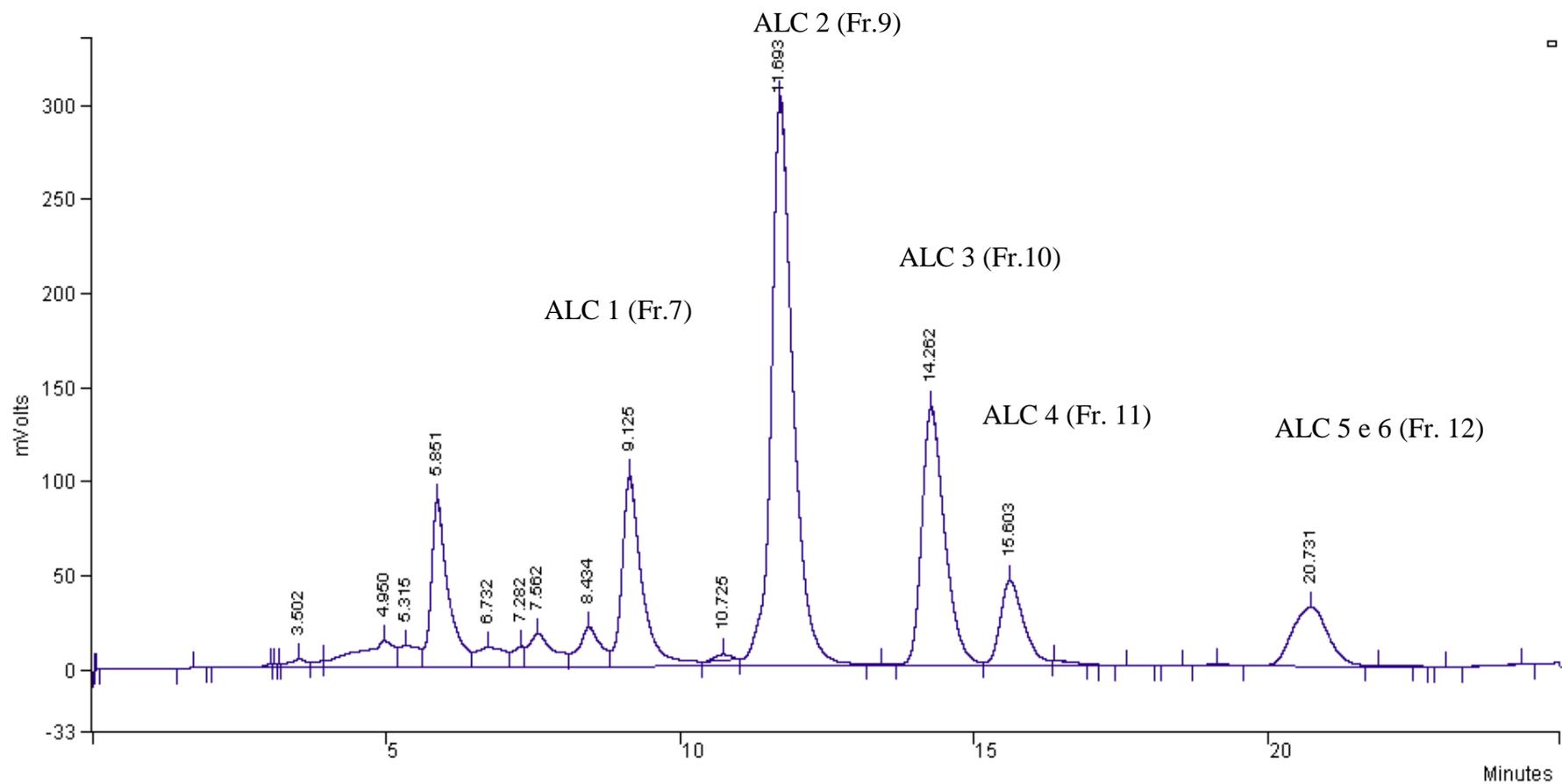


Figura 2: Perfil cromatográfico em CLAE analítico da FALC obtida a partir do caule de *E. leiocarpa*. 20 μ L da amostra de FALC (1 mg/mL) foram injetados em coluna de fase reversa Phenomenex C-18 (250 x 4,6 mm) utilizando fluxo de 1 mL/min. Os picos ALC 1, ALC 2, ALC 3, ALC 4 e ALC 5 e 6 foram identificados e testados para a atividade anticolinesterásica.

Tabela 2. Tempo de retenção, massas e rendimento das frações obtidas, da purificação em CLAE preparativo, da FALC (105,0 mg) de *E. leiocarpa*.

Amostras	Tempo de retenção (min)	Massas (mg)	Rendimento (%)
Fração 1	0,00	4,6	4,3
Fração 2	8,67	5,2	4,9
Fração 3	9,08	3,0	2,8
Fração 4	9,75	3,5	3,3
Fração 5	10,37	6,3	6,0
Fração 6	14,52	4,7	4,4
Fração 7	15,46	5,8	5,5
Fração 8	18,18	2,5	2,3
Fração 9	19,32	16,0	15,2
Fração 10	24,53	5,7	5,4
Fração 11	26,22	12,3	11,7
Fração 12	34,35	3,2	3,0
Fração 13	41,51	2,7	2,5
Fração 14	Até 50,00	16,4	15,6

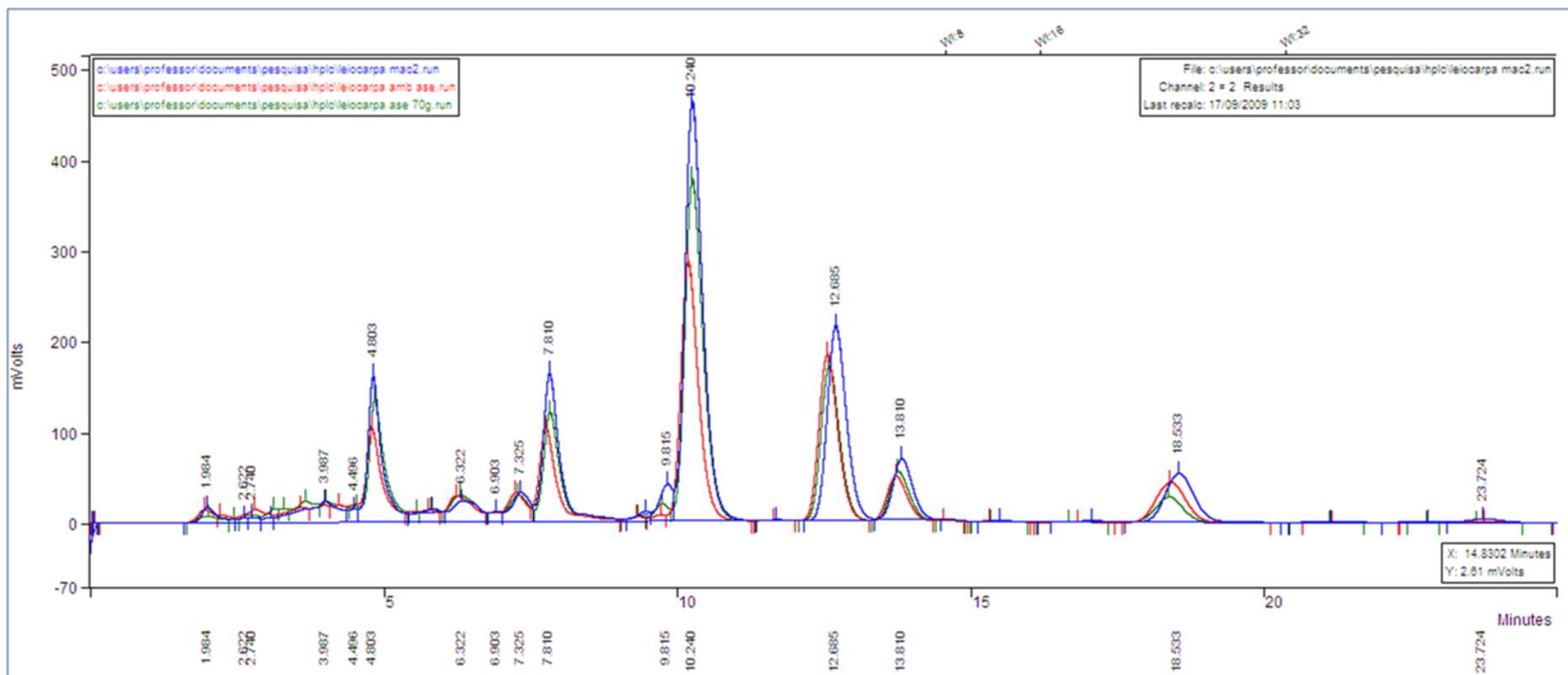


Figura 3: Comparação dos perfis cromatográficos da fração alcaloídica obtida pelos três métodos de extração. O cromatograma em azul representa o método de maceração, o cromatograma em vermelho representa o método de ASE na temperatura ambiente e o cromatograma em verde representa o método de ASE a 70°C.

4.1.4. Identificação dos Alcalóides Obtidos da FALC

A - Frações 7 e 9

As Tabelas 3a e 3b mostram os dados de ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H , respectivamente, relacionados às frações 7 e 9. Os alcalóides purificados e identificados nas frações 7 e 9 foram denominados, ALC1 e ALC 2, respectivamente. Os dados de ^{13}C e ^1H do ALC 1 apresentados nas Tabelas 3a e 3b foram comparados com os obtidos por Nakatsu *et al.* (1990) e permitiram a identificação do alcalóide leiokinina A (Figura 7).

As Figuras 4a - c mostram os dados de ressonância magnética nuclear de ^1H do ALC1 (fração 7), usando clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente em equipamento INOVA-500. As Figuras 4b e 4c mostram o espectro desdobrado da Figura 4a.

O alcalóide leiokinina A foi identificado pela primeira vez em *E. leiocarpa* por Nakatsu *et al.* (1990), utilizando também espectro de infravermelho (1615 e 1590 cm^{-1}), espectro de ultravioleta [λ máximo 343 (ϵ $12,700$), 335 (ϵ $12,00$) a 242 nm (ϵ $12,900$)] e espectro RMN $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ 2D COSY. Segundo o autor, a leiokinina A (3-metoxi-1-metil-2-propil-4-quinolona) corresponde a 0,01% do extrato clorofórmico das folhas secas.

As Figuras 5a-e mostram os dados de ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H do ALC2. Para a identificação do ALC2 também foram utilizados dados RMN de duas dimensões gHMBC, gHMQC e gCOSY. As Figuras 5a-c representam os dados de RMN de ^1H e as Figuras 5b e 5c mostram o desdobramento da Figura 5a. A Figura 5b amplifica o perfil nas regiões de 0,7 a 1,9 ppm e a Figura 5c amplifica as regiões de 6,5 a 8,5 ppm. As Figuras 5d-e representam os espectros de RMN de ^{13}C , sendo que a Figuras 5e representa o desdobramento de 110 a 180 ppm da Figura 5d.

Os dados obtidos por ressonância magnética de ALC2 foram comparados com os dados de Akhmedzhanova *et al.*(1986) e permitiram a identificação do alcalóide 2-aquil-4-quinolinônico conhecido como leptomerina. Akhmedzhanova *et al.* (1986) isolaram este alcalóide da espécie *Haplophyllum leptomerum* Lincz. e o descreveu como um sólido bastante solúvel em ácidos, clorofórmio e etanol, pouco solúvel em éter, acetona e insolúvel em água e bases. O autor também utilizou espectrometria de infravermelho (1635 , 1600 e 1580 cm^{-1}) e de ultravioleta [λ máximo 213 (ϵ $3,630$), $230,5$ (ϵ $3,610$), $285,5$ (ϵ $3,310$) e 294 nm (ϵ $3,400$)] para a identificação de leptomerina.

As estruturas químicas dos alcalóides ALC1 (leiokinina A) e ALC2 (leptomerina), apresentada na Figura 7 correspondem às mesmas estruturas identificadas por Nakatsu *et al.*

(1990) e Akhmedzhanova *et al.*(1986), respectivamente. Os compostos são alcalóides 4-quinolinônicos de estrutura bastante semelhante, com variação apenas do substituinte OCH₃ (leiokinina A) e H (leptomerina).

Tabela 3a: Dados de RMN de ¹³C dos alcalóides ALC 1 e ALC 2 referente aos alcalóides leiokinina A e leptomerina, respectivamente.

C	ALC 1	ALC 2	Nakatsu <i>et al.</i> (1990)
1'	29,48	27,6	29,40
2'	22,23	27,6	22,26
3'	14,15	11,6	11,46
2	148,45	-	147,63
3	140,01	109,0	140,25
4	172,01	177,23	172,08
5	141,07	142,14	141,21
6	126,52	126,57	126,76
7	123,11	123,70	122,75
8	131,70	132,18	131,47
9	115,29	115,9	115,19
10	126,77	126,7	126,92
N-CH ₃	34,93	34,4	34,69
3-OCH ₃	60,22	-	60,04

Tabela 3b: Dados de RMN de Hidrogênio dos alcalóides ALC 1 e ALC 2, correspondentes à leiokinina A e leptomerina, respectivamente, comparados com a literatura.

H	ALC 1	ALC 2	Nakatsu <i>et al.</i> (1990)
1'	2,97	1,60 (<i>m</i>)	2,94
2'	1,68	1,60 (<i>m</i>)	1,68
3'	1,10	0,85 (<i>t</i>)	1,10
3	-	6,36 (<i>s</i>)	-
5	8,53 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 e 1,5 Hz)	8,41 (<i>dd</i>)	8,52 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 e 2,1 Hz)
6	7,36 (<i>tl</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	7,34 (<i>t</i>)	7,35 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 e 1,0 Hz)
7	7,52(<i>dl</i> , <i>J</i> =8,0 Hz)	7,52 (<i>d</i>)	7,48 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 8,4)
8	7,65 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 8,0e 1,5 Hz)	7,63 (<i>d</i>)	7,64 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 e 2,1 Hz)
N-CH ₃	3,82 (<i>s</i>)	3,77 (<i>s</i>)	3,79 (<i>s</i>)
3-OMe	3,94 (<i>s</i>)	-	3,93 (<i>s</i>)

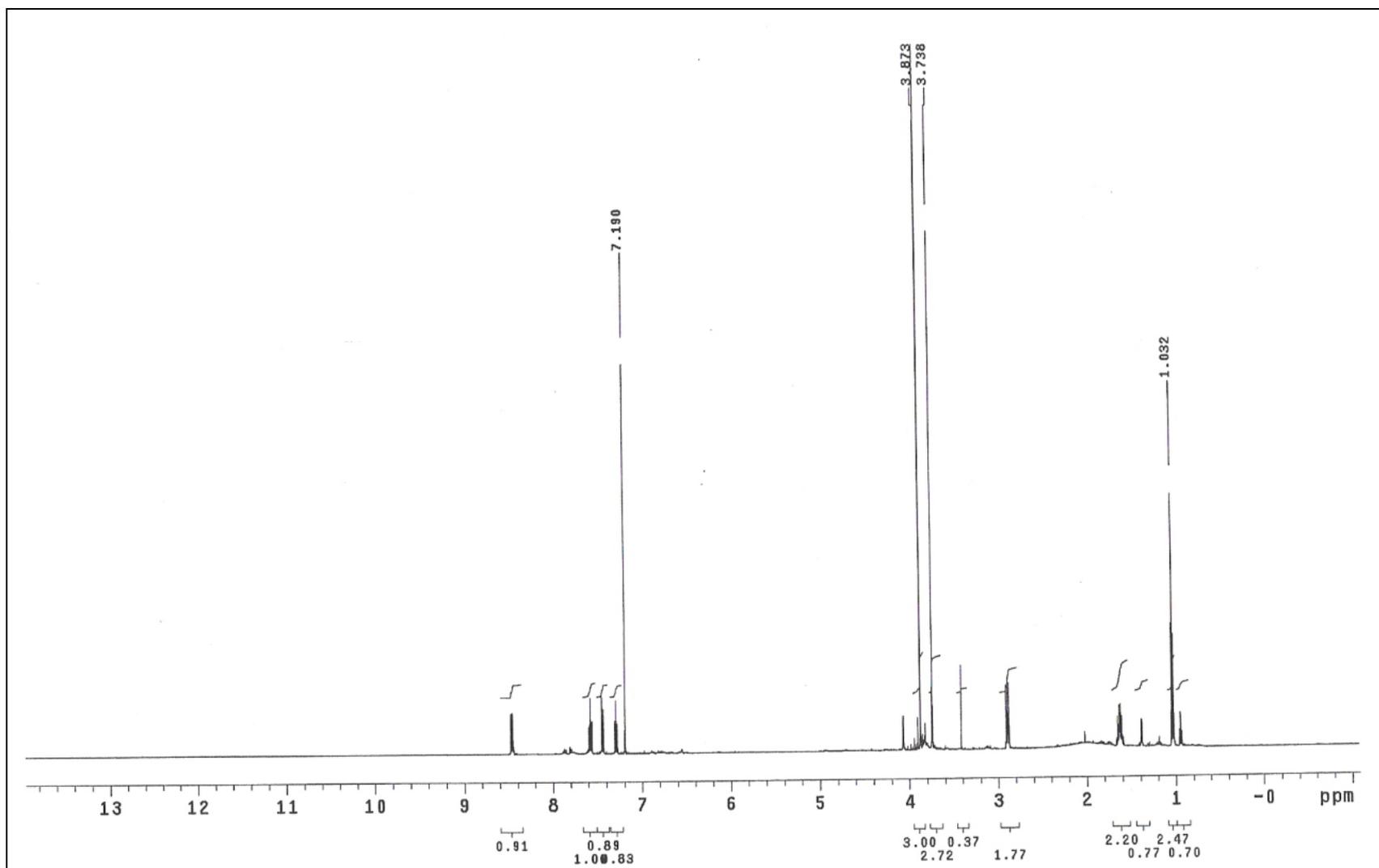


Figura 4a: Espectro de RMN de ¹H do ALC1, correspondente à fração 7, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado.

