



UNIVALI
UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

VANESSA FÁTIMA GAZONI

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO
ANTICOLINESTERÁSICO DO EXTRATO E COMPOSTOS ISOLADOS
DA *Rapanea ferruginea***

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS

VANESSA FÁTIMA GAZONI

ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO
ANTICOLINESTERÁSICO DO EXTRATO E COMPOSTOS ISOLADOS
*DA *Rapanea ferruginea**

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Angela Malheiros
Co-orientador: Profa. Dra. Cristiani Bürger

Itajaí, Fevereiro de 2009.

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO
ANTICOLINESTERÁSICO DO EXTRATO E COMPOSTOS ISOLADOS
DA *Rapanea ferruginea***

Vanessa Fátima Gazoni

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

Tânia Mari Bellé Bresolin, Doutora
Coordenador do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Doutora Angela Malheiros (UNIVALI)
Presidente

Doutora Cristiani Bürger (UNIVALI)
Co-orientador

Doutora Christiane Meyre Da Silva Bittencourt (UNIVALI)
Membro

Titulação (instituição)
Membro

Itajaí (SC), 27, fevereiro de 2009

Primeiramente a DEUS e aos meus pais, Vera e Valmor que me incentivaram a lutar e ir atrás de meus objetivos com dignidade, compreensão e amor...

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dra Angela Malheiros, que além de orientadora foi uma pessoa maravilhosa, pela sua compreensão, sabedoria e dedicação me guiando e me ensinando em todos os momentos vividos nesta universidade, proporcionando assim, meu crescimento pessoal e profissional.

A Prof^a Dra Cristiani Bürger pela sua dedicação e sabedoria nos ensaios farmacológicos.

Ao Prof Dr Franco Delle Monache pelo auxílio na identificação dos compostos isolados.

Aos professores do PMCF da UNIVALI pelo conhecimento passado até nós e pela amizade.

Aos meus pais, Vera e Valmor pelo apoio, incentivo e compreensão neste período de aprendizado e em todos os momentos de minha vida.

Ao José Malheiros por ter coletado a planta referente a este estudo.

A amiga Tainá que esteve presente na minha vida auxiliando na parte fitoquímica.

A amiga Caroline Lessa por ter me ensinado o ensaio bioautográfico.

A Fernanda Fillipin por ter auxiliado nos ensaios farmacológicos.

As amigas Franciele e Maria Claudia por dividirem comigo os desafios, as barreiras, as alegrias e as tristezas vividas neste aprendizado.

Aos Pedros por terem auxiliado nas análises de infravermelho e de ressonância magnética nuclear.

A FINEP por ter proporcionado a bolsa de estudos vinculada à indústria.

A CAPES por ter proporcionado a bolsa de estudos.

A DEUS, pois ELE é a força maior que existe dentro de cada um de nós.

*Camínhe com seus próprios pés, por mais que erre o
caminho
Existirá sempre um certo
Mesmo que primeiro precise errar muitos.*

Autor desconhecido

ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICOLINESTERÁSICO DO EXTRATO E COMPOSTOS ISOLADOS DA *Rapanea ferruginea*

Vanessa Fátima Gazoni

Fevereiro/2009

Orientador: Angela Malheiros, Dr^a

Co-Orientador: Cristiani Bürger, Dr^a

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas.

Número de Páginas: 84

As plantas medicinais possuem na sua composição diversas substâncias responsáveis pela sua ação medicinal. Os efeitos dessas substâncias sobre o SNC é de suma importância para identificação de compostos com possíveis e futuras aplicações terapêuticas. Devido ao aumento gradual de portadores da Doença de Alzheimer (DA), uma patologia neurodegenerativa que atinge a cognição, estão sendo realizados estudos com diversas plantas para a descoberta de novos fármacos. Este trabalho visou o isolamento e identificação de substâncias da *Rapanea ferruginea* e avaliação da atividade biológica sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), uma vez que os portadores da DA possuem níveis baixos de acetilcolina e, uma das maneiras de controlar a doença é utilizando inibidores de AChE. Os extratos etanólicos dos frutos, caules e folhas da *Rapanea ferruginea* foram submetidos à separação em colunas cromatográficas onde foi possível isolar dos frutos o ácido mirsinóico A (AMA). Dos caules e folhas se isolou o ácido mirsinóico B (AMB), espinasterol, ácido graxo de cadeia longa e álcool graxo de cadeia longa. Estas substâncias foram identificadas por técnicas espectroscópicas de infravermelho e ressonância magnética nuclear. Os extratos das folhas, caules, frutos e as substâncias isoladas foram submetidos a ensaio bioautográfico onde obteve-se reação positiva na inibição da AChE em 80 µg para os extratos. Para as substâncias isoladas obteve-se inibição da AChE de 8 µg para o AMA, de 2 µg para o AMB e de 3,2 µg para o espinasterol. Para os testes *in vitro*, foram utilizadas amostras de cérebro total e de hipocampo de ratos Wistar machos como fonte de enzima. A atividade da AChE desses tecidos foi determinada através do método de Ellman et al. (1961), utilizando-se AMB 44 µM. A inibição em cérebro total foi mais intensa (30,10%) do que no hipocampo (22,08%). Esta pesquisa é de grande importância, pois fornece subsídios para um estudo mais detalhado sobre a planta e seus compostos na busca de novas substâncias que possuam ação anticolinesterásica.

Palavras-chave: *Rapanea ferruginea*. Ácidos mirsinóicos, Anticolinesterásico.

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTICHOLINESTERASE EVALUATION OF EXTRACT AND ISOLATED COMPOUND OF

Rapanea ferruginea

Vanessa Fátima Gazoni

February/2009

Supervisor: Ângela Malheiros, Dr.

Co-Supervisor: Cristiani Bürger, Dr.

Area of Concentration: Natural Products and Synthetic bioactive substances

Number of Pages: 84

Medicinal plants contain substances which are responsible for their medicinal action. The effects of these substances on the CNS are of great importance for identifying compounds with potential and future therapeutic applications. Due to the gradual increase in numbers of patients with Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disease that affects cognition, studies are being conducted with various plants to discover new drugs. This work sought to isolate and identify substances of *Rapanea ferruginea*, and to evaluate their anti-acetylcholinesterase activity (AChE), since patients with AD have low levels of acetylcholine, and one way of controlling the disease is through the use of AChE inhibitors. Ethanol extracts of the fruit, stems and leaves of *Rapanea ferruginea* were submitted to separation in chromatographic columns, in which it was possible to isolate myrsinoic acid A (MAA) from the fruit extract, and from the stem and leaf extracts, myrsinoic acid B (MAB), spinasterol, long chain fatty acid, and long chain fatty alcohol. These substances were identified by spectroscopic techniques of infrared and nuclear magnetic resonance. The leaf, stem, fruit and bark extracts, and the isolated substances, were submitted to bioautography assay, obtaining a positive reaction in the inhibition of AChE in 80 µg for the extract. For the isolated substances, AChE inhibition at 8 µg was obtained for the MAA, 2 µg for the MAB, and 3.2 µg for the spinasterol. For the *in vitro* tests, samples of total brain and hippocampus of male Wistar rats were used as the source of enzyme. The AChE activity of those tissues was determined by the method of Ellman et al. (1961), using MAB 44 µM. Total inhibition in the brain was more intense (30.10%) than in the hippocampus (22.08%). This research is of great importance because it provides a basis for more detailed study of the plant and its compounds, in the search for new substances with anticholinesterase action.