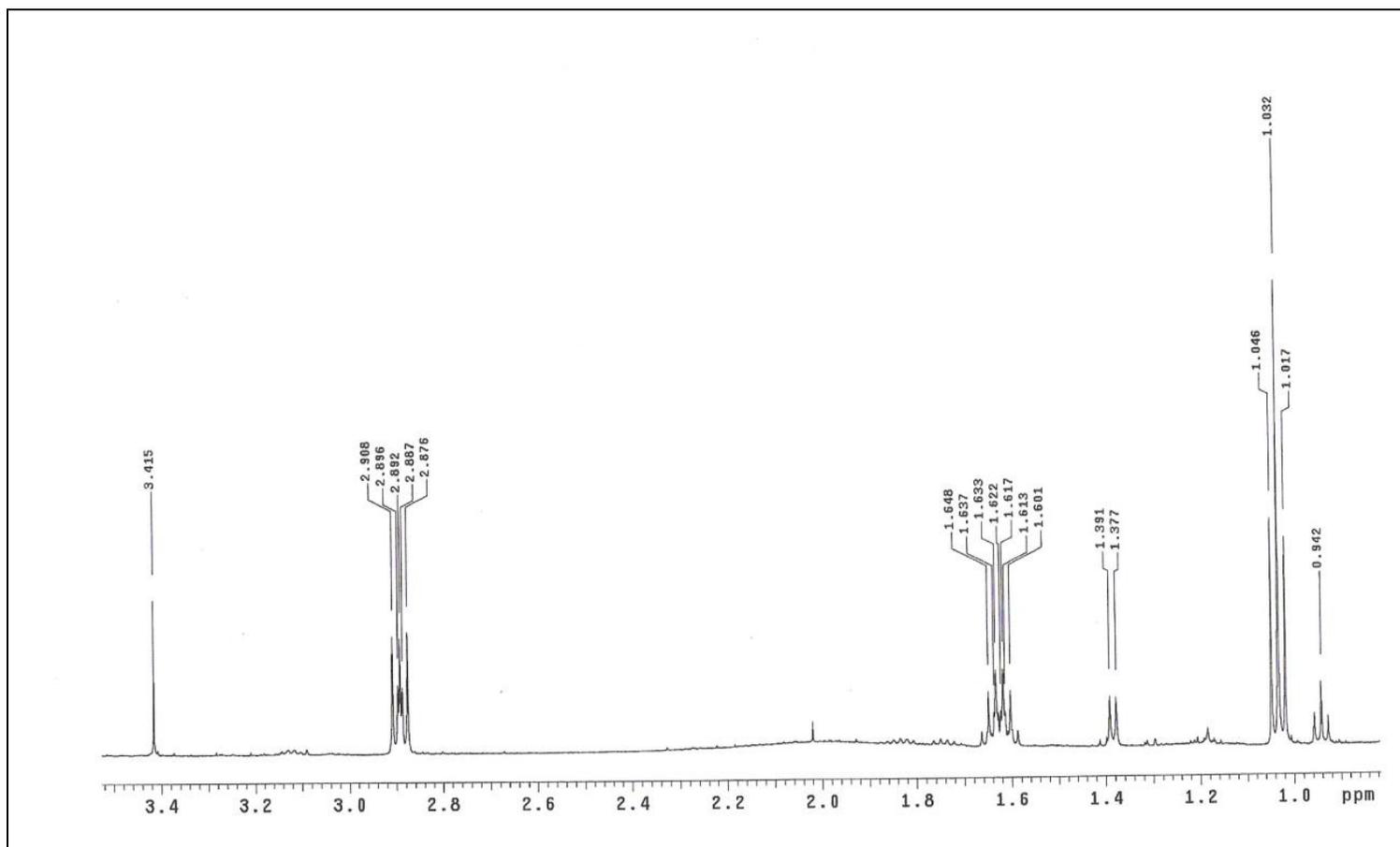


Figura 4b: Espectro de RMN de ¹H do ALC1, correspondente à fração 7, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado. Sinais desdobrados de 0.5 a 3.45 ppm.

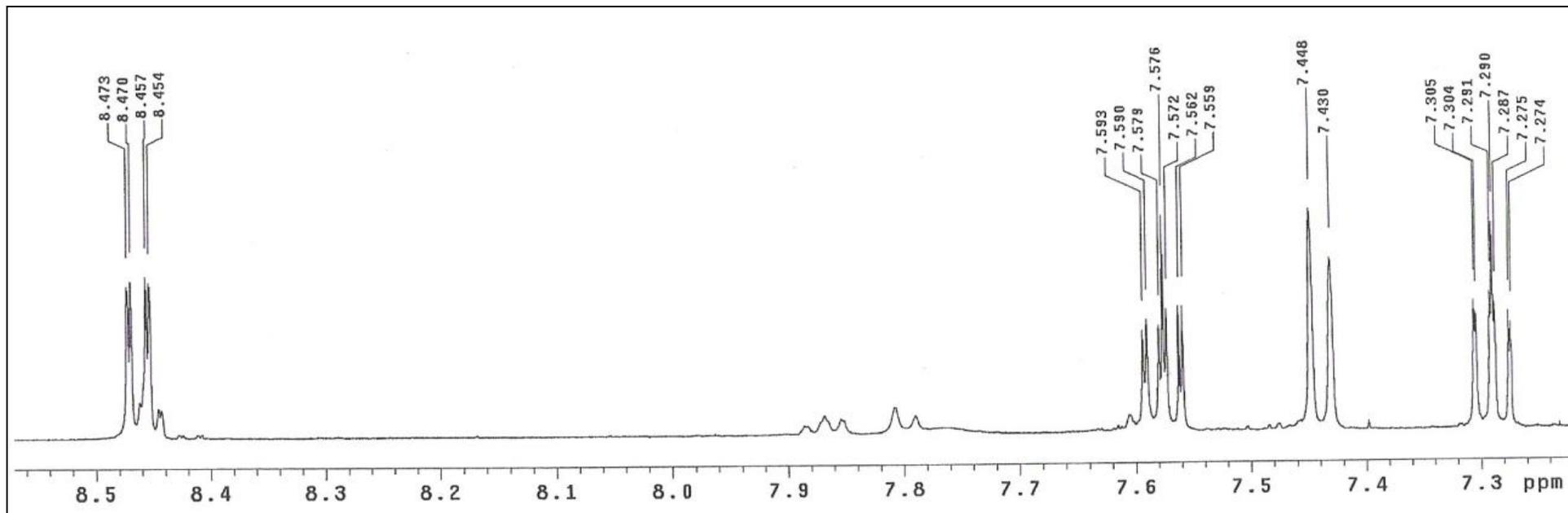


Figura 4c: Espectro de RMN de ^1H do ALC1, correspondente à fração 7, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado. Sinais desdobrados, 7.2 a 8.6 ppm. Sinais desdobrados de 7.2 a 8.6 ppm.

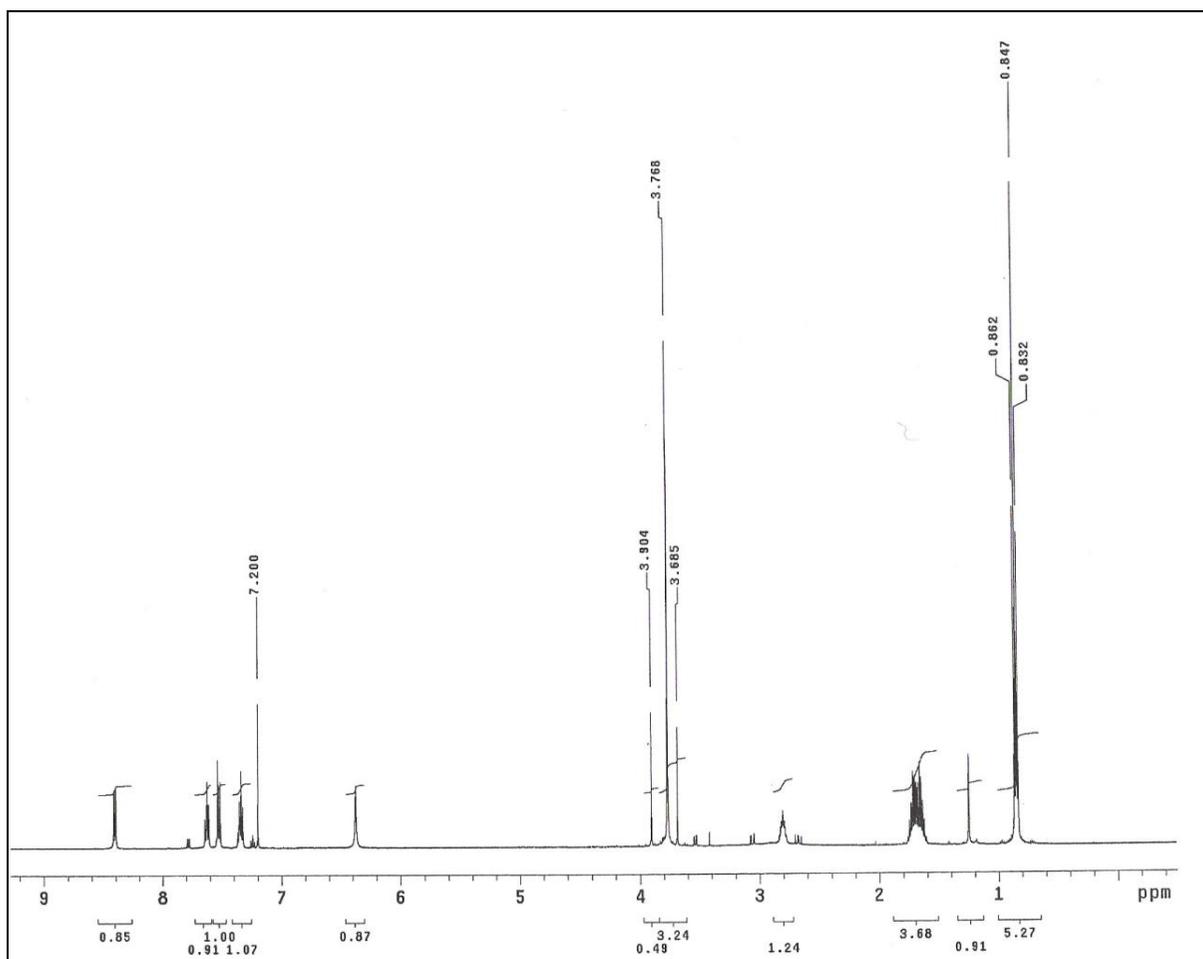


Figura 5a: Espectro de RMN de ¹H do ALC2, correspondente à fração 9, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado.

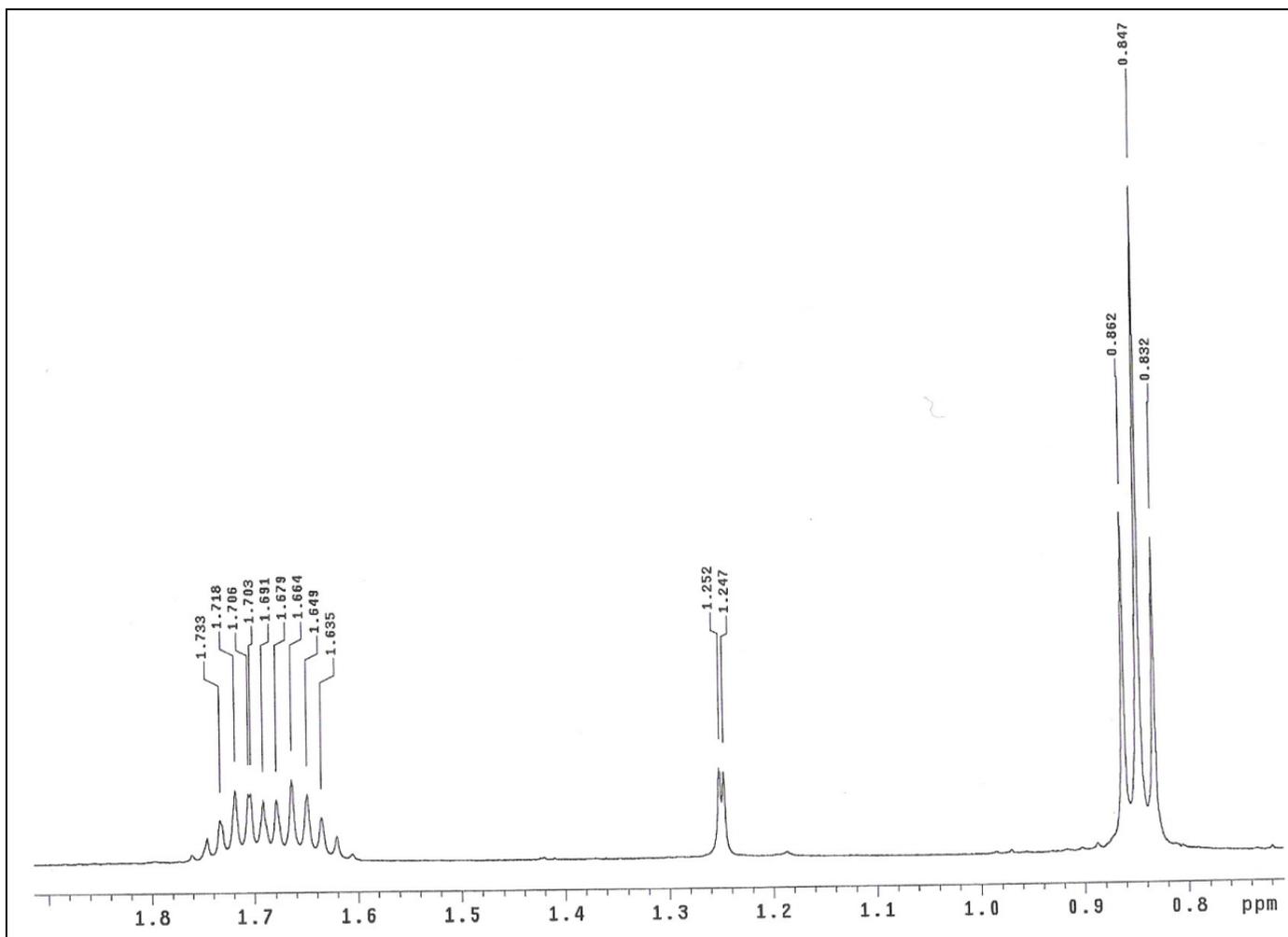


Figura 5b: Espectro de RMN de ^1H do ALC2, correspondente à fração 9, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado. Sinais desdobrados de 0.7 a 1.9 ppm.

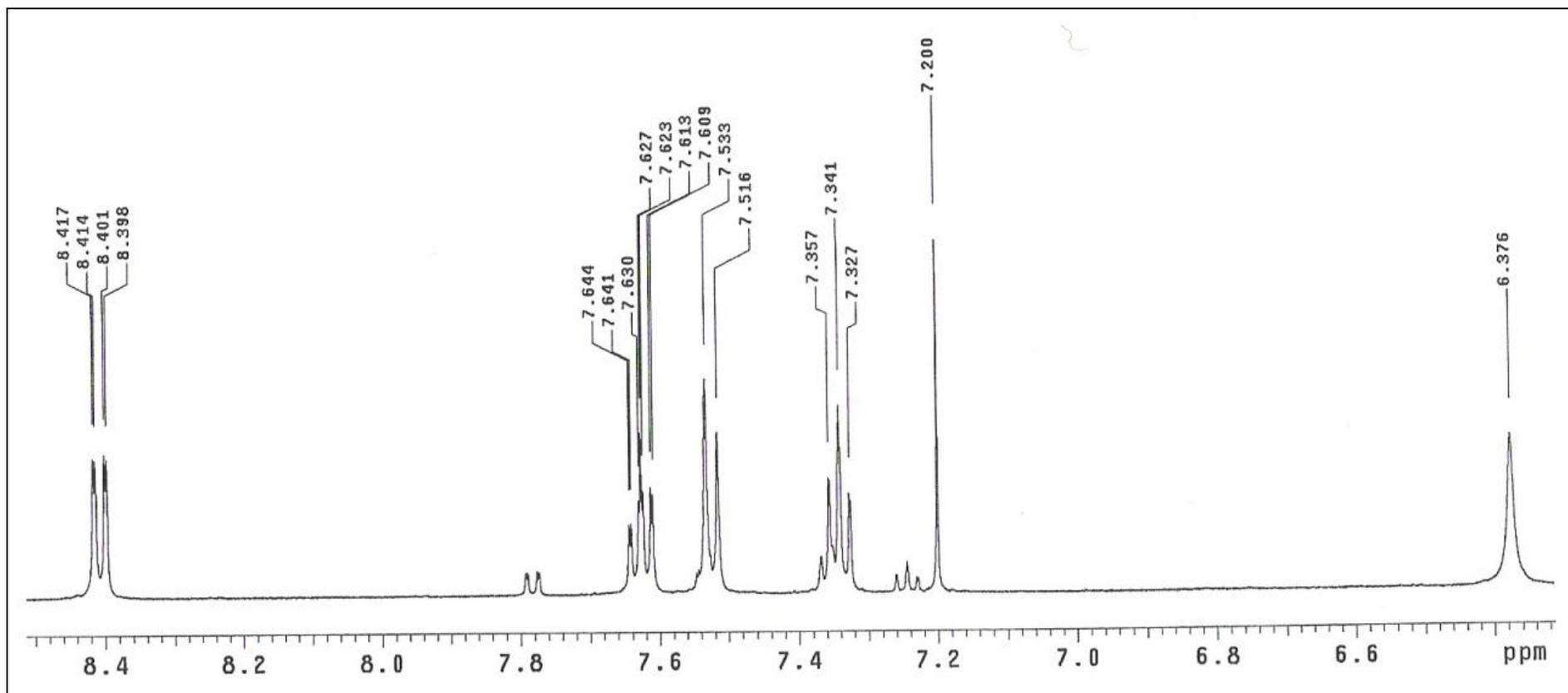


Figura 5c: Espectro de RMN de ^1H do ALC2, correspondente à fração 9, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado. Sinais desdobrados de 6,5 a 8,5 ppm.

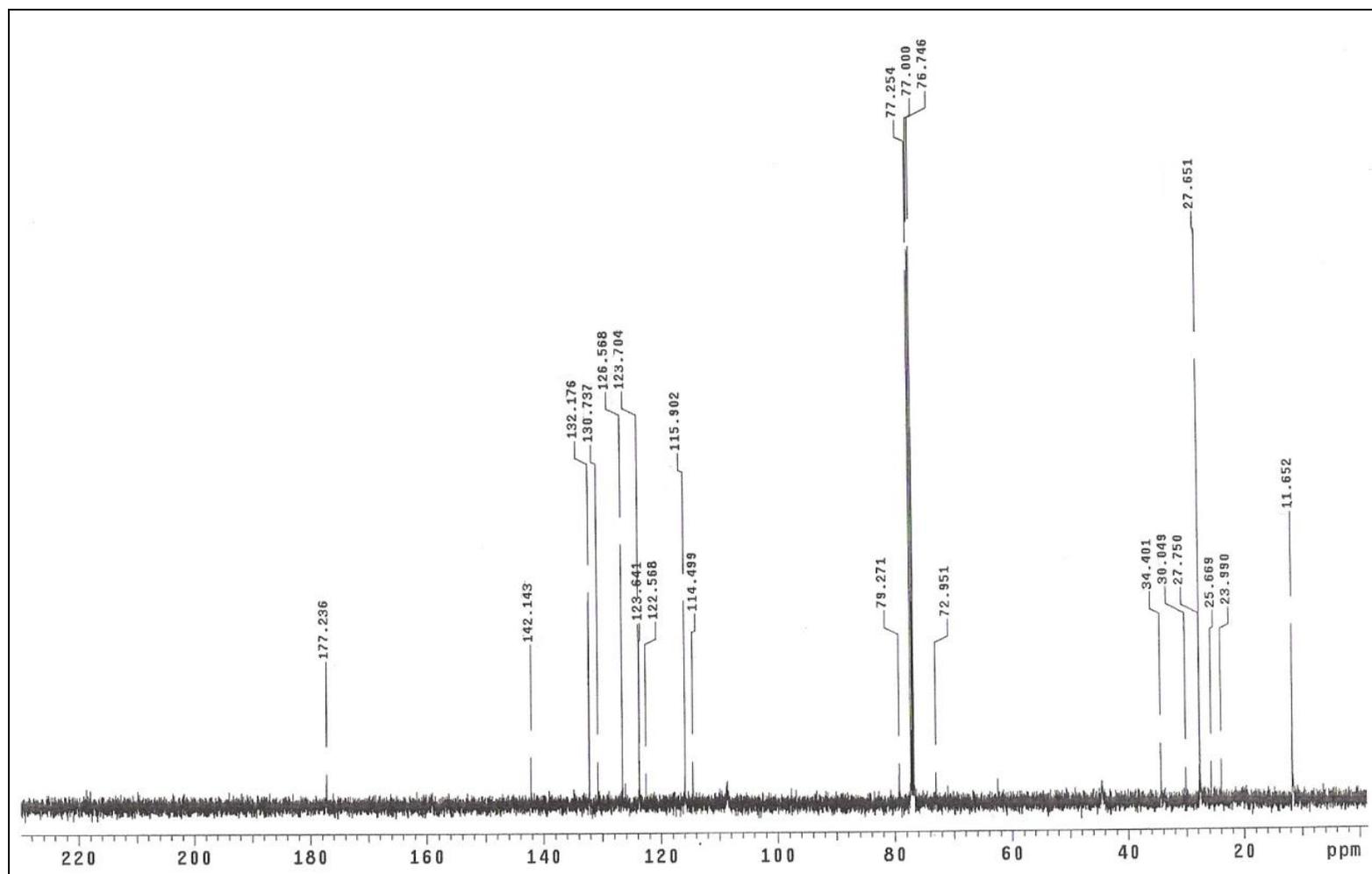


Figura 5d: Espectro de RMN de ¹³C do ALC2, correspondente à fração 9, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado.

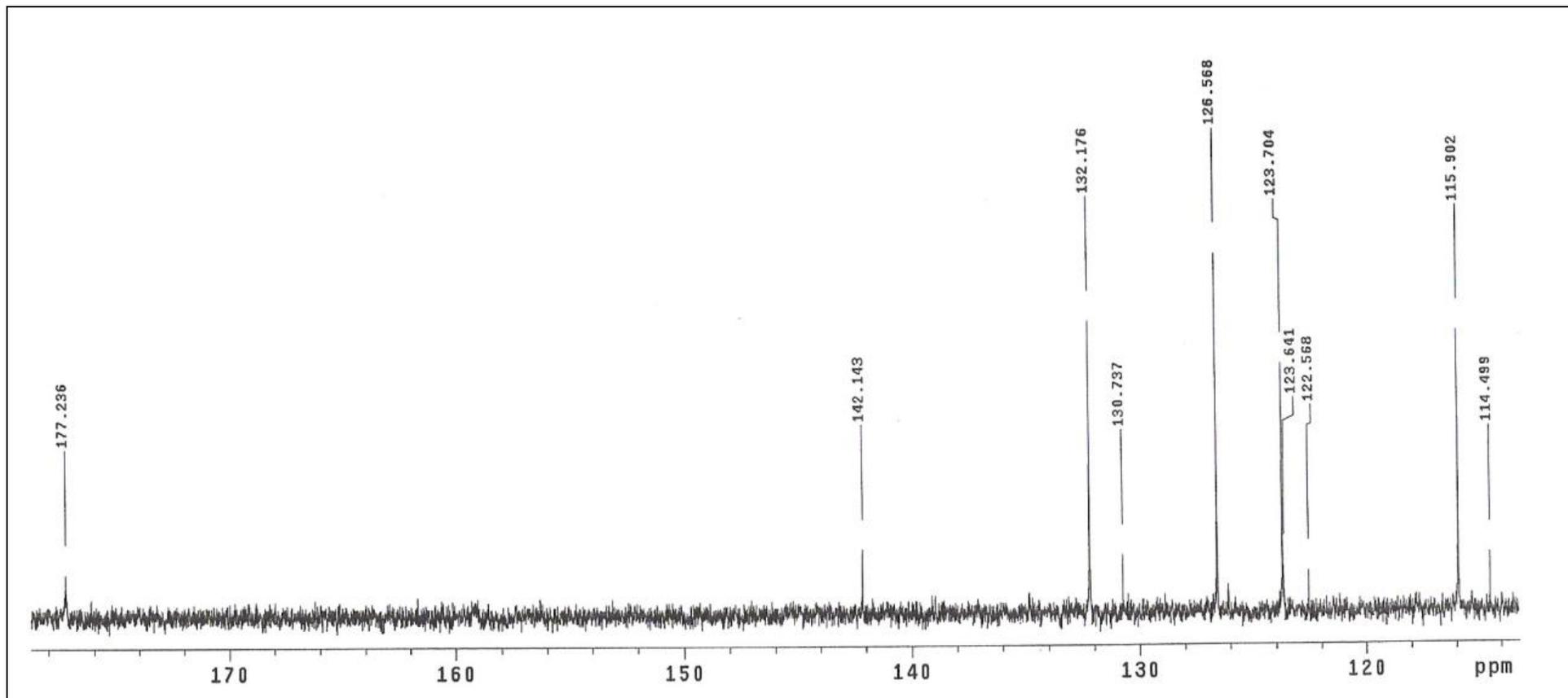


Figura 5e: Espectro de RMN de ¹³C do ALC2, correspondente à fração 9, utilizando o aparelho espectrômetro INOVA -500 operando a 500 MHz e solvente clorofórmio deuterado. Sinais desdobrados de 110 a 180 ppm.

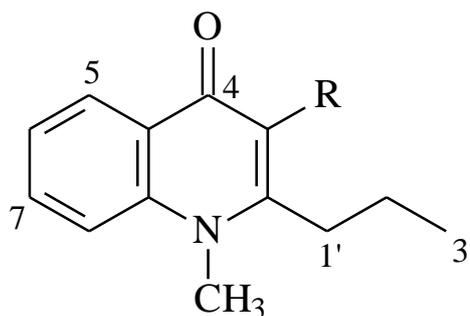


Figura 7: Estrutura química dos alcalóides ALC 1 e ALC 2, únicos constituintes das frações 7 e 9 respectivamente. Na fração 7 - R= OCH₃ e foi identificado como leiokinina A. Fração 9 - R=H e corresponde à leptomerina.

B - Frações 10 e 11

As Tabelas 4a e 4b mostram os dados de ressonância magnética nuclear de ¹³C e ¹H, respectivamente, relativos às frações 10 e 11. Os alcalóides purificados e identificados nas frações 10 e 11 foram denominados, ALC3 e ALC 4, respectivamente. Os dados de RMN de ¹³C e ¹H do ALC3 foram comparados aos obtidos por Paulini *et al.* (1989) que denominaram o alcalóide furoquinolínico como kokusaginina (Figura 10).

As Figuras 8a e 8b mostram o espectro da ressonância magnética nuclear de ¹H do ALC3 (fração 10). A Figura 8b mostra o desdobramento de 6.9 a 7.7 ppm da Figura 8a. A Figura 8c representa o espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³C do ALC3 com desdobramento de 55 a 60 ppm.

Paulini *et al.* (1989) utilizaram espectrometria de massas para identificar o alcalóide kokusaginina [m/z (%): 260 (10), 259 (100), 244 (26), 216 (4), 201 (3), 186 (6), 130 (4)]. Segundo o mesmo autor o alcalóide furoquinolínico kokusaginina não apresenta potencial mutagênico contra *Salmonella typhimurium*. A kokusaginina também foi isolada de raízes de *E. leiocarpa* por Monache *et al.* (1989) com rendimento de 0,04% e estrutura comparada com Mester (1983).

As Figuras 9a e 9b mostram, respectivamente, o espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C do ALC4. Os dados obtidos foram comparados com os de Cortez *et al.* (2006) e coincidiram com os obtidos por Paulini *et al.* (1989) com a identificação do alcalóide furoquinolínico esquimianina.

Paulini *et al.* (1989) utilizaram, além da RMN, espectrometria de massas [(m/z (%): 260 (8), 259 (97), 258 (21), 245 (8), 244 (100), 242 (3), 231 (3), 230 (43), 229 (14), 228 (10), 216 (12), 215 (3), 214 (3), 213 (18), 201 (14), 200 (4), 199 (6), 173 (6), 172 (3), 122 (6), 114

(3), 87 (3), 75 (3), 72 (3), 53 (3)] para identificação do composto. Os mesmos autores demonstraram que o alcalóide furoquinolínico esquimianina não apresenta potencial mutagênico em testes em *S. typhimurium*. Cortez *et al.* (2006) obtiveram o alcalóide do extrato em diclorometano do caule de *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) com um rendimento de 0,04%. Os autores descreveram a esquimianina como um sólido amarelo amorfo e utilizaram também dados de espectrometria de infravermelho (1618, 1486, 1092 e 869 cm^{-1}) e de ultravioleta [λ máximo 251 (ϵ 3,770) e 328 nm (ϵ 3,040)] para a identificação deste alcalóide. Biavatti *et al.* (2002) obteve a esquimianina de *Raulinoa echinata* e demonstrou que o alcalóide não apresenta atividade contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. A esquimianina também foi isolada de *Haplophylum leptomerum* por Akmedzhanova *et al.* (1986) e possui baixa citotoxicidade contra células de câncer cervical HeLa ($\text{IC}_{50}=11,55\pm 0,20 \mu\text{M}$) (Jansen *et al.* 2006).

As estruturas químicas dos alcalóides ALC3 e ALC4, identificados como kokusaginina e esquimianina respectivamente, estão representadas na Figura 10, e correspondem às estruturas identificadas por Paulini *et al.* (1989) e Cortez *et al.* (2006). Ambos são alcalóides furoquinolínicos de estrutura bastante semelhante sendo $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{OCH}_3$; $\text{R}_3 = \text{H}$ na kokusaginina e $\text{R}_1 = \text{H}$; $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OCH}_3$ na esquimianina.

Tabela 4a: Dados de RMN de ^{13}C dos alcalóides furoquinolínicos, ALC 3 e ALC 4, correspondentes aos picos 10 e 11 respectivamente, e comparação com dados da literatura.

C	ALC 3	Paulini <i>et al.</i> (1989)	ALC 4	Cortez <i>et al.</i> (2006)
2'	142,7	142,4	143,2	142,3
3'	104,8	104,6	104,7	104,2
2	-	163,0	-	-
3	112,9	112,9	-	-
4	-	155,6	-	-
4 ^a	102,4	102,2	-	-
5	100,2	100,1	118,2	117,6
6	-	146,8	112,4	111,2
7	-	152,6	-	-
8	105,8	106,7	-	-
8 ^a	142,7	142,5	-	-
4-OCH ₃	59,1	58,8	59,8	59,6
6-OCH ₃	56,2	56,0	-	-
7-OCH ₃	56,0	55,9	56,8	55,8
8-OCH ₃	-	-	61,7	61,7

Tabela 4b: Dados de RMN de ^1H dos alcalóides furoquinolínicos, ALC 3 e ALC 4, correspondentes aos picos 10 e 11, respectivamente.