Keywords: *Rapanea ferruginea*. Myrsinoic acids, anticholinesterasic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Foto da planta <i>R. ferruginea</i> : (a) planta inteira (b) folhas, frutos e sementes de <i>R. ferruginea</i>	22
Figura 2	(a) Áreas do cérebro responsáveis pelas funções cognitivas. (b) Tomografia por emissão de pósitrons mostrando a diferença de um cérebro normal com o cérebro de uma pessoa portadora da doença de Alzheimer.....	32
Figura 3	Esquema reacional para a formação de corante azo a partir do acetato de nafil.....	36
Figura 4	Esquema da reação <i>in vitro</i> segundo método de Ellman.....	37
Figura 5	Folhas (a) , caules (b) e frutos (c) de <i>R. ferruginea</i> em processo de maceração.....	40
Figura 6	Evaporador rotatório sob pressão reduzida concentrando a amostra	40
Figura 7	Cromatografia em coluna do extrato bruto das folhas e caules de <i>R. ferruginea</i> (coluna 1A).....	41
Figura 8	Cromatografia em coluna (coluna 2A).....	42
Figura 9	Cromatografia em coluna (coluna 3A).....	42
Figura 10	Equipamento Cromatotron.....	43
Figura 11	Cromatografia em coluna (coluna 4A).....	44
Figura 12	Cromatografia em coluna (coluna 5A).....	44
Figura 13	Fluxograma dos procedimentos cromatográficos realizados com o extrato de folhas e caules de <i>R. ferruginea</i>	45
Figura 14	Cromatografia em coluna (coluna 3B).....	46
Figura 15	Cromatografia em coluna (coluna 4B).....	47
Figura 16	Fluxograma com os procedimentos cromatográficos realizados com os frutos de <i>R. ferruginea</i>	48
Figura 17	Espectro no IV (pastilha KBr) do RF1A.....	52
Figura 18	(a) Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) do RF1A. (b) ampliação espectro RMN ¹ H de 5,5 a 4,5 ppm. (c) ampliação de 3,5 a 1,0 ppm do RF1A.....	53
Figura 19	(a)(b) Espectro de RMN ¹³ C/DEPT (CDCl ₃ , 75,5 MHz) do RF1A. (c) ampliação espectro RMN ¹³ C de 16 a 135 ppm.....	55
Figura 20	Espectro no IV (pastilha de KBr) do RF3A.....	58
Figura 21	(a) Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz). (b) ampliação do espectro de RMN ¹ H de 5,5 a 3,0 ppm. (c) ampliação de 2,5 a 0,3 ppm do RF3A.....	59
Figura 22	(a) (b) Espectro de RMN ¹³ C/DEPT (CDCl ₃ , 75,5 MHz) do RF3A. (c) ampliação do espectro de RMN ¹³ C.....	61
Figura 23	Espectro de RMN ¹ H (CH ₃) ₂ CO, 300 MHz) do RF7A.....	63
Figura 24	Espectro no IV (pastilha de KBr) do RF9A.....	64
Figura 25	Espectro no IV (pastilha de KBr) do RF1B.....	66
Figura 26	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) do RF1B.....	67
Figura 27	(a) Ampliação DEPT. (b) espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75,5 MHz) do RF1B. (c) ampliação espectro RMN ¹³ C de 10 a 140 ppm.....	68
Figura 28	Ensaio bioautográfico por CCD dos extratos etanólicos dos frutos,	70

	folhas e caule de <i>R. ferruginea</i>	
Figura 29	Ensaio bioautográfico: (1) Folhas e Caules, (2) Frutos, (3) Cascas, (4) AMA, (5) AMB e (6) Espinasterol.....	71
Figura 30	Ensaio Bioautográfico com AMA.....	71
Figura 31	Ensaio Bioautográfico com AMB.....	72
Figura 32	Ensaio Bioautografico com o espinasterol.....	72
Figura 33	Efeito do AMB sobre a atividade da AChE em cérebro total (CT) e hipocampo de ratos. Os dados representam a média de 5 experimentos independentes realizados em duplicata ± E.P.M.analisados através do teste T. ** p < 0,01 quando comparados com o grupo controle (barras pretas).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Inibição da atividade da enzima AChE por extratos brutos de plantas ensaiados na microplaca (% de inibição) e CCD.....	37
Tabela 2	Valores de deslocamentos químicos (δ =ppm) de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos para o RF1A e comparação com dados da literatura para o ácido mirsinóico B.....	56
Tabela 3	Valores de deslocamentos químicos (δ =ppm) de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos para o RF3A e comparação com dados da literatura para o espinasterol e para o condrilasterol (RF3A1).....	62
Tabela 4	Valores de deslocamentos químicos (δ =ppm) de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos para o RF1B e comparação com dados da literatura para o ácido mirsinóico A.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
A β - β -amilóide
ACh - Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
AcOEt – Acetato de etila
AMA - Ácido Mirsinóico A
AMB - Ácido Mirsinóico B
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Api – β -apiofuranosil
BuChE - Butiril-colinesterase
CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CC - Cromatografia em coluna
CT – Cérebro total
d – Duplete
dd – Duplete de duplete
DA - Doença de Alzheimer
DCM – Diclorometano
DEPT – Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização
DTNB - ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EM – Espectrometria de Massas
EtOH – Etanol
Esp. – Espinasterol
Glc – β -glicopiranosil
Gli – Glicose
H - Hidrogênios
Hex – Hexano
H₂O - Água
IV – Espectro de Infravermelho
m – Multiplete
Me - Metil
MeOH - Metanol

MeOD– Metanol deuterado

NIQFAR - Núcleo de Investigações Químico Farmacológicas

OMS - Organização Mundial da Saúde

J – Constante de Acoplamento

R_f – Fator de Retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s - Simpleto

sl – Simpleto largo

SNC – Sistema Nervoso Central

t - Tripleto

TMS – Tetrametilsilano

UV - Ultravioleta

\varnothing_{int} – Diâmetro interno da coluna

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral:	18
2.2 Objetivos Específicos:	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Aspectos gerais sobre plantas medicinais:.....	19
3.2 Gênero <i>Rapanea</i>	20
3.2.1 Aspectos Químico-Farmacológicos	22
3.3 Técnicas de isolamento e identificação de produtos naturais:	28
3.4 Inibidores da AChE e Doença de Alzheimer	31
3.4 Técnicas para verificar a atividade da Acetilcolinesterase	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Material:	38
4.1.1 Material Vegetal:	38
4.1.2 Material e Reagentes:.....	38
4.1.3 Equipamentos:.....	39
4.2 Métodos:	39
4.2.1 Obtenção dos extratos:	39
4.2.2 Isolamento de metabólitos secundários no extrato de folhas e caules	40
4.2.2 Isolamento de metabólitos secundários do extrato bruto dos frutos	46
4.2.3 Ensaio Bioautográfico	49
4.2.4 Ensaio “in vitro”	49
4.2.4.1 Animais	49
4.2.4.2 Preparação do material enzimático	50
4.2.4.3 Ensaio Enzimático.....	50
4.2.5 Análise estatística	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Identificação das substâncias isoladas das folhas e caules da <i>R.</i> <i>ferruginea</i>	51
5.1.1 Identificação da substância RF1A	51

5.1.2 Identificação da substância RF3A	56
5.1.3 Identificação da substância RF7A	63
5.1.4 Identificação da substância RF9A	64
5.2 Identificação dos compostos isolados dos frutos da <i>R. ferruginea</i>....	65
5.2.1 Identificação da substância RF1B	65
5.3 Estudos Biológicos	70
5.3.1 Ensaio Bioautográfico	70
5.3.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica em cérebro total e hipocampo de ratos	73
6 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais é tão antiga quanto à própria civilização. Apesar do pouco conhecimento científico sobre o efeito de diversas plantas, foi através delas que a humanidade tratava suas doenças. Ao longo do tempo, foi possível selecionar 300 plantas para a alimentação e, de um pouco mais de uma centena, obteve-se princípios puros para o tratamento de doenças (CRAGG, NEWMAN, 2009).

Muitas plantas têm propriedades medicinais e são utilizadas por várias culturas. Coletivamente estas utilizações cobrem aproximadamente 80% da população do mundo. A importância e as contribuições das plantas medicinais para o tratamento e a manutenção da saúde estão fora de qualquer controvérsia. Há uma abundância de provas científicas de que as plantas são boas fontes de compostos farmacêuticos e medicamentos (GURIB-FAKIM, 2006).

É extremamente necessária a busca de componentes bioativos em plantas para contribuir no desenvolvimento de novos fármacos para doenças que atualmente não são tratadas de maneira eficiente. Pode-se destacar a necessidade por antihiperlipemiantes, antitumorais, cardiovasculares e desordens do Sistema Nervoso Central (SNC) (BARBOSA-FILHO et al., 2006; WAGNER, 2009).