H	ALC 3	ALC 4
2'	7,53 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz)	7,54 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz)
3'	7,02 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz)	7,00 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz)
5	7,47 (<i>s</i>)	7,95 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)
6	-	7,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)
8	7,40 (<i>s</i>)	-
4-OCH ₃	4,41 (<i>s</i>)	4,39 (<i>s</i>)
6- OCH ₃	4,03 (<i>s</i>)	-
7- OCH ₃	4,02 (<i>s</i>)	4,06 (<i>s</i>)
8- OCH ₃	-	3,97 (<i>s</i>)

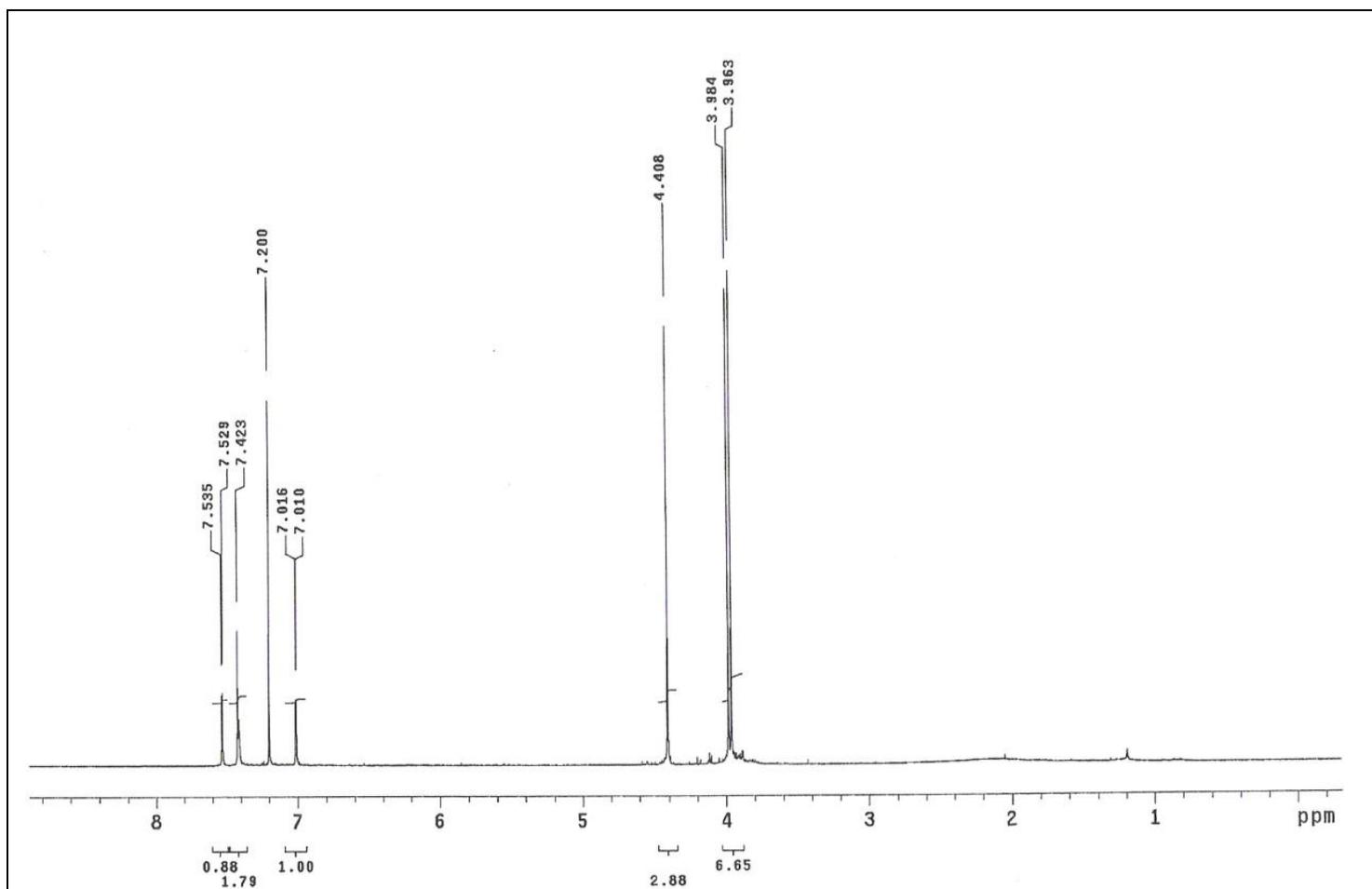


Figura 8a: Espectro de RMN de ^1H do ALC3, correspondente ao pico 10 utilizando espectrômetro INOVA -500 e solvente clorofórmio deuterado.

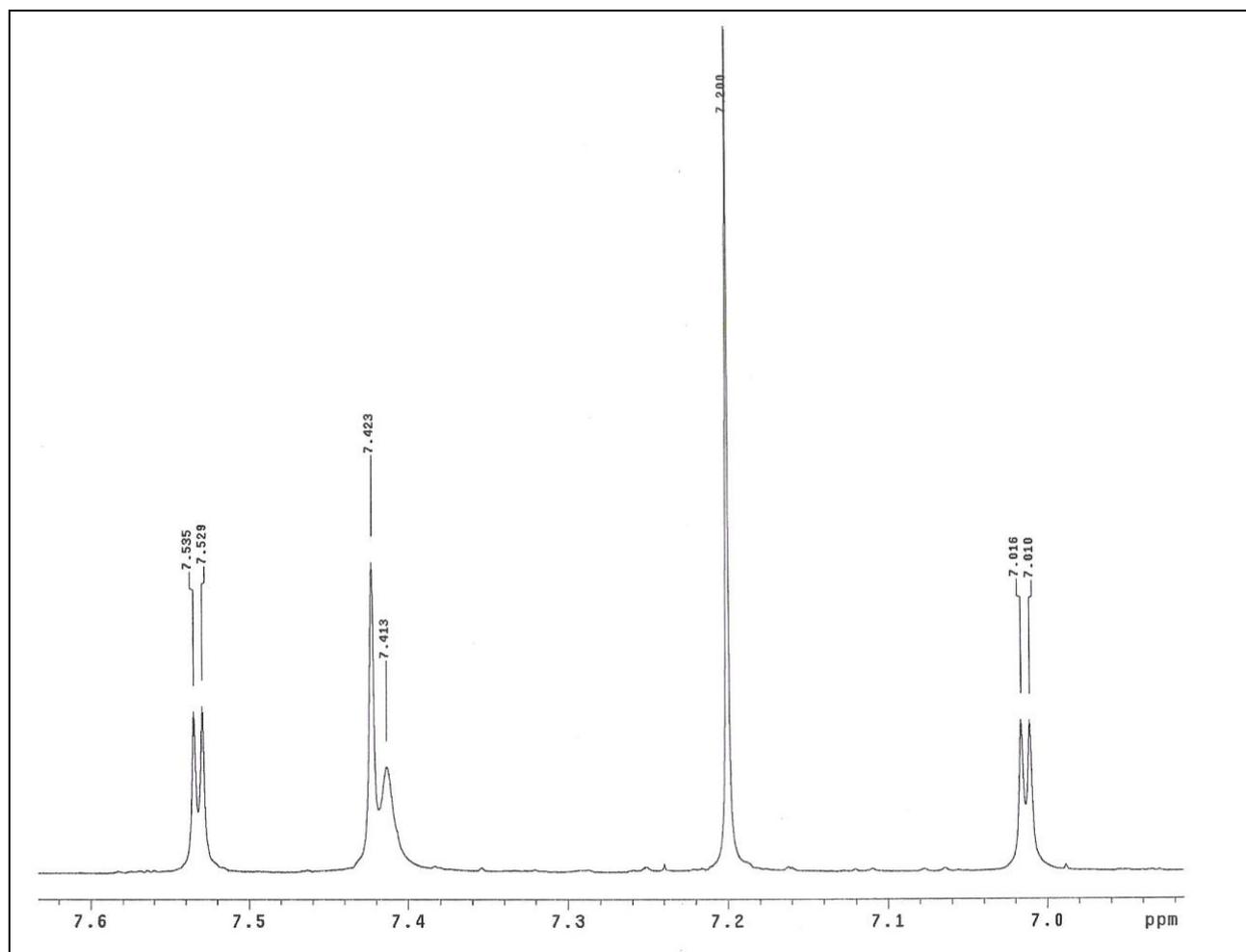


Figura 8b: Espectro de RMN de ^1H do ALC3, correspondente ao pico 10, utilizando como solvente o clorofórmio deuterado em aparelho espectrômetro INOVA - 500. Sinais desdobrados, de 6,9 a 7,7 ppm.

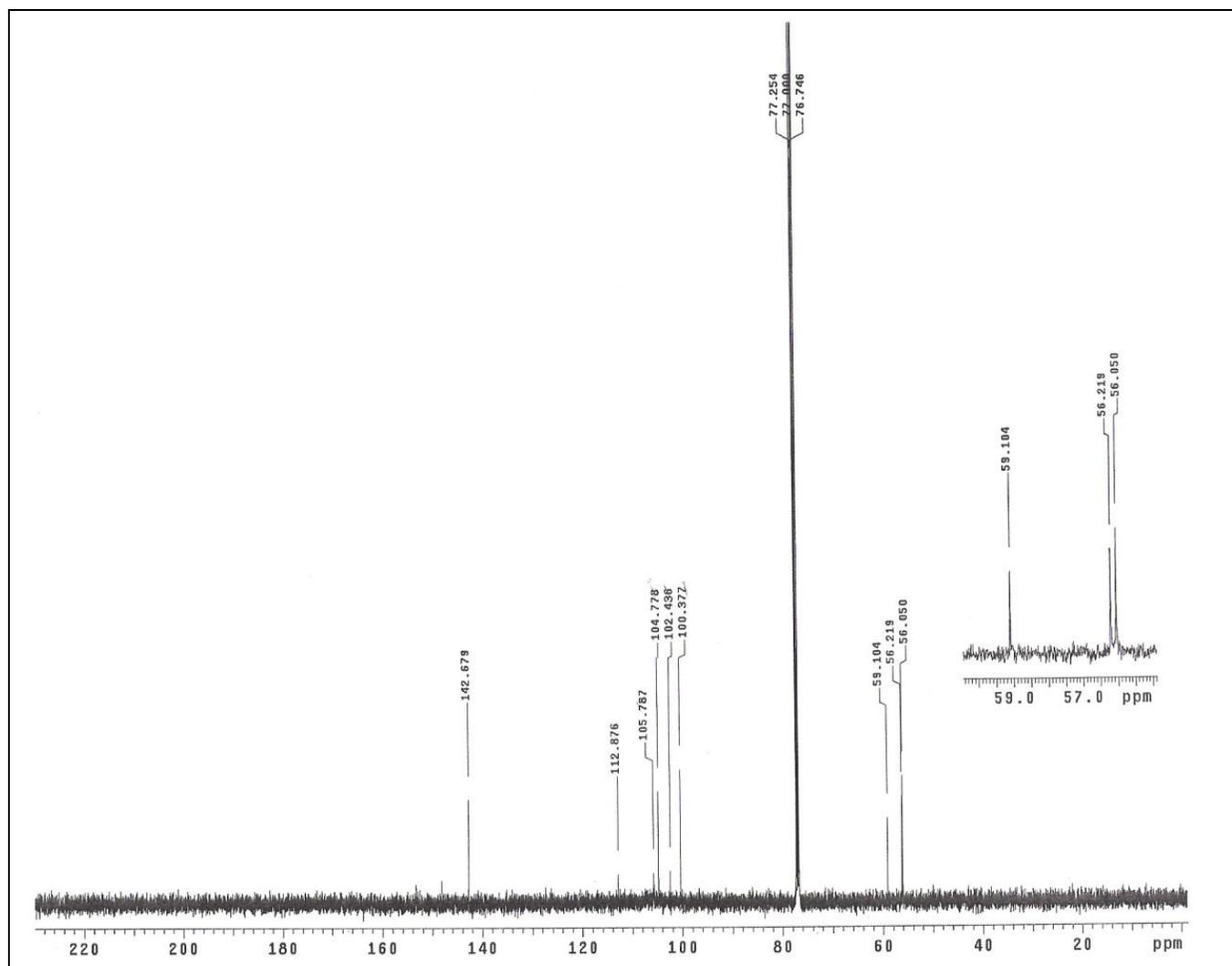


Figura 8c: Espectro de RMN de ^{13}C do ALC3, correspondente à fração 10, utilizando o espectrômetro INOVA-500. Sinais desdobrados de 55 a 60 ppm.

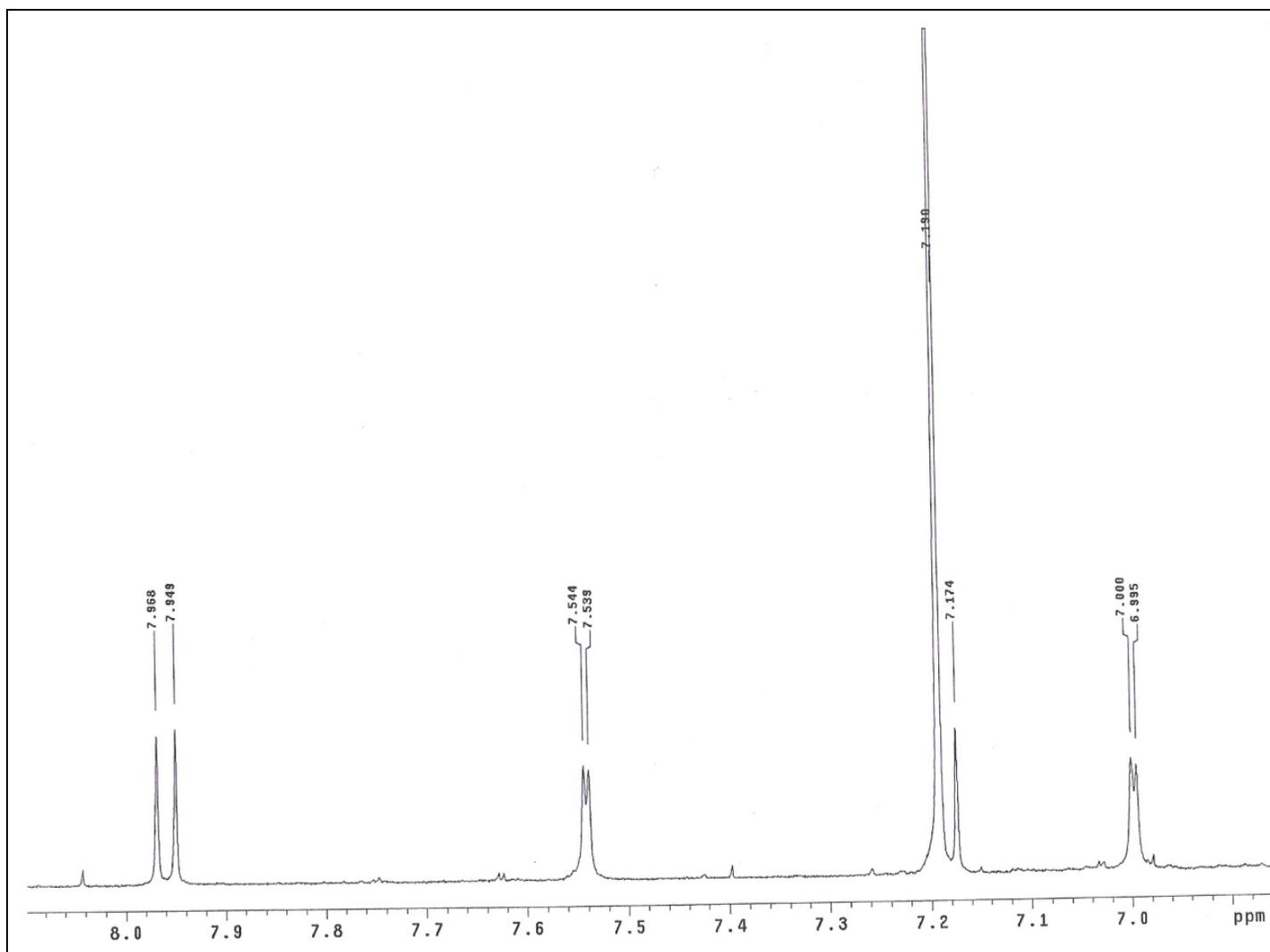


Figura 9a: Espectro de RMN de ^1H do ALC4, correspondente ao pico 11, utilizando equipamento INOVA -500 e solvente clorofórmio deuterado.

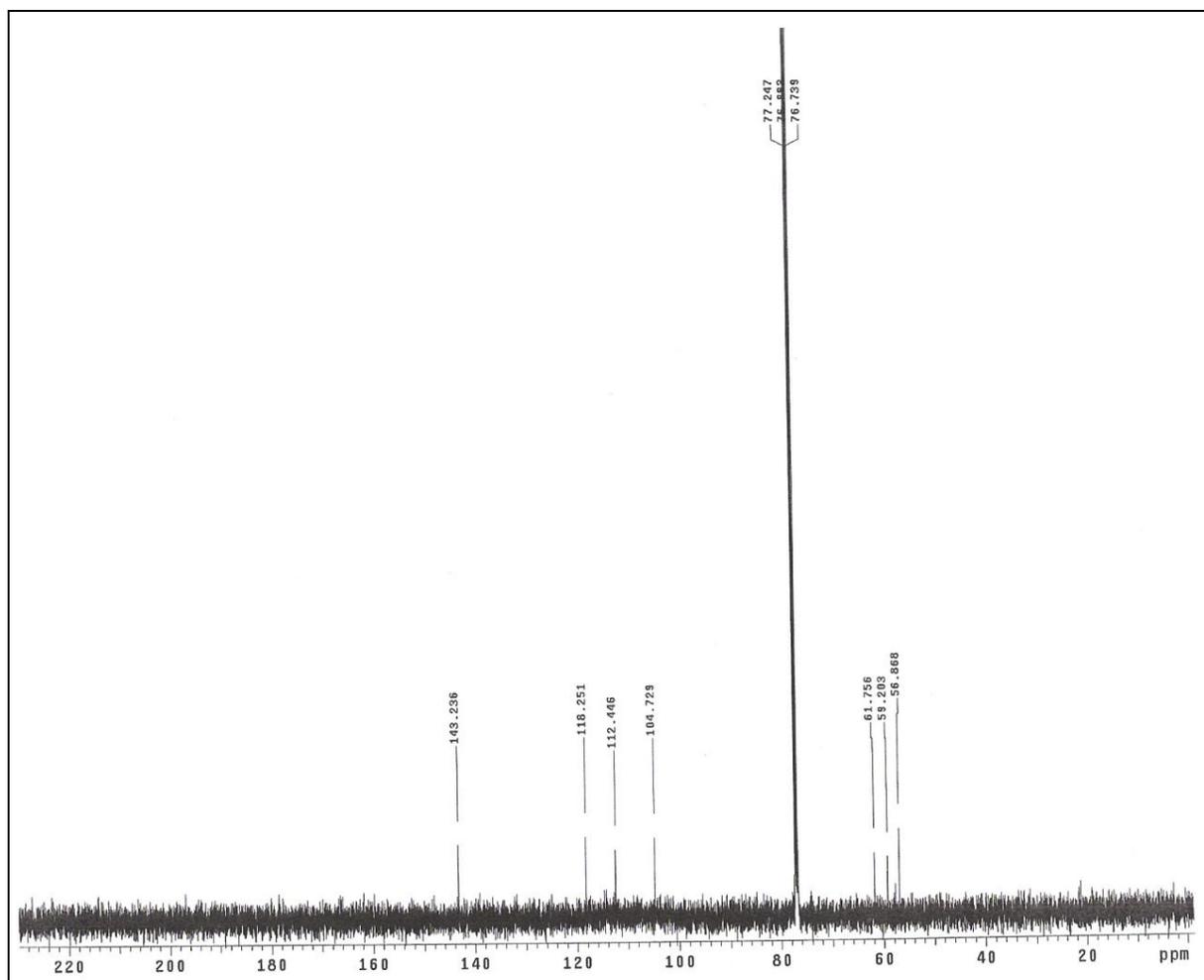


Figura 9b. Espectro de RMN de ^{13}C do ALC4, correspondente à fração 11 utilizando equipamento INOVA -500 e solvente clorofórmio deuterado.

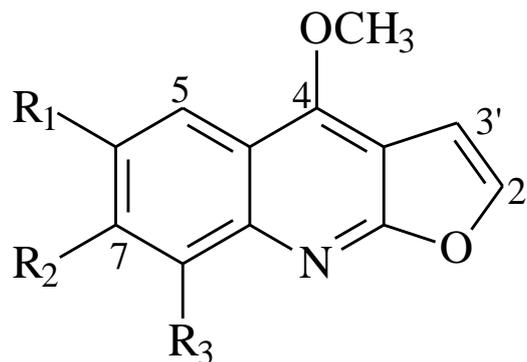


Figura 10: Estrutura química dos alcalóides ALC 3 e ALC 4, correspondentes aos picos 10 e 11, respectivamente. A substância (majoritária) contida no pico 10, na qual $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{H}$, foi identificada como kokusaginina. A substância contida no pico 11, na qual $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = \text{OCH}_3$, foi identificada como esquimianina.

C- Fração 12

A Tabela 5 mostra os dados de ressonância magnética de ^1H da fração 12, correspondente ao pico 12. Nesta fração há uma mistura de dois alcalóides definidos como ALC5 e ALC 6.

Na Figura 11 estão os dados de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da mistura dos alcalóides ALC 5 e ALC6. Os resultados das análises de ALC5 foram comparados com os de Paulini *et al.* (1989) e Nunes *et al.* (2005), permitindo a identificação do alcalóide furoquinolínico maculina.

Paulini *et al.* (1989) utilizaram além da RNM, a espectrometria de massas [m/z (070): 244 (7), 243 (100), 229 (2), 228 (46), 200 (7), 172 (3), 121 (2), 114 (2)] e demonstraram que maculina é um fraco mutagênico de ação direta, por testes com *S. typhimurium*. Nunes *et al.* (2005) descreveram a maculina como cristais brancos e utilizaram técnicas de RMN heteronuclear HMBC e espectro de infravermelho (2925, 2855, 1622, 1522, 1471, 1374, 1252, 632 e 574 cm^{-1}). A maculina também foi isolada do extrato hexânico de raízes de *E. leiocarpa* por Monache *et al.* (1989) com rendimento de 0,0008%, no caso, sua estrutura foi determinada por comparação com Mester (1983). Biavatti *et al.* (2002) demonstrou que o alcalóide maculina não apresenta atividade contra a forma tripomastigota de *Tripanossoma cruzi*, porém possui fraca ação inibitória no crescimento de *Leucoagaricus gongyloforus*.

O ALC 6 teve seus dados comparados com Paulini *et al.* (1989) e Monache *et al.* (1989) e foi identificado como o alcalóide furoquinolínico flindersiamina. Paulini *et al.* (1989) utilizou também dados de espectrometria de massas [m/z (070): 274 (8), 273 (100),

272 (25), 245 (21), 244 (25), 243 (5), 230 (18), 229 (4), 228 (16), 213 (4), 200 (3), 157 (3)] e em experimentos *in vitro* demonstraram que a flindersiamina não possui potencial mutagênico contra *S. typhimurium*. Monache *et al.* (1989) também identificou flindersiamina em *E. leiocarpa* obtendo um rendimento de 0,01% do extrato hexânico da raiz. Biavatti *et al.* (2002) demonstraram que esse alcalóide furoquinolínico não apresenta atividade tóxica contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, mas fraca inibição do crescimento de *L. gongylophorus*.

A Figura 12 mostra a estrutura química do alcalóide ALC5 maculina e do alcalóide ALC6 esquimianina, alcalóides já isolados por Paulini *et al.* (1989), Nunes *et al.* (2005) e Monache *et al.* (1989). Ambos são alcalóides furoquinolínicos de estrutura bastante semelhante, maculina possui um H na posição R e flindersiamina um OCH₃ em R.

Tabela 5: Dados de RMN de ¹H dos alcalóides furoquinolínicos ALC5 e ALC6 que estão em mistura na fração 12.

H	Alcalóide 5	Paulini <i>et al.</i> (1989)	Alcalóide 6	Paulini <i>et al.</i> (1989)
2'	7,56 (d, J = 2,4 Hz)	7,56 (d, J = 2,8 Hz)	7,52 (d, J = 2,4 Hz)	7,59 (d, J = 2,8 Hz)
3'	7,03 (d, J = 2,4 Hz)	7,03 (d, J = 2,8 Hz)	6,99 (d, J = 2,4 Hz)	7,03 (d, J = 2,8 Hz)
5	7,46 (s)	7,50 (s)	7,19 (s)	7,28 (s)
8	7,21 (s)	7,30 (s)	-	-
2''	6,07 (s)	6,09 (s)	6,00 (s)	6,09 (s)
4-OCH ₃	4,41 (s)	4,40 (s)	4,39 (s)	4,41 (s)
8-OCH ₃	-	-	4,19 (s)	4,27 (s)

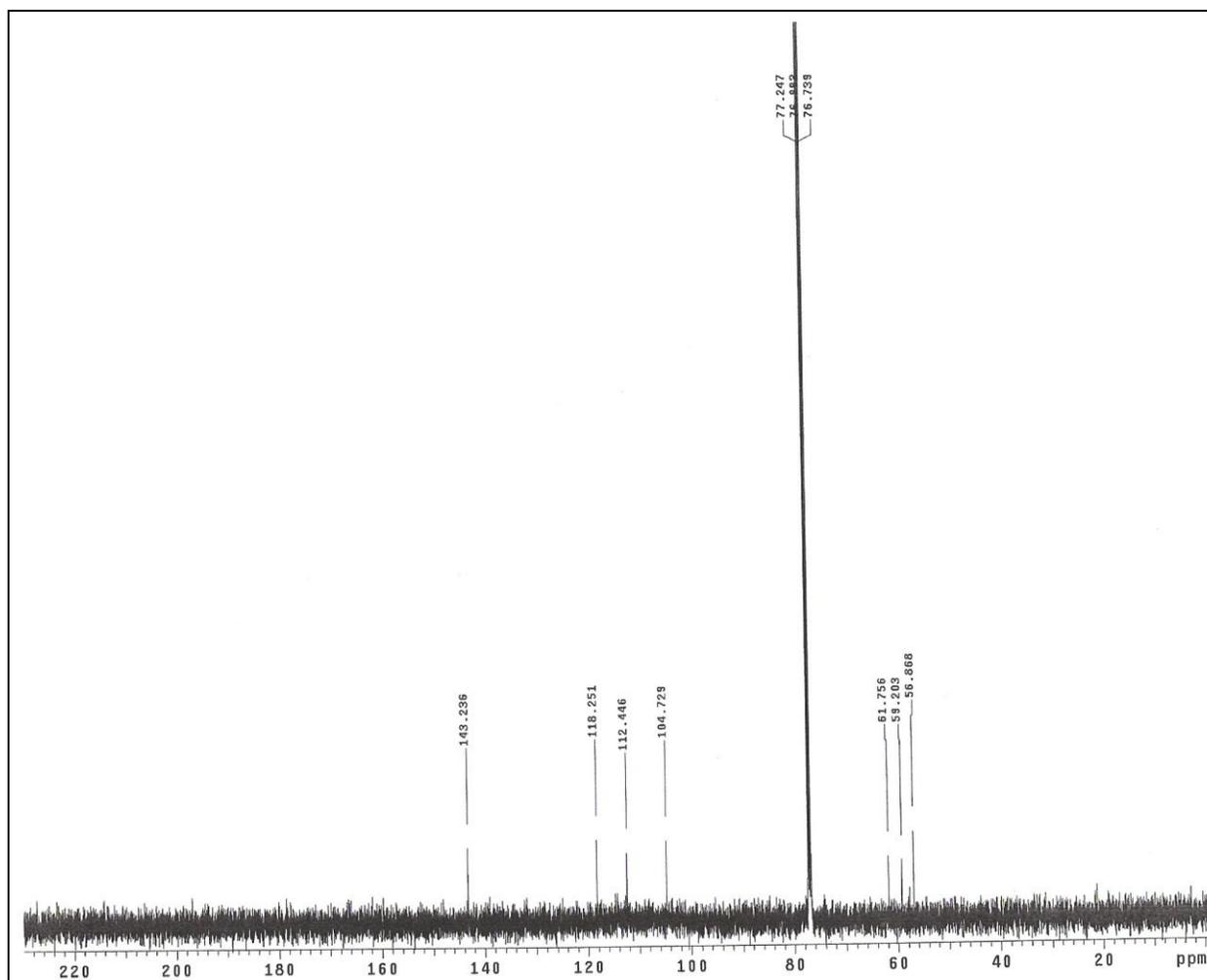


Figura 11: Espectro de RMN de ^{13}C dos ALC4 e ALC 5 (mistura), correspondente ao pico 12, realizado em espectrômetro INOVA -500 e utilizando clorofórmio deuterado como solvente.

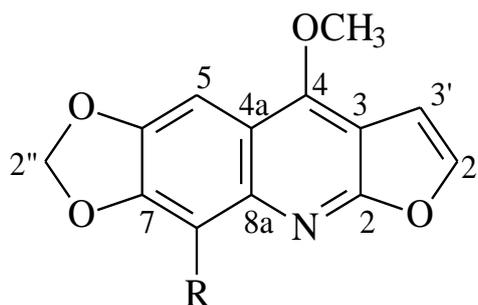


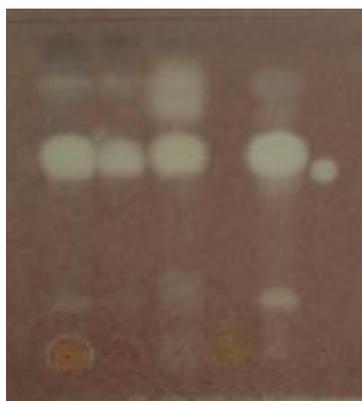
Figura 15: Estrutura química dos alcalóides ALC 5 e ALC 6 presentes no pico 12. R = H corresponde ao alcalóide maculina. R = OCH₃ corresponde ao alcalóide flindersiamina.

4.2. Resultados Farmacológicos

4.2.1. Efeito do Extrato Etanólico e Frações de *Esenbeckia leiocarpa* na Atividade Anticolinesterásica

Diversos estudos químicos já foram realizados com *Esenbeckia leiocarpa*, porém em nenhum dos trabalhos foram analisados seus potenciais farmacológicos na atividade inibidora da acetilcolinesterase. A formação do halo branco indica que não houve hidrólise da acetiltiocolina e não ocorreu a reação entre a tiocolina e o DTNB, formando 5-tio-2-nitrobenzoato e 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina, que são revelados com Fast Blue B.

A análise do cromatograma para a atividade anticolinesterásica utilizando método adaptado de Marston *et al.*(2002), mostrou que o extrato etanólico, o resíduo e as frações hexânica (FHex) e alcaloídica (FALC) apresentaram atividade inibidora da acetilcolinesterase, como o controle galantamina (Figura 13). O EE, o resíduo, a FHex e a FALC apresentaram uma mancha principal de inibição da acetilcolinesterase no Rf 0,61. A FHex e a FALC também apresentaram manchas indicativas de inibição da AChE nos Rfs 0,23; 0,80 e 0,85. O controle positivo galantamina apresentou uma mancha branca no Rf 0,53 (Figura 13). O resíduo foi submetido a novas extrações até esgotamento de atividade IChE.



1 2 3 4 5 6

Figura 13: Cromatoplaça do extrato etanólico de caules de *E. leiocarpa* e resíduo, fração hexânica (50 µg), porção básica, FALC e padrão galantamina revelada para a detecção de atividade inibidora da acetilcolinesterase. 1. Extrato etanólico bruto (200 µg), 2. Resíduo (50 µg), 3. FHex (50 µg), 4. Porção básica (50 µg), 5. FALC (50 µg), 6. Galantamina (0,5 µg).

A atividade anticolinesterásica, do extrato etanólico e das frações que apresentaram melhor atividade IChE em CCD, também foi quantificada usando microplaca.

A atividade inibidora da acetilcolinesterase total, usando leitor de Elisa Biotek – KC4, foi 2,13 Abs (valor considerado para o branco 100%). O extrato etanólico do caule (0,75 - 100 µg/mL) de *E. leiocarpa* diminuiu a atividade da AChE de $3,4 \pm 0,7\%$ a $72,5 \pm 0,8\%$. A fração hexânica (0,75 - 100 µg/mL) inibiu a atividade da acetilcolinesterase de $8,8 \pm 0,5\%$ a $96,0 \pm 0,2\%$ e a FALC (0,75 - 100 µg/mL) reduziu a atividade de $49,6 \pm 1,0\%$ a $94,3 \pm 0,2\%$ (Figura 14).

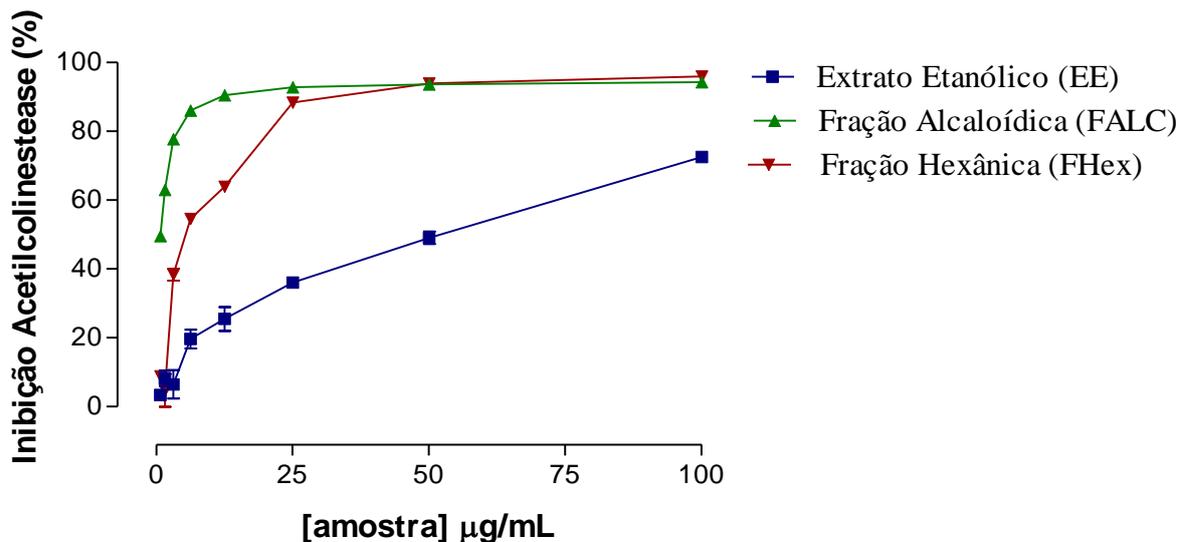


Figura 14: Avaliação quantitativa da atividade inibidora da acetilcolinesterase do extrato etanólico e frações hexânica e alcaloídica (0,75 - 100 µg/mL) dos caules de *Esenbeckia leiocarpa*. Os valores foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (em % de inibição da enzima acetilcolinesterase). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.2. Efeito dos Alcalóides Isolados de *Esenbeckia leiocarpa* na Atividade Anticolinesterásica

As frações 5 e 6 apresentaram uma mancha de inibição da AChE nos Rfs 0,18 e 0,56, respectivamente. A fração 7 (leiokinina A) possui um halo principal de inibição no Rf 0,61. A fração 9 (leptomerina) e a fração 10 (kokusaginina) apresentaram manchas fortes de inibição da acetilcolinesterase no Rfs 0,67 e 0,90, respectivamente. A fração 11 apresentou fraca inibição no Rf=0,82. A fração 12 (maculina e flindersiamina) mostrou dois halos de inibição da AChE nos Rfs 0,91 e 0,73.