Dentre as desordens do SNC destaca-se a doença de Alzheimer (DA), patologia irreversível e progressiva caracterizada pela deterioração neuronal que resulta em perda de funções cognitivas, tais como memória, a capacidade de comunicação, julgamento e raciocínio (LANCTÔT et al., 2003). Para o tratamento da DA são utilizados fármacos como a donepezil, galantamina e rivastigmina, os quais agem inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE). Estas substâncias apresentam algumas limitações e efeitos adversos como o efeito hepatotóxico, decorrentes do acúmulo de acetilcolina no organismo do usuário. Uma vez que compostos naturais oriundos de plantas como a galantamina, exibem ação anticolinesterase. Pesquisas estão sendo realizadas com plantas medicinais na busca de novos fármacos com menos efeitos colaterais proporcionando ao indivíduo portador da doença uma melhor qualidade de vida.(MARUM, 2008).

Estudos estão sendo realizados nesta Instituição com os frutos, caules, folhas e cascas da *Rapanea ferruginea* com o objetivo de avaliar seu potencial terapêutico. Estudos já realizados mostraram que o extrato clorofórmico das cascas e o

composto isolado das cascas da *R. ferruginea*, ácido mirsinóico B (AMB), apresentaram efeito analgésico quando testados em vários modelos farmacológicos (HESS, 2006); ação anti-hiperglicemiante em ratos normoglicêmicos e diabéticos (BÜRGER, et al., 2007) e efeito antinociceptivo na dor neuropática induzida pelo diabetes (GALVAN et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007). O AMB não apresentou efeito tóxico nos modelos de toxicidade aguda e no teste da *Artemia salina* (HESS, 2006). Dando continuidade a estes estudos, esta pesquisa pretendeu fornecer subsídios para um estudo mais detalhado sobre a planta e seus princípios ativos através do isolamento e determinação estrutural dos mesmos além de buscar novas substâncias com ação anticolinesterásica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Estudar fitoquimicamente o extrato etanólico de frutos, caules e folhas da *Rapanea ferruginea* e analisar a atividade antiacetilcolinesterásica de extratos e compostos isolados.

2.2 Objetivos Específicos:

- Obter o extrato etanólico bruto de frutos, caules e folhas da *Rapanea ferruginea*;
- Fracionar os extratos e purificar as substâncias majoritárias através de técnicas cromatográficas;
- Identificar a estrutura química das substâncias purificadas através de técnicas espectroscópicas de infravermelho e ressonância magnética nuclear;
- Realizar o Ensaio Bioautográfico dos extratos e substâncias isoladas sobre a atividade da AChE;
- Avaliar o efeito do ácido mirsinóico B sobre a atividade da AChE de cérebro total, hipocampo e córtex de ratos Wistar machos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos gerais sobre plantas medicinais:

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização de tais produtos. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais como no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (BARREIRO; BOLZANI; JÚNIOR, 2006; CRAGG; NEWMAN, 2009).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), no mundo, 18 milhões de idosos apresentam-se com o mal de Alzheimer, sendo 61% deles em países do terceiro mundo. Daqui a 25 anos serão 34 milhões de idosos nesta situação e a grande maioria (71%), nos países mais pobres. No Brasil, tem-se atualmente 1,2 milhão de idosos portadores da doença de Alzheimer (KILLER, 2006). Cerca de 65 a 80% da população mundial não tem acesso ao atendimento primário da saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura de alívio para muitas doenças. A própria OMS não só reconhece como também estimula o uso de plantas medicinais pela população de países pobres, embora recomende cuidados especiais no seu uso através da distribuição de manuais (CEHINEL FILHO; YUNES, 2001).

O Brasil possui cerca de 40 a 200 mil espécies vegetais, um terço das existentes no planeta. Cerca de 10 mil delas são medicinais. A China tem 27 mil espécies vegetais, com 5 mil medicinais (20%), e a Índia, 18 mil, com 2,5 mil medicinais (14%). Temos, portanto, uma das floras mais ricas do mundo como fonte natural para o desenvolvimento de fitofármacos (CRAGG; NEWMAN, 2009).

Cragg e Newman (2007) indicam que cerca de 25% das prescrições dispensadas nos Estados Unidos durante os últimos 25 anos são relacionadas a medicamentos que contêm princípios ativos de origem natural ou semi-sintética, normalmente oriundos de plantas superiores; cerca de 13% relativas a

medicamentos de fontes microbianas e 2,7% de origem animal. Tais dados evidenciam claramente a importância contemporânea das substâncias naturais para a preservação da saúde e a cura de doenças e, conseqüentemente, estimulam as indústrias farmacêuticas e demonstram a importância das atividades desenvolvidas pelos químicos de produtos naturais, que se dedicam aos produtos naturais produzidos pelo metabolismo de organismos vivos, e pelos profissionais de áreas correlatas.

A variedade de padrões estruturais que se encontram nas distintas classes de produtos naturais como flavonóides, terpenos, isoflavonóides, lignanas, neolignanas, glicosídeos, cumarinas, cromonas, isocromonas, quinonas, alcalóides de diversas categorias, entre outros, atestam sua excepcional diversidade estrutural, fonte inesgotável de modelos originais de arquitetura molecular (SIMÕES et al., 2003; BUTLER, 2008; NIERO; MALHEIROS, 2009).

É expressivo o número de medicamentos disponíveis na terapêutica moderna desenvolvida a partir de plantas medicinais, como por exemplo: a escopolamina (antiespasmódico), quinina (antimalárico), eugenol (analgésico tópico), cafeína (estimulante do sistema nervoso central), azadiraquitina (fagorepelente), morfina (analgésico), a vincristina e vimblastina (antineoplásico). Em 2001 havia mais de 150 mil substâncias naturais conhecidas e novas estruturas estão sendo publicadas numa velocidade de cerca de 10 mil por ano (NIERO et al., 2003; GURIB-FAKIN, 2006). Considerando a importância dos estudos de plantas medicinais para a descoberta de novos fármacos e seu uso como fitoterápicos, e devido ao grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos é possível obter novas substâncias com propriedades terapêuticas proporcionando a população uma nova opção no tratamento de diversas enfermidades.

3.2 Gênero *Rapanea*

A família Myrsinaceae possui distribuição cosmopolita, sendo composta por cerca de 40 gêneros e 1400 espécies. No Brasil ocorrem oito gêneros e cerca de 70 espécies (SOUZA, 2005). Esta família é caracterizada pela presença de um grupo de ácidos terpeno-p-hidroxibenzoicos e um número de triterpenóides baseados nos esqueletos oleanano, ursano, damarano e cicloartano (HARDEN, 1990).

Morfologicamente o gênero *Rapanea* se apresenta como árvores de porte pequeno a médio, folhas simples alternadas no caule, encontradas perto das áreas litorâneas (LORENZI, 2000).

Há ainda grande divergência sobre o nome a ser utilizado para o principal gênero de Myrsinaceae do Brasil: *Myrsine* ou *Rapanea*, sendo aqui aplicado o nome *Rapanea*, que aparentemente tende a ter maior aceitação (SOUZA, 2005).

Rapanea ferruginea é uma espécie pantropical, encontrada na Bolívia, México, Argentina, Paraguai, Uruguai, e no Brasil, na Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Esta espécie, também conhecida por *Myrsine coriacea* (Figura 1), é popularmente conhecida por “copororoquina”, “canela-azeitona”, “azeitona-do-mato”, “capororocaçu”, “capororoca-vermelha”, “pororoca” e “capororoca-mirin” (SANCHOTENE, 1985; CARVALHO, 1994).

As árvores são de médio porte, de até 12 m de altura e 50 cm de diâmetro. Apresenta casca externa áspera, cinzento-rosada, e casca interna vermelha, com bolsas de resina. Suas folhas são simples, espiraladas, de ápice agudo, medindo de 1,5 a 3,5 cm de largura e 6,5 a 9 cm de comprimento (LORENZI, 1992).

A *R. ferruginea* é utilizada para a alimentação da fauna silvestre, alimentação humana (os frutos são usados como condimentos em vinagre), produção de carvão, construção civil, lenha, paisagismo e reflorestamento para recuperação ambiental (LORENZI, 2000).

O chá das folhas ou decocção da casca da planta é indicado como diurético, no combate às afecções das vias urinárias e também constitui um bom depurativo. Faz desaparecer as coceiras, erupções, urticárias, eczemas, reumatismo e afecções do fígado (LORENZI, 1992).