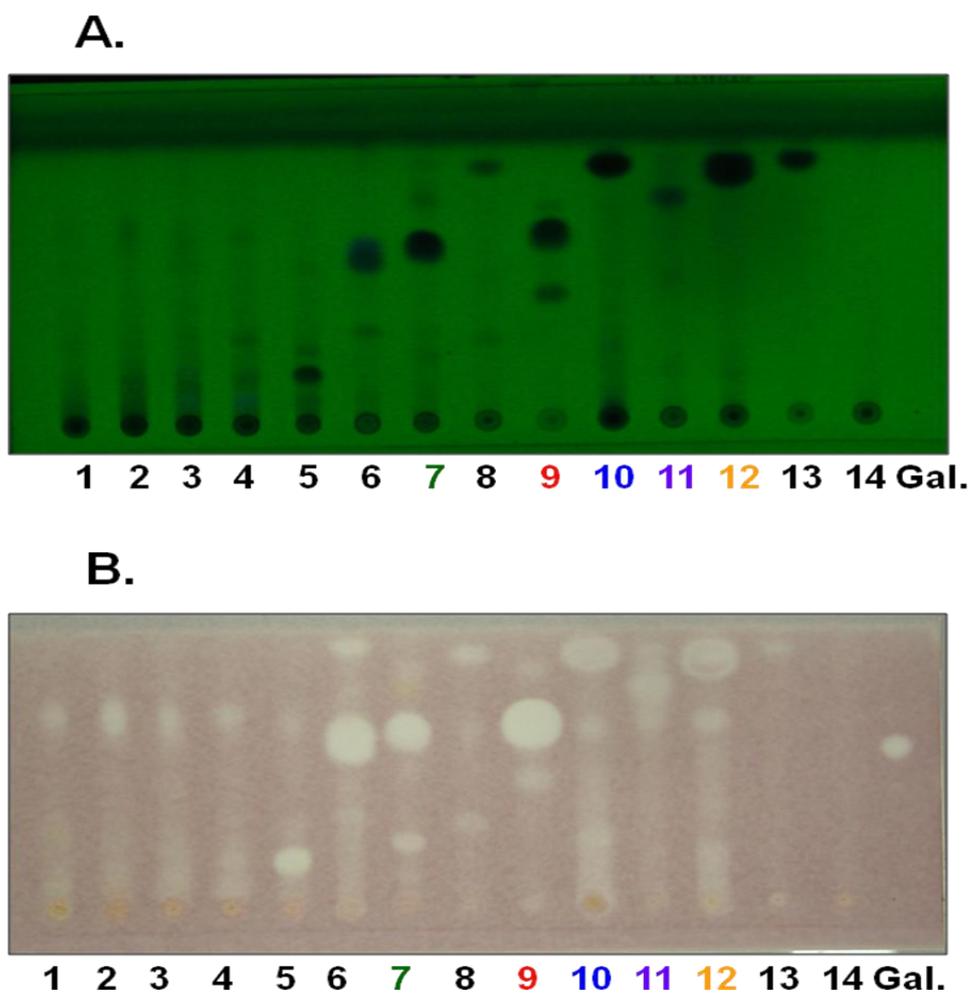


Figura 15: Atividade inibidora da acetilcolinesterase por cromatografia de camada delgada das 14 frações purificada da FALC de *E. leiocarpa*. A. Foto do cromatográfico em λ 254 nm e B. Foto do cromatograma revelado para a atividade inibidora da acetilcolinesterase.

Os alcalóides leiokinina A e skimmianina apresentaram inibição da acetilcolinesterase com IC_{50} de 0,21 mM e 1,4 mM, respectivamente. Os alcalóides leptomerina e kokusaginina tiveram IC_{50} de 2,5 μ M e 46 μ M, respectivamente. Os alcalóides leptomerina e kokusaginina mostraram um efeito inibitório da AChE potente, similar aos compostos utilizados como controle positivo e na clínica médica, fisostigmina (IC_{50} 0,4 μ M) e galantamina (IC_{50} 1,7 μ M), respectivamente (Figura 16). Alguns inibidores de AChE como a fisostigmina e a tacrina são conhecidos pelas suas limitações como baixa biodisponibilidade e efeitos colaterais como hepatotoxicidade. Por esse fato é de grande interesse a busca por melhores inibidores de AChE. Este trabalho demonstra a importância deste estudo, a partir de espécies de nossa flora, na busca por agentes terapêuticos para a Doença de Alzheimer.

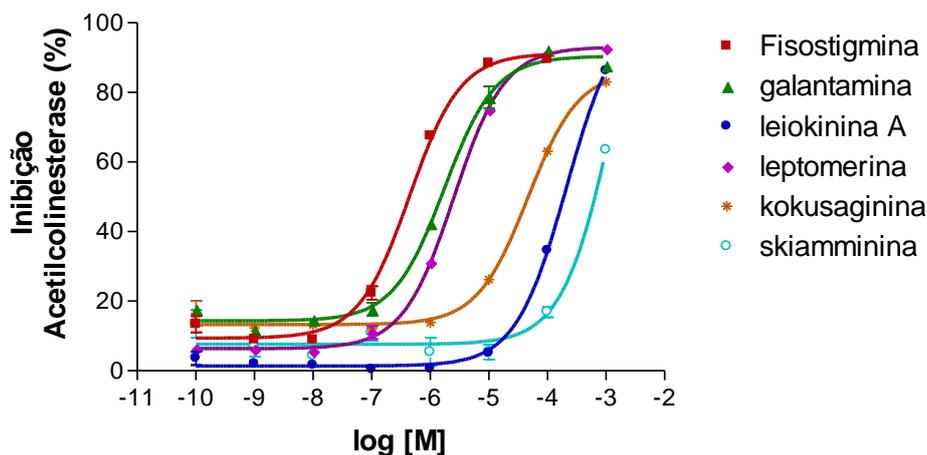


Figura 16. Avaliação quantitativa da atividade inibidora da acetilcolinesterase de alcalóides isolados dos caules de *Esenbeckia leiocarpa*. Os valores foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (em % de inibição da enzima acetilcolinesterase). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3. Estudos comportamentais

4.3.1. Atividade Locomotora

A movimentação horizontal (deambulação) e a movimentação vertical (*rearing*) da atividade locomotora espontânea dos camundongos foram medidas em actômetro eletrônico, com a administração *i.p.* de FALC (10 e 40 mg/Kg), do padrão galantamina (2 mg/Kg) e do veículo salina. O tempo de imobilização e o comportamento de auto-limpeza (*grooming*) dos animais tratados com FALC 10 mg/Kg, galantamina (2 mg/Kg) e salina também foram avaliados.

A deambulação foi analisada e comparada com o controle por análise de variância (ANOVA) com dois critérios de classificação seguida por Bonferroni. Nos dados registrados a cada minuto é possível verificar um aumento significativo ($p < 0,01$) da movimentação horizontal na atividade exploratória espontânea dos animais no primeiro minuto, quando tratados com FALC 10 mg/Kg. Não é possível observar esse mesmo comportamento nos animais tratados com FALC 40 mg/Kg. Os animais tratados com galantamina 2 mg/Kg demonstraram diminuição significativa da atividade exploratória no 2º, 3º e 4º minuto de teste (Figura 17).

O tratamento com FALC 40 mg/Kg promoveu um aumento significativo ($p < 0,01$) quando comparados seus valores de movimentação vertical total (*rearing*) com o controle, utilizando análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla Dunnett.

Houve diminuição considerável na movimentação vertical dos animais tratados com galantamina (Figura 18).

Não houve diferença significativa no tempo de imobilização e auto-limpeza dos animais tratados com FALC 10 mg/Kg e o veículo, quando submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Dunnett. Os animais tratados com galantamina demonstraram um grande aumento no tempo de imobilização ($p < 0,001$) e apresentaram fezes pastosas, o que não ocorreu com os animais tratados com FALC e com o controle (Figura 19).

A deambulação total e a movimentação vertical (*rearing*) são índices utilizados para avaliar ansiedade (Boergngen-Lecerda *et al.* 2000). A maior deambulação apresentada no primeiro minuto de teste nos animais tratados com FALC 10 mg/Kg e o aumento da movimentação vertical nos animais tratados com FALC 40 mg/Kg podem indicar atividade ansiolítica do fármaco. Os resultados poderiam ser avaliados de forma mais precisa se os resultados do primeiro minuto de teste tivessem sido registrados.

Chang (1986) demonstrou que a esquimianina (30 mg/ Kg, *i.p.*, n=6) administrada minutos antes do teste causa diminuição das atividades locomotora e da movimentação vertical. Estes resultados não confirmam os obtidos neste trabalho, o que pode ser explicado pela presença de mais de cinco alcalóides na FALC.

Os camundongos tratados com galantamina tiveram uma atividade motora baixa em comparação com o controle e FALC. Segundo Harvey (1995) o tratamento com galantamina pode levar a bradicardia e conseqüentemente queda da pressão arterial, sugerindo que o maior tempo de imobilização e menor deambulação total dos animais tratados com o fármaco seja conseqüência de um efeito periférico. A galantamina também está relacionada com distúrbios autonômicos e movimentos espásmicos, explicando a presença de fezes pastosas.

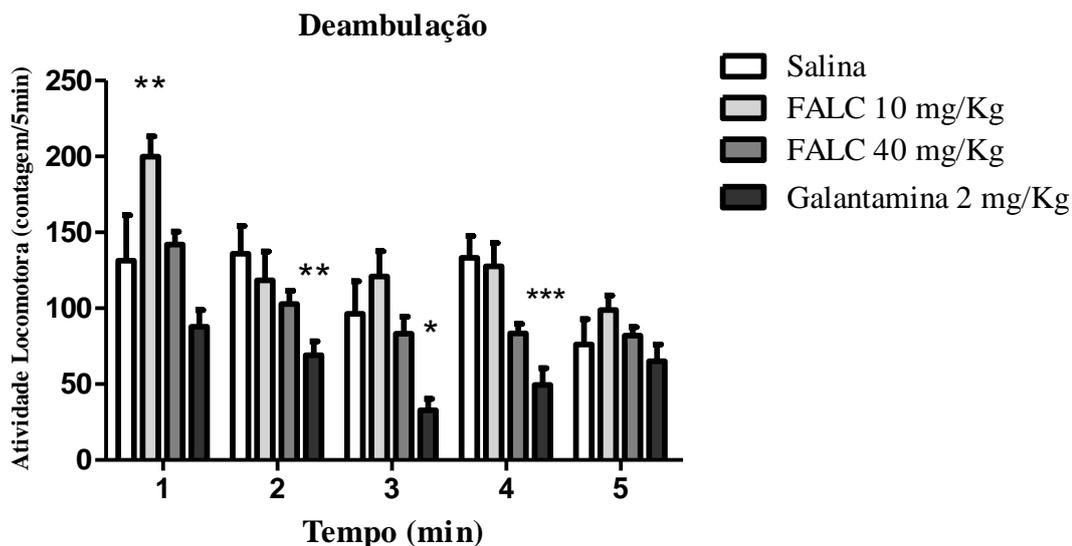


Figura 17: Efeito da FALC (10 mg/Kg e 40mg/Kg, *i.p.*) sobre a movimentação horizontal (deambulação) na atividade exploratória espontânea de camundongos, a atividade locomotora foi analisada a cada minuto através de ANOVA com dois critérios de classificação seguido por Teste de Bonferroni. * estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$; ** estatisticamente diferente do controle $p < 0,01$; *** estatisticamente diferente do controle $p < 0,001$.

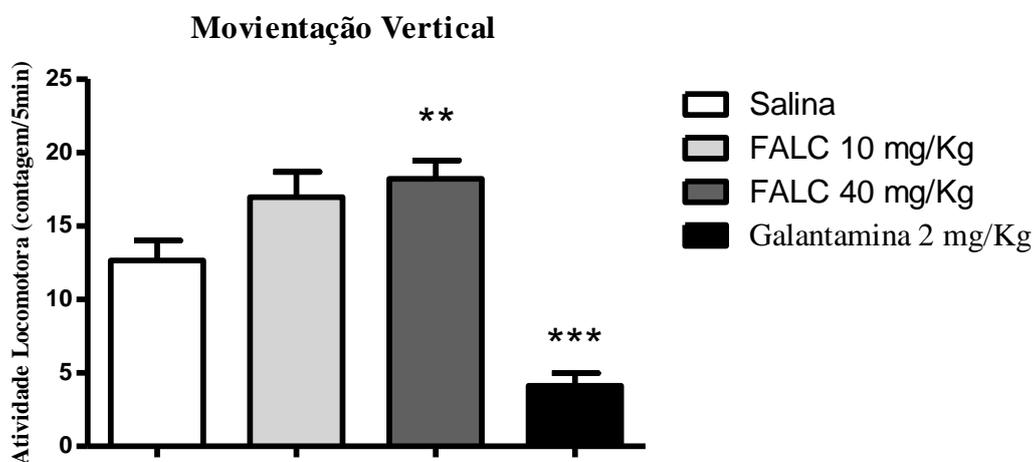


Figura 18: Efeito da FALC (10 mg/ Kg, *i.p.*) sobre a atividade exploratória dos animais medida pela duração total da movimentação vertical (*rearing*) no actômetro. ANOVA seguido por Dunnett. ** estatisticamente diferente do controle $p < 0,01$; *** estatisticamente diferente do controle $p < 0,001$

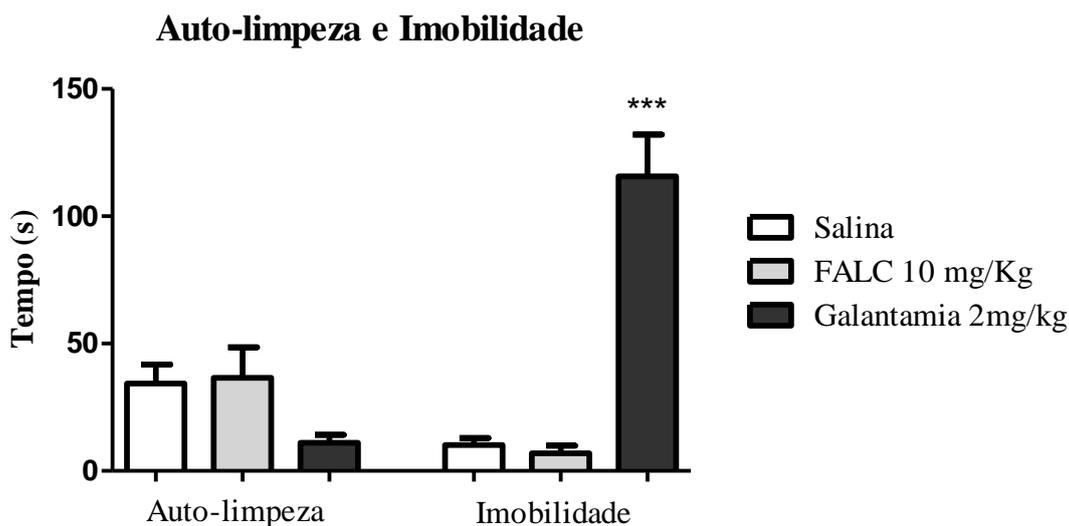


Figura 19: Efeitos da FALC (10 mg/ Kg, i.p.) sobre a atividade exploratória medida pelo tempo de imobilização e auto-limpeza dos camundongos. ANOVA seguido de Dunnett. *** estatisticamente diferente do controle $p < 0,001$

4.3.2 Atividade Ansiolítica

Os camundongos foram testados na atividade ansiolítica e posteriormente submetidos a testes que avaliam a memória. Neste teste foram analisados a frequência de entradas nos braços aberto e fechado em relação ao total de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços aberto e fechado. Também foram analisados as imersões de cabeça (*head dipping*) de cada animal.

Os animais tratados com FALC 40 mg/Kg demonstraram maior tempo de permanência no braço aberto quando comparado com o grupo salina (teste *t* Student, $p < 0,05$) (Figura 20 A). Não houve diferença estatística do tempo de permanência no braço fechado em nenhum dos tratamentos (Figura 20 B). As frequências de entrada nos braços aberto e fechado não apresentaram diferenças significativa nos tratamentos com FALC quando comparadas com o grupo controle (teste *t* Student ou por análise de variância seguida de Dunnett). Apenas a galantamina apresentou maior frequência de entradas no braço fechado e menor frequência de entradas braços abertos em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 21).

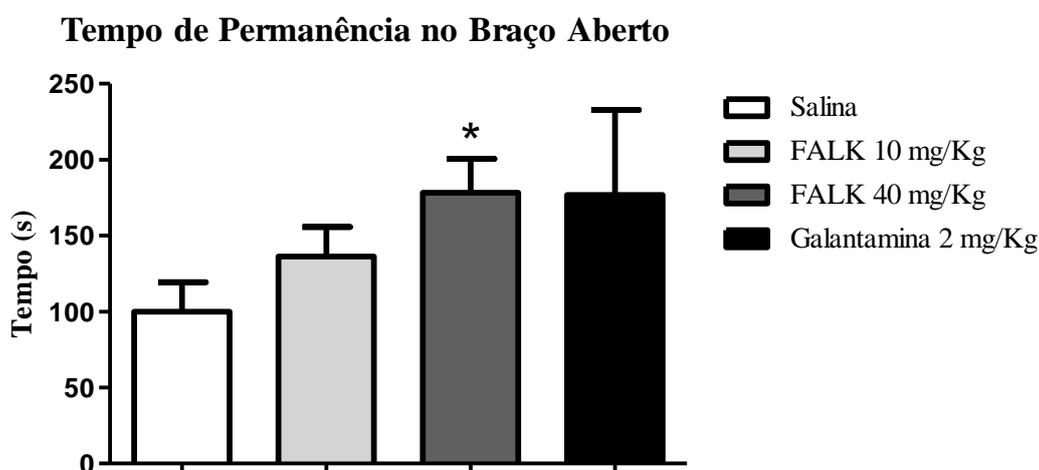
Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de imersões de cabeça (*head dipping*) nos animais tratados com FALC 40 mg/Kg, quando comparados por análise de variância (ANOVA) seguido de Dunnett (Figura 22).

Rodgers *et al.* (1999) afirma que a ansiedade é medida pela frequência do ato de evitar os braços abertos e frequência de entrada nos braços fechados. Lister (1987) avaliou a

porcentagem de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos como excelentes medidas de estado de ansiedade. Fármacos ansiolíticos como o benzodiazepínico diazepam demonstram menor aversão pelo braço aberto (Handley & Mithani, 1984). A administração aguda de diazepam também mostrou um aumento no número de imersões de cabeça (1 e 2 mg/Kg) (Lacerda, 2006).

Os resultados obtidos nos animais tratados com a FALC, tanto no labirinto em cruz elevado quanto no actômetro eletrônico demonstram uma atividade ansiolítica do fármaco.

A.



B.

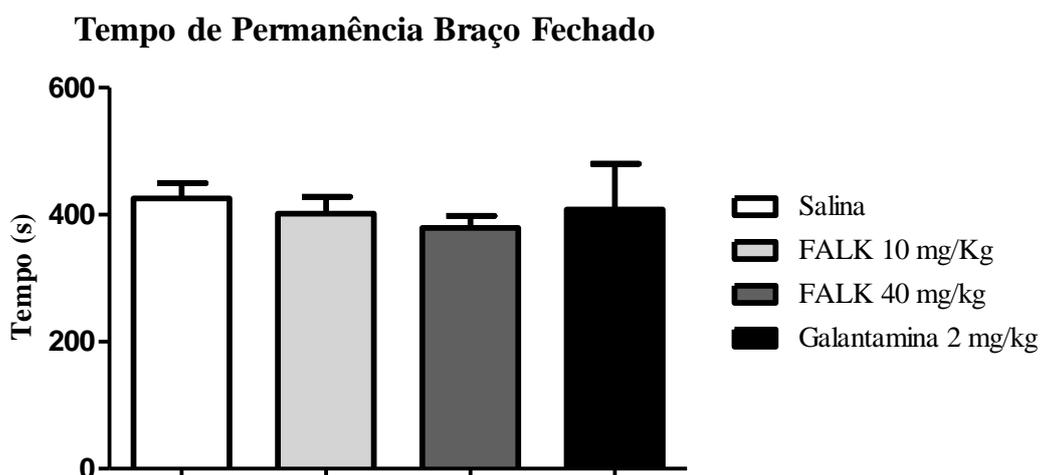


Figura 20: Efeito da FALC (10 e 40 mg/Kg, *i.p.*) sobre a atividade ansiolítica, medida pelo tempo de permanência nos braços abertos (A) e braços fechados (B) no labirinto em cruz elevado. Teste t Student não-pareado. **estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$

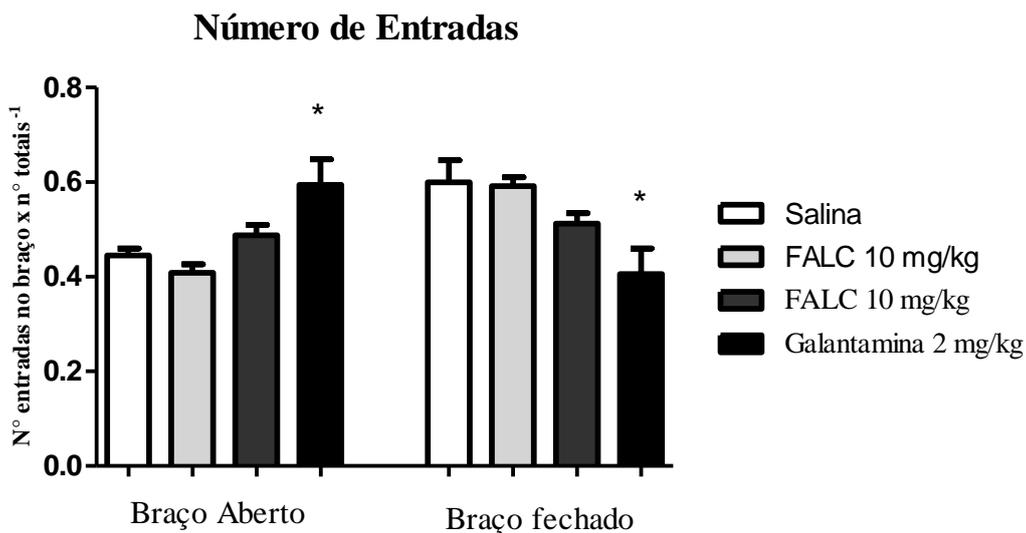


Figura 21: Efeito da FALC (10 e 40 mg/ Kg, i.p.) sobre a atividade ansiolítica, medida pelo número de mergulhos de cabeça (“head-dipping”). ANOVA seguido de Dunnet. **estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$

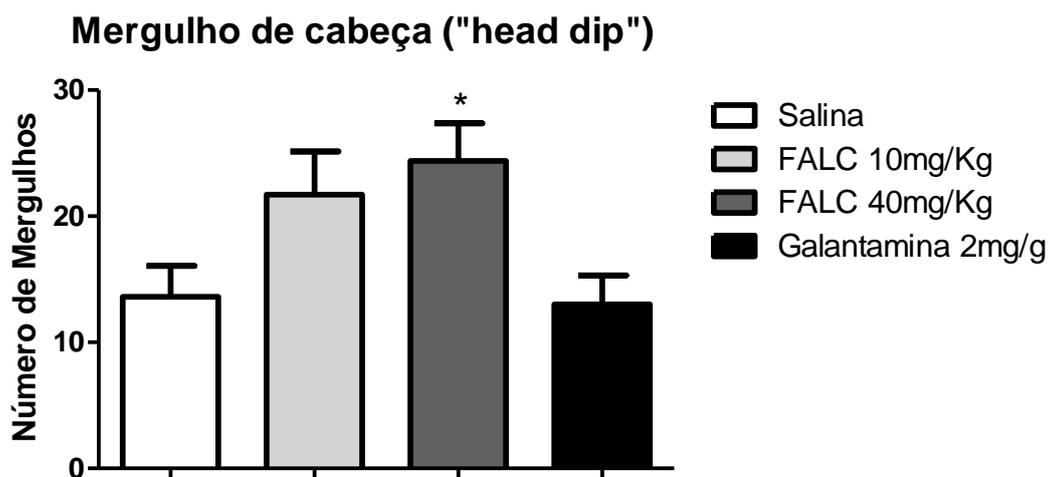


Figura 22: Efeito da FALC (10 e 40 mg/ Kg, i.p.) sobre a atividade ansiolítica, medida pelo número de mergulhos de cabeça (“head-dipping”). ANOVA seguido de Dunnet. *estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$

4.3.3. Avaliação dos processos de Memória

Os animais tratados com FALC (10 e 40 mg/Kg) foram colocados na esquia inibitória para o treino, após o teste de atividade ansiolítica descrito em 4.3.2. Os

camundongos foram submetidos ao teste de esquivas inibitórias após 24 horas do treino e novamente após 7 dias. Os resultados foram comparados com o controle e o padrão galantamina. A análise estatística foi realizada por análise de variância não-paramétrica, teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de comparação múltipla, Dunn.

É possível observar melhora significativa na aquisição da memória no tratamento com FALC 10 mg/Kg em comparação com o treino após 24 horas ($p < 0,05$) e após 7 dias ($p < 0,001$). O mesmo comportamento não ocorre nos animais tratados com FALC 40 mg/Kg, onde não há diferença estatística no teste após 7 dias em relação ao treino, embora haja uma pequena melhora na aquisição da memória após 24 horas.

Os camundongos tratados com FALC 10 mg/Kg demonstraram uma melhor aquisição de memória uma vez que permaneceram mais tempo no lado claro da esquiva inibitória após 24 horas ($p < 0,05$) e após 7 dias ($p < 0,001$) em relação ao treino. Considerando o aumento do tempo de permanência no lado claro após 7 dias em relação ao treino como um parâmetro para medir a melhora na aquisição da memória, o tratamento com FALC 10 mg/Kg apresentou melhor aquisição da memória quando comparado com o controle e com a galantamina, pois esses dois tratamentos apresentaram menor diferença estatística na latência em relação a seus respectivos treinos ($p < 0,01$).

A FALC 40 mg/Kg demonstrou uma diminuição na aquisição de memória, uma vez que não apresentou diferença estatística significativa entre o treino e o teste após 7 dias, embora apresente essa diferença no teste após 24 horas ($p < 0,05$). Uma possível explicação é o fato de que, para muitos fármacos, a curva dose-resposta é representada por uma distribuição normal (gaussiana), onde em pequenas doses a sensibilidade é pequena, chegando a um máximo e declinando novamente (Goldstein 2005, Sweeney *et al.* 1989). Comparando os resultados do tratamento com FALC 10 mg/Kg e FALC 40 mg/Kg é possível que essa segunda dose seja elevada e sua representação na curva dose-resposta esteja representada em seu declínio. Para representar essa curva e confirmar essa hipótese seriam necessários novos testes aplicando diferentes concentrações do fármaco nos animais, menores que FALC 10 mg/Kg e intermediárias entre FALC 10 mg/Kg e FALC 40 mg/Kg.

Aquisição da Memória

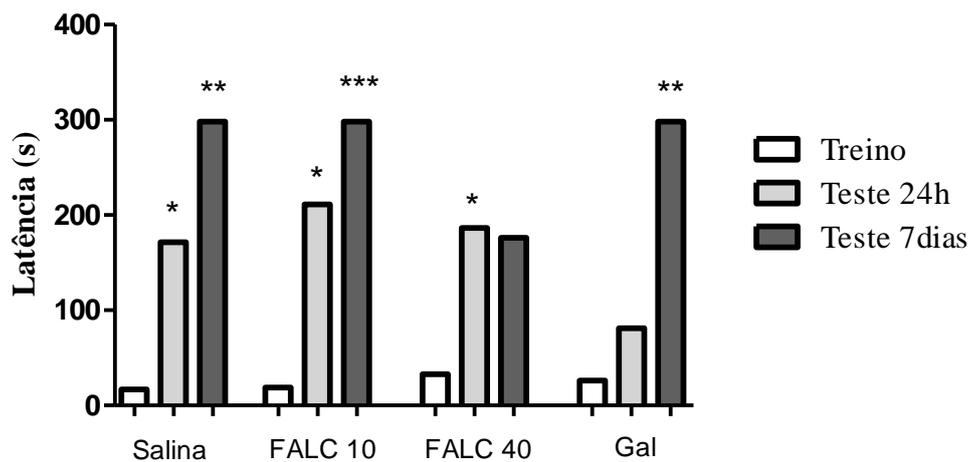


Figura 23: Efeito da FALC (10 e 40 mg/ Kg, i.p.) sobre a aquisição da memória. ANOVA não-pareado (Kruskal-Wallis) seguido de teste de comparação múltipla de Dunn. Diferença estatística comparada com controle salina. *estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$; **estatisticamente diferente do controle $p < 0,01$; ***estatisticamente diferente do controle $p < 0,001$

5. Conclusão

- O extrato etanólico de caule de *E. leiocarpa* e suas frações, fração alcaloídica (FALC) e fração hexânica mostraram grande potencial de inibição da acetilcolinesterase. A fração alcaloídica foi a que apresentou melhor atividade anticolinesterásica com redução de atividade de $49,6 \pm 1,0\%$ a $94,3 \pm 0,2\%$ (0,75 - 100 $\mu\text{g/mL}$). O extrato etanólico apresentou redução de atividade da enzima de $3,4 \pm 0,7\%$ a $72,5 \pm 0,8\%$.
- Da fração alcaloídica (FALC) foram obtidas 14 frações purificadas por CLAE. Sete dessas frações apresentaram potencial anticolinesterásico e cinco delas foram identificadas.
- As frações foram identificadas como leiokinina A (Fr.7), leptomerina (Fr.9), kokusaginina (Fr.10), esquimianina (Fr.11) e uma mistura de maculina e flindersiamina (Fr.12). A leptomerina e a esquimianina foram identificadas pela primeira vez em caule de *E. leiocarpa*. A leptomerina e a kokusaginina apresentaram potencial anticolinesterásico semelhante ao padrão galantamina, um dos mais importantes fármacos utilizados no tratamento da Doença de Alzheimer.
- Os camundongos tratados com FALC apresentaram alteração na atividade locomotora e efeitos ansiolíticos quando submetidos aos testes em actômetro eletrônico e labirinto em cruz elevado. A FALC 10 mg/Kg apresentou melhora na aquisição da memória em testes de esQUIVA inibitória, porém novos testes devem ser realizados.

6. Resumo

Esenbeckia leiocarpa Engl. (Rutaceae) é uma planta semidecídua, esciófita, característica da floresta latifoliada primária, de estrutura arbórea com tronco reto que pode atingir de 20 a 30 metros, madeira pesada, encontrada do sul da Bahia até São Paulo. Diversos metabólitos secundários já foram identificados em *E. leiocarpa* como os alcalóides kokusaginina, flindersiamina, maculina, dictamnina, leiokinina A, leiokinina B entre. A Doença de Alzheimer é caracterizada por uma desordem neurodegenerativa progressiva onde há um déficit neuroquímico que atinge principalmente a região do hipocampo e os núcleos basais, afetando as vias colinérgicas. O foco do tratamento da DA está em aumentar o nível de acetilcolina no cérebro com o auxílio de inibidores de acetilcolinesterase. Estudos anteriores com o extrato bruto de *E. leiocarpa* demonstraram potencial inibição da acetilcolinesterase em testes *in vitro*. O presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico de *E. leiocarpa* direcionado para a obtenção dos compostos responsáveis pela atividade anticolinesterásica e verificar a atividade da fração alcalóides totais sobre a memória, ansiedade e depressão. Os ramos caulinares sem folhas de *E. leiocarpa* foram moídos e o extrato etanólico obtido a partir do três métodos: maceração, ASE à temperatura ambiente e ASE à 70°C. O extrato etanólico (34,8g) foi dissolvido em solução ácida (HCl 0,1M) e submetido a processo de separação ácido/base. Embora o método da maceração tenha mostrado melhor rendimento na obtenção do extrato etanólico o método ASE70 mostrou melhor eficiência para a obtenção dos alcalóides. A Fração Alcaloídica (FALC) obtida foi separada em CLAE usando coluna preparativa ODS Shimadzu C-18 (250 x 20 mm), e a fase móvel acetonitrila (10%):metanol (45%):água (45%) (UV 242 nm e fluxo de 8 mL/min). A identificação estrutural foi feita por ressonância magnética nuclear 1D (¹H, ¹³C e DEPT) e 2D (1H-1H gCOSY, gHMQC e gHMBC) e comparada com dados da literatura. Após a identificação de seus compostos a FALC foi utilizada em testes comportamentais em camundongos C57/Black6 para avaliar a atividade locomotora, a ansiedade e os processos de memória nas concentrações de 10 e 40 mg/Kg, via i.p. e comparadas com galantamina. Foram purificados e identificados cinco alcalóide da FALC. As frações Fr. 7 (t_R= 15,4 min) e Fr. 9 (t_R= 19,3 min) foram identificados como dois alcalóides 4-quinolinonicos, leiokinina A (5,8 mg) e leptomerina (16,0 mg), respectivamente. Nas frações Fr. 10 (t_R= 24,5 min) e Fr. 11 (t_R= 26,2 min) foram identificados dois alcalóides furoquinolinicos, kokusaginina (5,7 mg) e esquimianina (12,3 mg), respectivamente. Na Fr. 12 (t_R= 34,3 min) foi encontrada uma mistura dos alcalóides (3.2 mg), maculina and flindersiamina. Os alcalóides leiokinina A e

esquimianina apresentaram inibição da acetilcolinesterase com IC_{50} 0,21 mM e 1,4 mM, respectivamente. Enquanto, leptomerina e kokusaginina apresentaram atividade anticolinesterásica potente com IC_{50} de 2,5 μ M e 46,0 μ M, respectivamente, semelhante à substância padrão galantamina (IC_{50} 1,7 μ M). Os resultados mostraram pela primeira vez a presença dos alcalóides leptomerina e esquimianina no caule de *E. leiocarpa*. Os testes comportamentais mostraram que a FALC possui atividade ansiolítica e alterações na aquisição de memória.