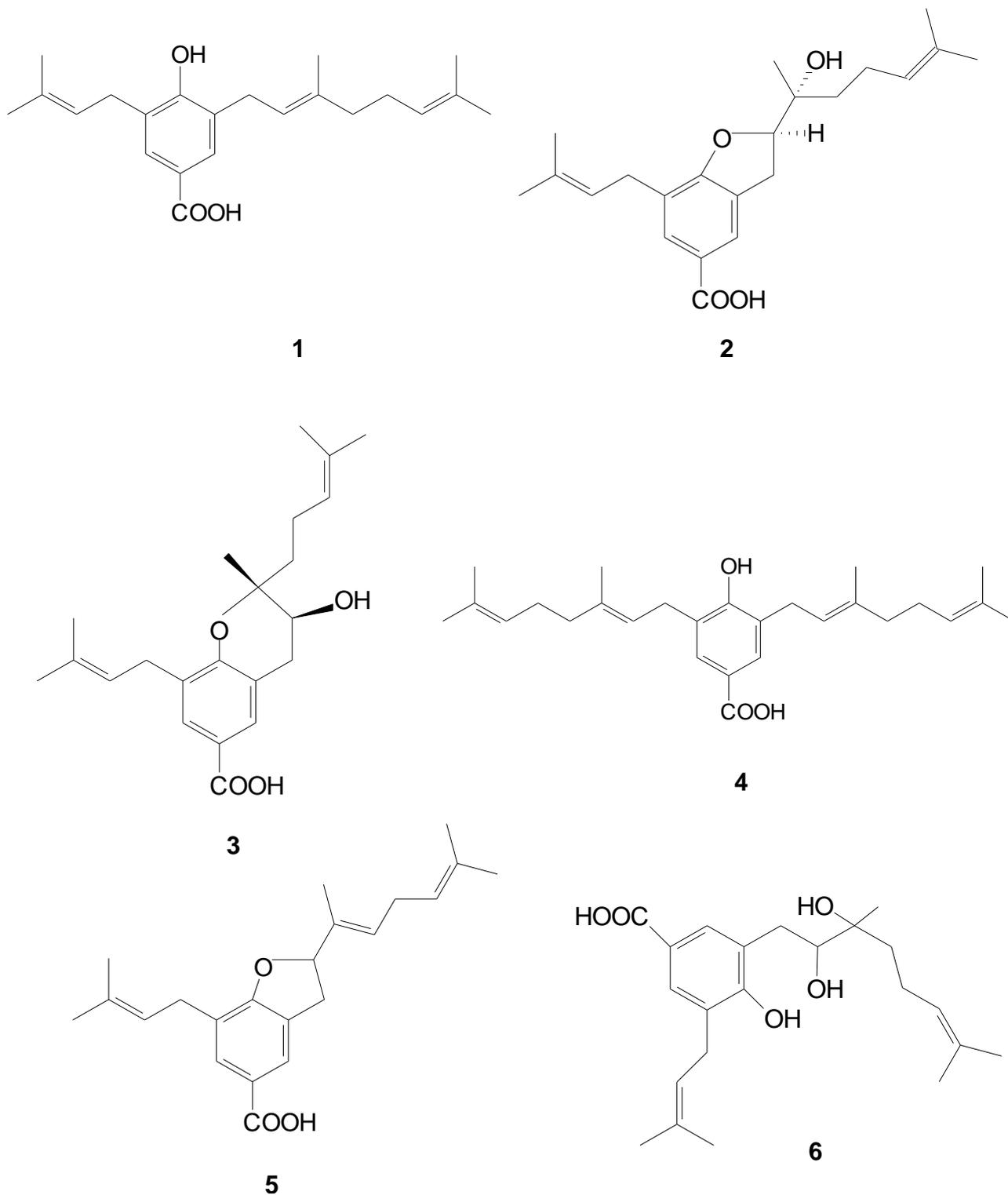


Figura 1: Foto da planta *R. ferruginea*: a) planta inteira b) folhas, frutos e sementes da *R. ferruginea*.

Fonte: Autor (2008)

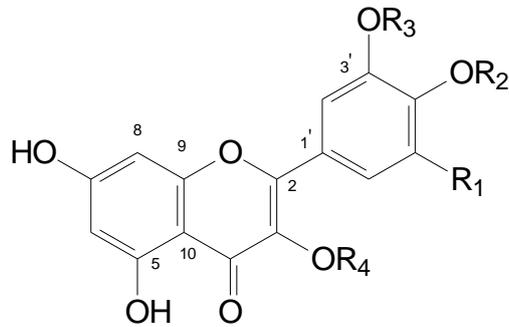
3.2.1 Aspectos Químico-Farmacológicos

Várias substâncias já foram isoladas de diversas espécies de *Rapanea*. De algumas já se sabe o efeito e a atividade biológica enquanto que, outras permanecem em estudos. Praticamente, quase todas as espécies de *Rapanea* possuem como princípio ativo os derivados de ácidos benzóico prenilados, Os primeiros dados de isolamento de substâncias desta classe são das folhas da *R. umbellata*. Foram identificados o ácido 3-geranil-4-hidroxi-5-(3"-metil-2"butenil) benzóico (1), 5-carboxi-2,3-dihidro-2-(1', 5'-dimetil-1'-hidroxi-4'hexenil)-7-(3"-metil-2"butenil)-benzofurano (2) , e 6-carboxi-8-(3"-metil-2"butenil)-3 α -hidroxi-2 α -metil-2-(4'-metilpent-3'-enil)-3,4-dihidrobenzopirano (3) que foram nomeados posteriormente como ácidos mirsinóicos A, B e C, respectivamente (JANUARIO et al., 1991, HIROTA et al., 2002). Estas substâncias, juntamente com os ácidos mirsinóicos E (ácido 3,5-digeranil-4-hidroxi)-benzóico (4) e F 5-carboxi-7-(3"-metil-2"butenil)-2-(1',5'-dimetilhex-1',4'-dienil)-2,3-dihidrobenzofurano (5) foram encontradas na *Myrsine seguini* e apresentaram atividade antiinflamatória (DONG et al., 1999; HIROTA et al., 2002; MAKABE et al., 2003. Das folhas da *R. myricoides* foram isolados o ácido mirsinóico B (AMB) (2) e o ácido- 3-(2',3'-dihidroxi-3',7'-dimetiloct-6'-enil)-4-hidroxi-5-(3"-metil-2"butenil)-benzóico, nomeado miricoidiol (6) (BLUNT; CHEN; WIEMER, 1998).



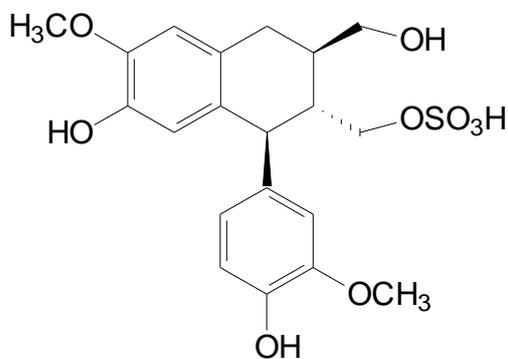
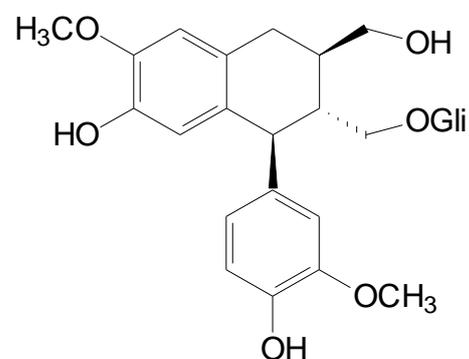
Os flavonóides são outra classe de metabólitos secundários presentes no gênero *Rapanea*. Das folhas da *Myrsine seguinii* foram isolados o 3-ramnosil-3'-glicosil-quercetina- (7), 4'-glicosil-quercetina (8), 3-ramnosil-3'-glicosil-miricetina (9)

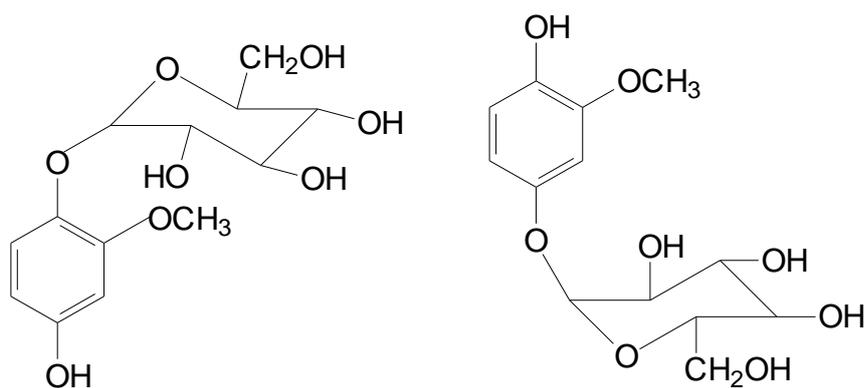
e 3,4'-di-ramnosil-miricetina (**10**) (ZHONG et al., 1997). Já nas folhas de *Myrsine africana* foram encontrados flavonóides com atividade antihelmíntica e antibacteriana, dentre eles a 3-(3",4"-diacetilramnosil)-miricetina (**11**) (AROT; MIDIWO; KRAUS, 1996).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
7	H	H	Glicosil	Ramnosil
8	OH	H	H	Ramnosil
9	OH	H	Glicosil	Ramnosil
10	OH	Ramnosil	H	Ramnosil
11	H	Ramnosil	H	H

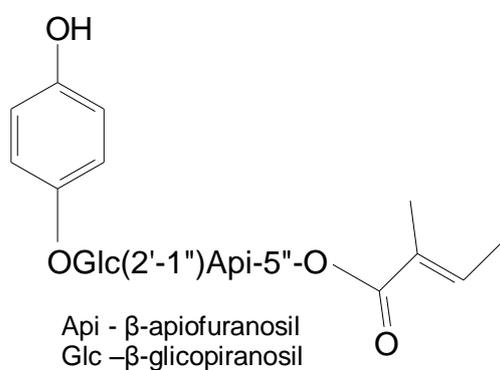
Também são encontrados outras classes de compostos aromáticos como o 3- α -O-sulfato-(+)-isolarisiresinol (**12**) e 3- α -O-glicopiranosil-(+)-isolarisiresinol (**13**), isolados das folhas da *Myrsine seguini* (ZHONG et al., 1998a; ZHONG et al., 1998b) e os glicosídeos fenólicos como o taquiosídeo (**14**) e o isotaquiosídeo (**15**), e as hidroquinonas seguinosídeos G (**16**) e K (**17**) (ZHONG et al., 1999).

**12****13**

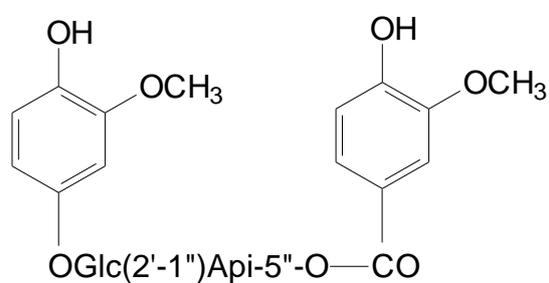


14

15

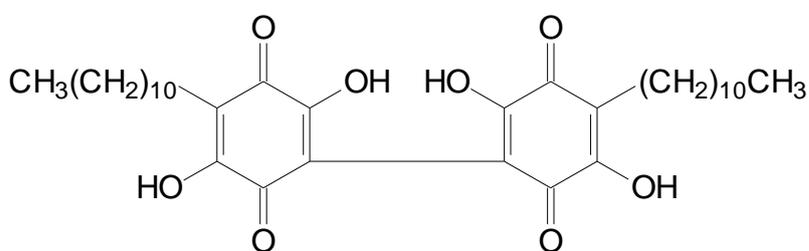


16

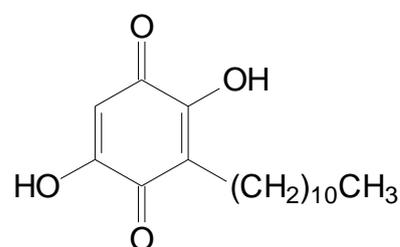


17

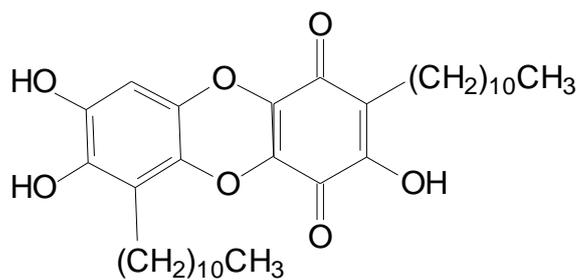
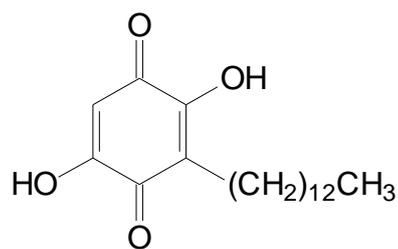
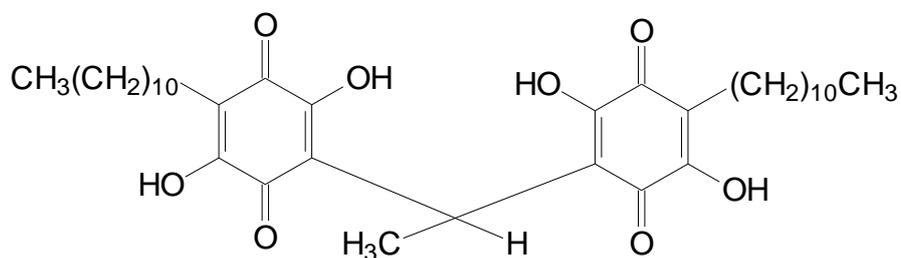
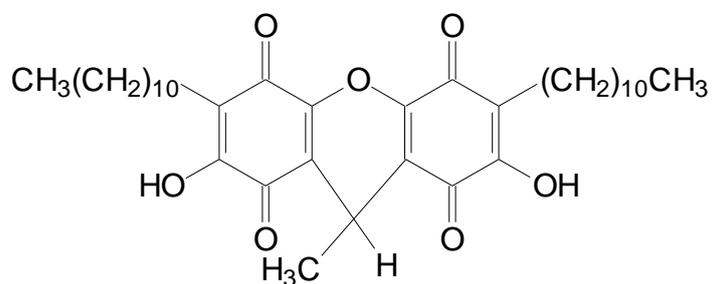
As benzoquinonas melanfolona (**18**), a mirsinona (**19**) e a mirsinaquinona (**20**) foram isoladas dos frutos da *R. melanopholoes* (MIDIWO; GHEBREMESKEL, 1993; MIDIWO et al., 1995). A rapanona (**21**) foi isolada da *Myrsine guianensis* e apresentou efeito antioxidante e antiinflamatório (OSPINA et al., 2001). Dos frutos da *Myrsine africana* foi possível isolar duas novas benzoquinonas, a metilvilangina (**22**) e a metilanidrovilangina (**23**) (MANGURO et al., 2003).