7. Abstract

Esenbeckia leiocarpa Eng. (Rutaceae) is a semi-deciduous tree, characteristic of broadleaf forest primary structure tree with straight trunk that can reach 20 to 30 meters, heavy wood, found in southern Bahia to Sao Paulo. Several secondary metabolites have been identified in *E. leiocarpa* as alkaloids kokusagine, flindersiamine, maculine, dictamnine, leiokinine A and leiokinine B. Alzheimer's Disease is characterized by a progressive neurodegenerative disorder where there is a neurochemical deficit that affects mainly the region of the hippocampus and the basal ganglia, affecting the cholinergic pathways. The focus of the treatment of AD is to increase the level of acetylcholine in the brain with the aid of inhibitors of acetylcholinesterase. Previous studies with the crude extract of *E. leiocarpa* demonstrated potential inhibition of acetylcholinesterase, in vitro tests. This study aimed to study the chemical of *E. leiocarpa* directed to obtaining the compounds responsible for anticholinesterasic activity and verify the activity of total alkaloid fraction in the memory and anxiety. The branches stem without leaves of *E. leiocarpa* were ground and the extracts obtained from three methods: soaking, the ASE and ASE temperature to 70 ° C. The ethanol extract (34.8 g) was dissolved in acid solution (HCl 0.1 M) and subjected to the process of separating acid / base. Although the method of maceration has shown better results in obtaining the ethanol extract ASE70 method showed better efficiency for obtaining the alkaloids. The alkaloidal fraction (FALC) obtained was separated on HPLC using preparative column ODS Shimadzu C-18 (250 x 20 mm), and mobile phase acetonitrile (10%): methanol (45%): water (45%) (UV 242 nm and flow of 8 mL / min). The structural identification was made by nuclear magnetic resonance 1D (1H, 13C and DEPT) and 2D (1H-1H gCOSY, and gHMBC) and compared with literature data. After identifying the compounds FALC was used in behavioral tests in mice C57/Black6 to assess locomotor activity, anxiety and memory processes in concentrations of 10 and 40 mg/Kg, intraperitoneally and compared with galantamine. Five alkaloids were purified and identified in FALC. The fractions Fr 7 (tR = 15.4 min) and Fr 9 (tR = 19.3 min) were identified as two 4-quinolinone alkaloids, leiokinine A (5.8 mg) and leptomerine (16.0 mg) respectively. Fractions Fr 10 (tR = 24.5 min) and Fr 11 (tR = 26.2 min) were identified as two furoquinoline alkaloids, kokusagine (5.7 mg) and furoquinoline (12.3 mg), respectively. In Fr 12 (tR = 34.3 min) was found a mixture of two furoquinoline alkaloids (3.2 mg), maculine and flindersiamine. The alkaloids leiokinine A and skimmianine showed inhibition of acetylcholinesterase with IC₅₀ 0.21 mM

and 1.4 mM, respectively. While leptomerine and kokusaginine inhibited acetylcholinesterase with potent activity with IC_{50} of 2.5 μ M and 46.0 M, respectively, similar to the standard substance galantamine (IC_{50} 1.7 μ M). The results showed for the first time the presence of alkaloids leptomerine and skimmianine in the stem of *E. leiocarpa*. Behavioral tests showed that the FALC has anxiolytic activity and changes the memory acquisition.

8. Referências Bibliográficas

- Akhmedzhanova, V.I., Bessonova, I.A., Yunusov, S. Yu.** 1986. Alkaloids of *Haplophyllum leptomerum*. I. Structure of leptomerine. *Chemistry of Natural Compounds*, 22(1): 78-79.
- Almeida, O.P.** 1998. Tratamento da doença de Alzheimer: avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 56(3-B): 688-96.
- Barros-Filho, B.A., Nunes, F.M., Oliveira, F.C.M., Andrade-Neto, M. & Mattos, M.C.** 2007. Metabólitos secundários de *Esenbeckia almawillia* Kaastra (Rutaceae). *Química Nova* 30(7): 1589-1591.
- Barroso, G. M.; Guimarães, E. F.; Ichaso, C. L. F; Costa, C. G.; Peixoto, A. L. & Lima, H. C.** 1986. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v.2. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer B & Lippa, A.S.** 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 217: 408-17.
- Biavatti M.W., Vieira,P.C., Silva,M.F.G.F. Fernandes, J.B., Victor,S.R., Pagnocca, F.C., Albuquerque, S.,Caracelli, I. & Zukerman-Schpector. J.** 2002. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray structure of flindersiamine. *Journal. Brailian Chemistry Society*, 13(1): 66-70.
- Boerngen-Lacerda, R.B, Souza-Formigoni, M.L, O. Souza.** 2000. Does the increase in the locomotion induced by the ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 67: 225-232.
- Brachet A., Rudaz, S., Mateus, L., Christen, P & Veuthey, J-L.** 2001. Optimization of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Journal of Separation Science*, 24: 865-873.
- Bullock, R. & Dengiz, A.** 2005. Cognitive performance in patients with Alzheimer's disease receiving cholinesterase inhibitors for up 5 years. *International Journal of Clinical Practice*, 59(7): 817-822.
- Chase, M.W., Morton, M.C. & Kallunki, J.A.** 1999. Phylogenetic relationships of Rutaceae: a cladistic analysis of th subfamilies using evidence from rbcL e atpB sequence vatiation. *American Jornal of Botany* 86(8): 1191-1199.

- Colgin, L.L., Kubota, D. & Lynch, G.** 2003. Cholinergic plasticity in hippocampus. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 100(5) 2872-2877.
- Cortez, L.E.R., Cortez, D.A.G., Ferreira, A.G., Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F. & Fernandes, J.B.** 2006. Constituintes químicos de *Almeida coerulea* (Nees & Mart.) A.St.-Hil. Rutaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(2): 164-169.
- Cragg, G.M., Schepartz, S.A., Suffness, M. & Grever, M.R.** 1993. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *Journal of Natural Products* 56:1657-1668.
- Crestana, C.S.M., Dias, I.S & Kageyama, P.Y.** 1982. Biologia floral do *Guarantã* (*Esenbeckia leiocarpa* Engl.). *Silvicultura*, 28(8): 35-38.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. & Lewis, N.G.** 2000. Natural products (secondary metabolites). p. 1251-1318. in **Buchanan, B., Gruissem, W. Jones, R.** (eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Cummings, J.L.** 2000. Cholinesterase inhibitors: a new class of psychotropic compounds. *American Journal of Psychiatry*. 157: 4-15.
- Cummings, J.L., Vinters, H.V., Cole, G.M. & Khachaturian, Z.S.** 1998. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology*, 51(suppl 1): S2-S17.
- Davies, P.** 1978. Studies on the neurochemistry of central cholinergic systems in Alzheimer's disease, in *Alzheimer's Disease: Senile Dementia and Related Disorders*. Edited by Katzman R, Terry RD, Bick KL. Raven Press. New York, p 453-459.
- DeFerrari, G.V., Canales, M.A., Shin, I. Weiner, L.M., Silman, I. & Inestrosa, N.C.** 2001. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid β -peptide fibril formation. *Biochemistry* . 40, 35; 10447-57.
- DeLucia, R. & Oliveira-Filho, R.M.** 2004. *Farmacologia Integrada*. 2ª ed. Ed. Revinter. São Paulo. p 143-170.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr. & Featherstone, R.M.** 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- Esiri, M.M.** 1996. The basis for behavioural disturbances in dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 61:127-30.

- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K.** 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66: 167-147.
- Gains, S. & Born, J.** 2003. Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for declarative memory consolidation. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 101(7) 2140-2144.
- Giacobini E.** 2003. Cholinergic inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmaceutical Research* 50: 433-440.
- Guela, C. & Mesulam, M.M.** 1994. Cholinergic systems and related neuropathological predilection patterns in Alzheimer disease. Alzheimer Disease. In: **Terry RD, Katzman R, Bick KL.** (eds.). Raven Press. New York, p 263–291.
- Haass, C. & Selkoe, D.L.** 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Molecular Cell Biology* 8: 101-112.
- Hanley, S.L & Mithani, S.** 1984. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of "fear" motivated behavior. *Naunyn-Shimiedeberg's Archives in Pharmacology*, 327: 1-5.
- Hardy, J. & Selkoe, D.J.** 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on road to therapeutics. *Science* 297: 353-356.
- Harvey, A.L.** 1995. The pharmacology of galanthamine and its analogues. *Pharmacology & Therapeutics* 68(1): 113-128
- Hashimoto, T., Yamada, Y.** 1994. Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 257-285.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C-X., Alonso, A.C. & Grundke-Iqbal, I.** 2009. Mechanism of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neurophatologica* 118(1):53-69.
- Izquierdo, I.** 2002. Memória. Porto Alegre: Artes Médicas.
- Izquierdo, I.** 2004. A arte de esquecer. Rio de Janeiro: Vieira & Lent.
- Jacobsen, M.** 1989. Botanical pesticides: past, present and future. p.1–10 in **Arnason JT, Philogène BJR, Morand P** (eds) *Insecticides of Plant Origin*. Washington DC: American Chemical Society.
- Jansen, O. Akhmedzhanova, V.I, Angenot, L., Balansard, Chariot, A., Ollivier, E., Tits, M., Frédérich, M.** 2005. Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum* A.Juss. for their properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 241-245.
- Katzman, R & Jackson, E.** 1991. Alzheimer Disease: Basic and Clinical Advances. *Journal of the American Geriatric Society*, 39: 516-525.

- Kaufman, B. & Christen, P.** 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extractor. *Phytochemistry Analysis* 13:105-113.
- Kolb, B & Wishaw, I.Q.** 2001. An Introduction to Brain and Behavior. Worth Publishers
- Kolb, B. & Wishaw, I.Q.** 1998. Brain plasticity and behavior. *Annual Review of Psychology*, 49: 43-64.
- Lacerda, GFML,** 2006. Ansiedade em modelos animais: efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial. Diss. Universidade Federal do Paraná.
- Lee, V.M.Y, Goedert, M. Trojanowski, J.Q.** 2001. Neurodegenerative Neuroproteins. *Annual Review of Neuroscience*, 24: 1121-1159.
- Li, Y-M., Lai, M-T, Xu, M., Huang, Q., DiMuzio-Mower, J, Sardana, M.K., Shi, X-P, Yin, K-C, Shafer, J.A. & Gardell, S.J.** 2000. Presenilin 1 is linked with γ -secretase activity in the detergent solubilized state. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 97(11): 6138-6143.
- Lister, R.G.** 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92: 180-185.
- Lorenzi, H.** 1992. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Ed. Plantarum: Nova Odessa. São Paulo. v.1, p.307.
- Marrs, W.R.** 1993. Organophosphate poisoning. *Pharmacology & Therapeutics* 58:51-66.
- Marston, A., Kissling, J. & Hostettmann, K.** 2002. A Rapid TLC Bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, 13: 51-54.
- McDermott, K.B.** 2002. Memory, explicit and implicit. p. 773-781. in **Ramachandran, V.S.** Encyclopedia of Human Brain. V.2 Elsevier Science Ltda.
- Mester, I.** Chemistry and chemical taxonomy of rursales. Waterman, P.G., Grundon, M.F. (Eds) Academic Press. London, (cap 3)
- Monache, F. D., Benedetto, R., Di, Souza, M.A.M. & Sandor, P.** 1990. *Esenbeckia leiocarpa*: II^a. Further Componentes. *Gazzetta Chimica Italiana*, 120: 387-389.
- Monache, F.D., Monache, G.D., Souza, M.A.M., Cavalcanti, M.S. & Chiappeta, A.** 1989. Isopentenylindole derivatives and other components of *Esenbeckia leiocarpa*. *Gazzetta Chimica Italiana*, 119: 435-439.
- Nakatsu, T., Johns, T., Kubo, I., Sakai, M., Chatani, K., Saito, K., Tamagiwa, Y. & Kamikawa, T.** 1990. Isolation, structure, and synthesis of novel 4-quinolinone alkaloids from *Esenbeckia leiocarpa*. *Journal of Natural Products*, 53 (6): 1508-1513.

- Nunes, F.M., Barros-Filho, b.A., Oliveira, M.C.F., Andrade-Neto, M., Mattos, M.C., Mafezoli, J., & Pirani, J.R.** 2005. ^1H and ^{13}C NMR spectra of 3,8-dimethoxyfuro[3,2g]coumarin and maculine from *Esenbeckia grandiflora* Martius (Rutaceae). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43: 864-866.
- Oliveira, F.M., Sant'ana, A.E., Conserva, L.M., Maia, J.G. & Guilhon G.M.P.** 1996. Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia* species. *Phytochemistry* 41(2): 647-649.
- Ong E-S, Woo, S-O Yong & Y-L.** 2000. Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 313: 57-64.
- Paulini, H., Waibel, R. & Schimmer, O.** 1989. Mutagenicity and structure-mutagenicity relationship of furoquinolines, naturally occurring alkaloids of Rutaceae. *Mutation Research*, 227: 179-186.
- Quervain, D.J.F. & Papassotiropoulos, A.** 2006. Identification of genetic cluster influencing memory performance and hippocampal activity in humans. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 103(11): 4270-4274.
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C.X., Govoni S.** 2003. Acetylcholinesterase inhibitor: novel activities of old molecules. *Pharmacological Research*, 50(2004) 441-451.
- Ragozzino, M.Em, Unick, K.E. & Gold, P.E.** 1996. Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: Augmentation by glucose. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 93: 4693-4698.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Flowers, R.J.** 2007. Rang & Dale Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Rhee, I.K., Meent, M., Ingkaninan, K. & Verpoorte, R.** 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using sílica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography*, 915: 217-223.
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N. & Pohl, C.** 1996. Accelerated solvent Extraction: a technique for sample preparation. *Analytic Chemistry* 68: 1033-1039.
- Rios, M. Y.; Delgado, G.** 1992. Terpenoids and Alkaloids from *Esenbeckia belizensis*. Spontaneous Oxidation of Furoquinoline Alkaloids. *Journal of Natural Products* 55: 1307-1309.

- Rodgers R.J., Nikulina E.M. & Cole J.C.**(1994). Dopamine D1 and D2 receptor ligands modulated the behavior of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49: 985-995
- Ruarte M.B & Rogers**, 1999. Behaviour profiles displayed by rats in an elevated asymmetric plus-maze: effects of diazepam. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 99-106
- Sackett, T.A., Towers, G.H.N. & Isman, M.B.** 2007. Effects of furoquinoline alkaloids on the growth and feeding of two polyphagous lepidopteran. *Chemoecology* 17: 97-101.
- Selkoe, D.J. & Schenk, D.** 2003. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43:545-584.
- Selkoe, D.J.** 2004. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's Parkinson's disease. *Natural Cell Biology*, 6:1054-1061.
- Seoane, C.E.S., Kageyama, P.Y. & Sebbenn, A.M.** 2000. Forest fragmentation effects in population genetic structure of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (guarantã). *Scientia Forestalis* 57: 123-139.
- Shelton, C.C., Zhu, L. Deming, C., Yang, L., Wang, R., Djaballah, H., Zheng, H. & Li, Y-M.** 2009. Modulation of γ -secretase specificity using small molecule allosteric inhibitors. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 106(48): 20228-20233.
- Silman, I. & Sussman, I.** 2000. Structural studies of acetylcholinesterase. in: Giacobini, E. (Ed.) Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. London: Martin Dunitz. p 269-281.
- Simpson, D.S., Jacobs, H.** 2005. Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia pentaphylla* (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 841-844.
- Squire, L.** 1987. Memory and Brain. New York: Oxford University Press.
- Sweeney, J. E., Puttfarcken, P. S. and Coyle, J. T.** (1989) Galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor: a time course of the effects on performance and neurochemical parameters in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 34: 129-137.
- Viegas Jr, C. Bolzani, V.S., Pimentel, L.S.B., Castro, N.G., Cabral R.F., Costa, R.S., Floyd, C. Rocha, M.S., Young, M.C.M., Barreiro, E.J. & Fraga, A.A.M. 2005.6 New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13: 4184-4190

- Viegas, C., Bolzani, V.S., Furlan, M., Fraga, C.A.B. & Bareiro, E.J.** 2004. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. *Química Nova*, 27(4): 655-660.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Clark, A.W., Coyle, J.T. & DeLong, M.R.** 1981. Alzheimer's disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Annals of Neurology*, 10: 122–126.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W. & Coyle, J.T.** 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215: 1237–1239.
- Wishaw, I.Q.** 1989. Dissociating performance and learning deficits in spatial navigation tasks in rats subjected to cholinergic muscarinic blockade. *Brain Research Bulletin*, 23: 347-358.