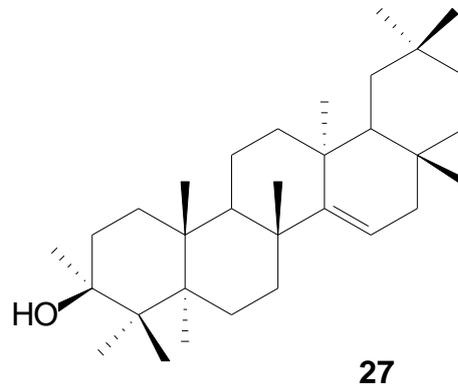
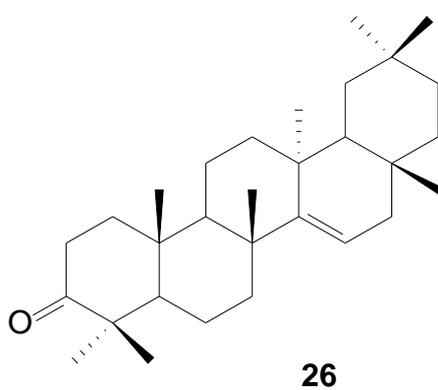
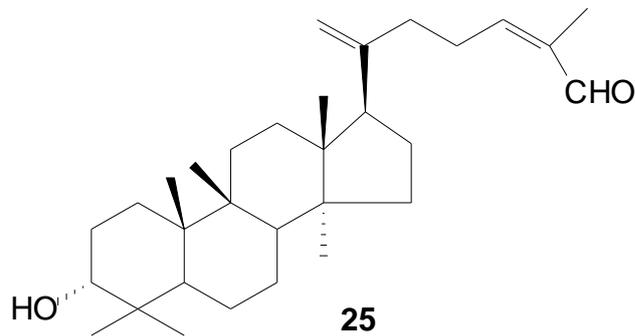
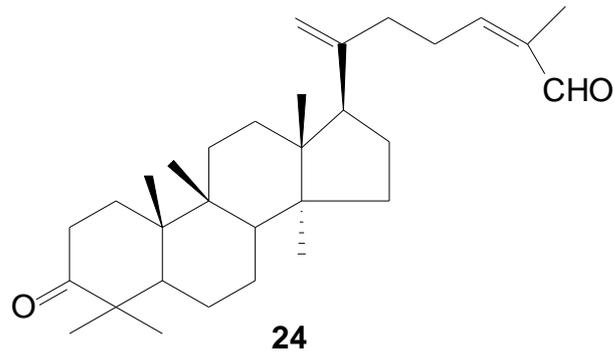
18



19

**20****21****22****23**

Alguns triterpenóides também foram encontrados em várias espécies de *Rapanea*, como exemplo os 24-(E)-3-oxo-damara-20,24-dien-26-al (**24**), 24-(E)-3 α -hidroxícicloart-24-en-26-al (**25**) (JANUÁRIO et al., 1992). Das folhas da *Myrsine africana* foram isolados dois triterpenóides a taraxerona (**26**) e o taraxerol (**27**) (MANGURO et al., 1997).



A *Myrsine africana* faz parte da composição de um licor medicinal usado para o tratamento de reumatismo, artrite reumática, injúria traumática entre outras doenças (FAMING ZHUANLI SHENQING GONGKAI SHUOMINGSHU, 2006). Já outras associações de plantas com *Myrsine africana* apresentaram efeito curativo na hiperplasia lobular, histeromiomas, cisto de ovário e infecções ginecológicas (FAMING ZHUANLI SHENQING GONGKAI SHUOMINGSHU, 2005).

Vários estudos estão sendo desenvolvidos por pesquisadores do NIQFAR/UNIVALI (Núcleo de Investigações Químico Farmacológicas/UNIVALI) com extratos da casca da *R. ferrugínea* e o ácido mirsinóico B (AMB). Inicialmente o

extrato das cascas da *R. ferruginea* apresentou atividade antinociceptiva e posteriormente o AMB também foi efetivo com relação a essa atividade em vários modelos de dor, interagindo com os sistemas adrenérgico, colinérgico, oxidonitrérgica e parcialmente com o sistema serotoninérgico (PEREIRA et al., 2004; HESS, 2006). Também foi observado que o AMB interage com as vias serotoninérgica, GABAérgica, oxidonitrérgica, colinérgica e via dos glicocorticóides endógenos exercendo uma ação antihipernociceptiva marcante quando administrada oralmente nos modelos de dor inflamatória induzida pela carragenina. O AMB também apresentou efeito antinociceptivo na dor neuropática causada pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos (ANTONIALLI, 2008), e na dor neuropática diabética (GALVAN, 2007), podendo constituir uma nova e atrativa alternativa para o tratamento da dor crônica. O extrato bruto da *R. ferruginea* e o AMB também foram avaliados quanto ao potencial anti-hiperglicemiante em animais diabéticos induzidos com aloxano, onde foi observado que o extrato da planta e o AMB diminuem a glicose plasmática de jejum (MATTOS, 2006; MONTEIRO et al., 2008).

3.3 Técnicas de isolamento e identificação de produtos naturais:

A preparação dos extratos brutos das plantas é uma etapa importante do isolamento e purificação das substâncias químicas. A escolha do solvente também é fundamental e de grande importância. Os solventes polares (metanol, etanol, acetato de etila) extraem mais facilmente da planta compostos polares e misturas de compostos de baixa polaridade. Porém, os solventes apolares (hexano) extraem da planta compostos mais apolares (QUOC-TUAN; BERNARD, 2004).

Entre as técnicas de extração encontra-se a maceração, que consiste em manter a planta em contato com o solvente apropriado por determinado período e após filtra-se e concentra-se o extrato. A melhor opção para que ocorra uma ótima extração das substâncias e para minimizar as decomposições, é utilizar solvente a frio. Este método não conduz a uma extração completa das substâncias, em virtude de se formar um equilíbrio entre a quantidade de substância dissolvida no solvente de extração e a que permanece no material a ser extraído. Este equilíbrio depende da planta que vai ser extraída, do grau de triturações, do solvente utilizado e do tempo de contato (HOSTETTMANN; MARSTON; HOSTETTMAN, 1997).

Já a percolação é um processo em que o solvente é obrigado a passar através do material a extrair. É mais rápida e dinâmica e necessita de menos quantidade de solvente do que a maceração. Existem dois tipos de percolação: a por gravidade e a vácuo. A percolação por gravidade tem como princípio a ação da gravidade que promove o deslocamento do solvente para baixo, no qual este é coletado em frações que posteriormente são analisadas. Na percolação a vácuo é aplicado na base da coluna o vácuo e devido a rapidez do método é possível utilizar sílica com menor tamanho de partículas (HOSTETTMANN; MARSTON; HOSTETTMAN, 1997).

Entre as técnicas de separação está a cromatografia. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. Ela pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes e para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia em camada delgada (CCD), também é conhecida por cromatografia líquido-sólido. Seu desenvolvimento é por eluição e o mecanismo de separação por adsorção. Geralmente os adsorventes utilizados são a sílica, alumina, celulose e poliamida (COSTA NETO, 2004). Esta técnica é utilizada com maior frequência na análise vegetal, em virtude da simplicidade, rapidez, sensibilidade e pelo rigor do resultado; assim, algumas farmacopéias mais recentes empregam-na como processo habitual na identificação dos fármacos (COSTA, 2000).

A cromatografia em coluna (CC) é a mais utilizada com finalidades preparativas e sempre deve ser monitorada pela CCD. A separação ocorre entre duas fases, uma sólida e uma líquida, que são baseadas na capacidade de adsorção e solubilidade, onde o equilíbrio dinâmico é estabelecido entre a concentração do soluto nas duas fases. A mistura a ser separada é submetida a um sistema de polaridade (SKOOG, 2002). A sílica e a alumina estão entre os adsorventes mais empregados a esta técnica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O isolamento de compostos também pode ser realizado por Chromatotron. Esta técnica baseia-se no uso de uma placa circular de cromatografia em camada delgada e um motor inclinado o que permite mais eficiência na coleta dos compostos ou frações. O eluente é adicionado no centro da placa, capaz de liberar 1-10 mL/min e passar através da camada sob a influência da força centrífuga. Este método tem

sido aplicado na separação de vários produtos naturais, incluindo saponinas e flavonóides (HOSTETTMANN; MARSTON; HOSTETTMANN, 1997).

Posterior ao isolamento, a determinação estrutural dos constituintes isolados é realizada através da análise em espectroscopia de ultravioleta, infravermelho, ressonância magnética de hidrogênio e de carbono-13 e espectrometria de massas (QUOC-TUAN; BERNARD, 2004).

A espectroscopia de infravermelho (IV) é utilizada para identificação e comparação de substâncias orgânicas, verificação do grau de pureza e acompanhamento de reações (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994). O espectro de infravermelho de uma substância orgânica corresponde ao conjunto de bandas de absorção apresentadas pela amostra submetida à radiação infravermelha e estas bandas correspondem às mudanças na energia vibracional dos compostos orgânicos (SIMÕES et al., 2003). A interpretação do estado de absorção no infravermelho, é nos dias atuais, uma ferramenta essencial para a caracterização de grupamentos funcionais (COSTA NETO, 2004).

Já o fenômeno Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ocorre com átomos quando as seguintes condições são atendidas: o átomo possuir um valor de spin nuclear maior do que zero; o átomo, na molécula, estar sujeito a um campo magnético externo; o sistema ser irradiado com radiação eletromagnética; ter relação entre valores do spin nuclear, campo magnético externo e frequência de irradiação (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994).

Na Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H), cada hidrogênio eletronicamente distinto em uma molécula normalmente possui sua própria absorção. Um dos usos da RMN ^1H é encontrar quantos tipos de hidrogênios não equivalentes estão presentes. A maioria dos deslocamentos químicos de hidrogênio esta dentro da faixa de 0 a 12 ppm, a qual pode ser convenientemente dividida em cinco regiões: 1-2 ppm hidrogênios de ligações simples, 1,5-3 ppm hidrogênios vizinhos a insaturações, 3-5 ppm hidrogênios vizinhos a heteroátomos, 5-8 ppm hidrogênios de aromáticos e olefínicos, e 8-12 ppm hidrogênios de aldeídos e ácidos. As constantes de acoplamento (J) são medidas em Hertz e estão na faixa de 0 a 18 hertz (McMURRY, 2005). Três são as informações mais relevantes que o espectro de RMN ^1H fornece para fins de caracterização de cadeias hidrocarbônicas: o deslocamento químico, o desdobramento dos picos e a intensidade dos picos (COSTA NETO, 2004).

Na Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN¹³C) é possível identificar o número de diferentes átomos de carbono em uma molécula de estrutura desconhecida. A maioria dos sinais de RMN¹³C estão na faixa de zero a 220 ppm. O deslocamento químico de cada ressonância de carbono 13 depende do ambiente eletrônico do carbono na molécula (McMURRY, 2005).

Outra técnica de identificação é a Espectrometria de Massas (EM). Ela mede a massa molecular de uma molécula. Além disso, freqüentemente é possível obter informação estrutural a respeito de uma molécula pela medida das massas dos fragmentos produzidos quando as moléculas são fragmentadas (McMURRY, 2005). A EM de baixa resolução é a mais usada e a mais comum. Os principais elementos fornecidos pelo espectro para caracterização de uma molécula são, a massa da molécula (massa molecular), o pico-base e a massa de fragmentos iônicos. Quanto mais estável for um fragmento maior será a probabilidade de ele se formar (COSTA NETO, 2004).

A espectroscopia de RMN, complementa a EM e a espectroscopia na região do infravermelho, fornecendo um “mapa” do esqueleto carbono-hidrogênio de uma molécula orgânica. Juntas, as três técnicas possibilitam a determinação das estruturas de moléculas muito complexas (McMURRY, 2005).

3.4 Inibidores da AChE e Doença de Alzheimer

O neurologista alemão Alois Alzheimer, em 1907, diagnosticou pela primeira vez um quadro de demência progressiva em uma mulher de 51 anos que já sofria com os sintomas há quatro anos e meio. Em 1910, Kraepelin veio a denominar o quadro clínico como Doença de Alzheimer (DA) (FREITAS, 2002).

A DA é a demência mais comum que acometem idosos, sendo uma desordem neurodegenerativa crônica e progressiva caracterizada por múltiplos distúrbios corticais incluindo: memória, julgamento, orientação, compreensão, aprendizagem e linguagem. O processo de neurodegeneração na DA é irreversível com perda de memória seguida de completa demência (figura 2) (FILLEY, 1995; BROOKMEYER; GRAY; KAWAS, 1998). A DA é responsável por 50-60% do número total de casos de demência dentre as pessoas acima de 65 anos. Esta patologia afeta cerca de 1,5% da população em idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 e

39% acima dos 90 anos, acometendo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo mundo (FRAGA et al., 2004).

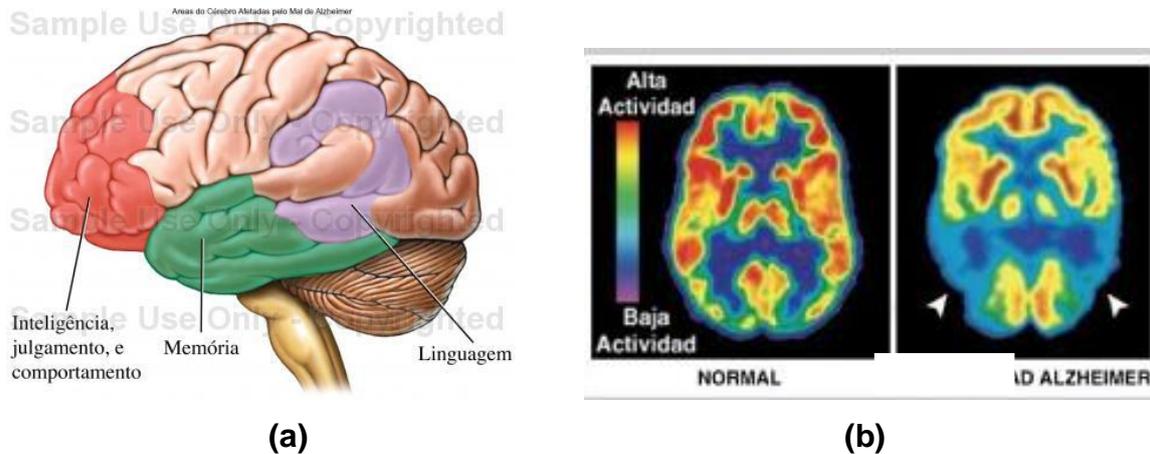


Figura 2: (a) Áreas do cérebro responsáveis pelas funções cognitivas. (b) Tomografia por emissão de pósitrons mostrando a diferença de um cérebro normal com o cérebro de uma pessoa portadora de Alzheimer.

Fonte: <http://www.neuropatologia.pt>; <http://www.ebscostandard.smartimagebase.com>

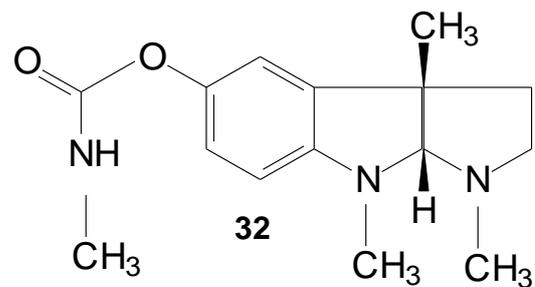
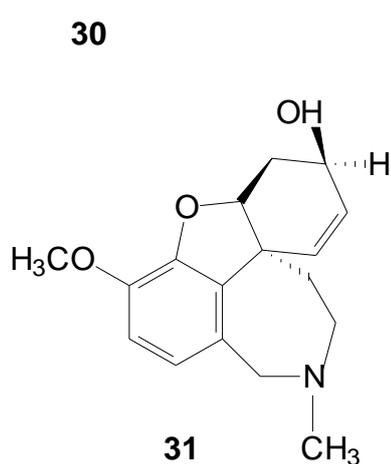
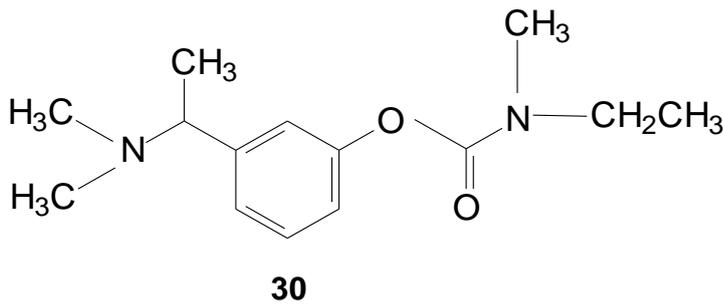
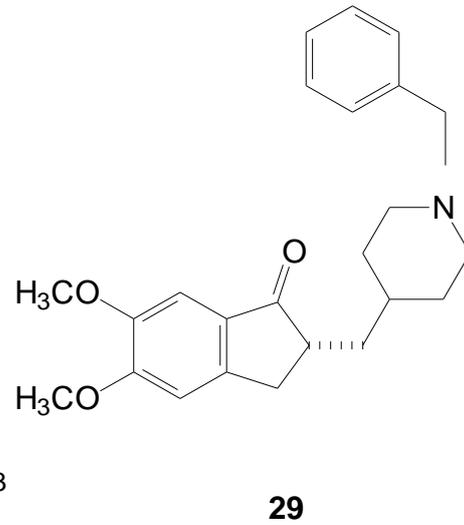
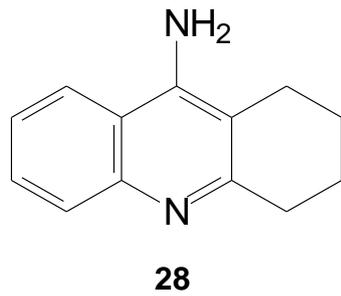
A DA tem sido associada a uma série de alterações genéticas neuropatológicas e neurofisiológicas (ALMEIDA, 1997). As anormalidades nos sistemas cerebrais que utilizam acetilcolina são consideradas características da doença e incluem: (1) redução desproporcionalmente grande na quantidade de acetilcolina, (2) redução de colina-acetiltransferase, enzima envolvida na síntese da acetilcolina (KATZMAN, 1986; NORDBERG, CARLSON, WINBLAD, 1992), (3) degeneração do núcleo basal de Meynert (WHITEHOUSE et al., 1982; COYLE, PRICE, DELONG, 1983), (4) alteração no número e sensibilidade de receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais e (5) sensibilidade aumentada aos efeitos de drogas anticolinérgicas como a escopolamina (NEWHOUSE, 1997; SCHRODER, WEVERS, 1998). Além disso, ocorre comprometimento na expressão do RNA mensageiro de receptores nicotínicos de neurônios contendo a forma hiperfosforilada da proteína 'tau', sugerindo que as disfunções no sistema de transporte intracelular típicas da DA interferem na formação de receptores colinérgicos (SCHRODER, WEVERS, 1998).

Morfologicamente encontram-se nos neurônios dos portadores da DA, um depósito de proteína β -amilóide de forma mais exacerbada do que em idosos na mesma faixa etária, livres da doença. O papel do depósito da proteína β -amilóide ($A\beta$) no cérebro como um fator que provocaria a DA teve sua sustentação científica

crescente depois de sua descoberta por Glenner em 1984. O depósito de A β é considerado o primeiro evento da DA. Entretanto, placas contendo formas agregadas de fragmentos A β podem ser encontradas no córtex normal de pessoas idosas, pois o depósito de A β no cérebro é uma consequência inevitável da idade. Assim, foi observado que uma fração significativa da população idosa deve apresentar essas placas niveladas na ausência de manifestações de demência, sendo discutida a idéia de que depósito amilóide é somente um dos maiores entre os diversos fatores causadores da doença, embora ele certamente contribua para o seu mecanismo fisiopatológico (TERRY et al., 1987; GOATE et al., 1991; BRAAK; BRAAK, 1999; NEVE; McPHIE, 2000; RANG et al., 2003).

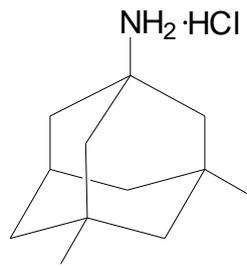
O quadro de sinais e sintomas dessa doença está associado à redução de neurotransmissores cerebrais, como acetilcolina (ACh), noradrenalina e serotonina. O tratamento sintomático da DA envolve primeiramente a restauração da função colinérgica (PERRY, 1986) e posteriormente a restauração de outros processos neurológicos mediados por outros sistemas de neurotransmissão. Sugere-se, portanto que uma elevação no nível de ACh poderia ser útil para melhorar um dos sinais da doença, a deficiência na aprendizagem. Sendo assim os inibidores da enzima AChE a qual promove a degradação da acetilcolina, tem demonstrado maior eficiência no tratamento clínico da doença (BIERER et al., 1995; TREVISAN; MACEDO, 2003).

Um dos primeiros fármacos sintéticos, utilizados para o tratamento da DA foi a tacrina (**28**), mas devido ao elevado risco de hepatotoxicidade, com o tempo caiu em desuso. Além deste fármaco, existe a donepezil (**29**), a rivastigmina (**30**) e a galantamina (**31**) (PENG, 1995) que continuam sendo usadas para o tratamento da DA. A galantamina é um alcalóide isolado de plantas da família Amaryllidaceae (*Galanthus nivalis*) na qual apresenta uma longa ação seletiva, reversível e competitiva para inibir a AChE. Seus efeitos terapêuticos permanecem mesmo após o término do tratamento. Ela é considerada mais efetiva no tratamento de DA que a fisostigmina (**32**) e a tacrina (**28**) (INGKANINAN et al., 2000; RHEE et al., 2001). A galantamina atua ligando-se ao sítio ativo da AChE cerebral e ainda estimula os receptores nicotínicos pré e pós sinápticos os quais podem, então, aumentar a liberação de neurotransmissores como ACh e glutamato, estimulando diretamente a função neuronal (FENNELL; STADEN, 2001).

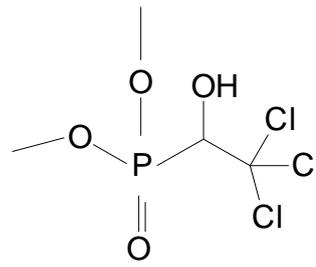


Outra substância utilizada no tratamento da DA foi o cloridrato de memantina (**33**), um antagonista não-competitivo com afinidade moderada pelo receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), agindo na diminuição da liberação de glutamato. Este fármaco foi recomendado para o tratamento das fases moderada a grave da DA. Inicialmente o cloridrato de memantina foi testado no tratamento da doença de Parkinson devido ao seu potencial efeito dopamimético, mais tarde revelou-se eficaz no tratamento da DA, embora tenha efeito relativamente discreto (WINBLAD; PORITIS, 1999; REISBERG et al., 2003; TARIOT et al., 2004; AREOSA et al., 2005, CHAVES et al., 2008).

Um estudo publicado por Becker e colaboradores (1998) mostrou a eficácia do metrifonato (**34**) no tratamento de pacientes com DA, mas devido a sua toxicidade os estudos clínicos foram descontinuados (FORLENZA, 2005).



33



34

Atualmente, é intensa a busca de novos inibidores de AChE em extratos de plantas (RHEE et al., 2001; TREVISAN; MACEDO, 2003; TREVISAN et al., 2006). Entre as famílias de plantas que estão sendo examinadas para a atividade inibitória da AChE encontram-se: Amarillidaceae (HOUGHTON et al. 2004, RHEE et al. 2004), Boraginaceae (AHMAD et al. 2003), Chenopodiaceae (FERHEEN et al. 2005), Lamiaceae (AHMAD et al. 2005), Liliaceae (ATTA-UR-RAHMAN et al. 2002), e Solanaceae (RODDICK 1989, CHOUDHARY et al. 2004).

A modernização dos ensaios permitiu a utilização de enzimas, receptores, DNA, entre outros alvos, para a avaliação rápida de grandes quantidades de amostras. Dentre os bioensaios rápidos e sensíveis, a avaliação da atividade da AChE é uma alternativa para a detecção e seleção de amostras com ação anticolinesterase (TREVISAN et al, 2003).

3.4 Técnicas para verificar a atividade da Acetilcolinesterase

A bioautografia é realizada como um teste preliminar para verificar se os extratos e substâncias isoladas de plantas apresentam atividade inibitória da AChE. Se o resultado apresentado na bioautografia for positivo, testes *in vitro* podem ser realizados, com o objetivo de definir o mecanismo de inibição enzimática e, posteriormente, comparação através de ensaios *in vivo*. Desta forma, é possível identificar as espécies vegetais e os compostos oriundos dessas espécies que são potencialmente ativos na inibição da AChE.

Os métodos bioautográficos são uma ferramenta muito utilizada para direcionar o isolamento de metabólitos secundários bioativos. Um dos métodos bioautográfico que permite avaliar a atividade antiacetilcolinesterase, fundamenta-se na desacetilação do acetato de 1-naftil para gerar o 1-naftol por ação da enzima acetilcolinesterase. O 1-naftol reage com o reativo *Fast Blue*, para produção de

coloração púrpura pela formação do corante azóico na placa cromatográfica (figura 3). Regiões contendo inibidores desta enzima apresentam manchas brancas contra o fundo púrpura (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002). Por ser a cromatografia em camada delgada uma técnica simples, rápida e de baixo custo, esta técnica é uma ferramenta bastante útil na localização da atividade em misturas complexas, como os extratos e fração obtidos de plantas.

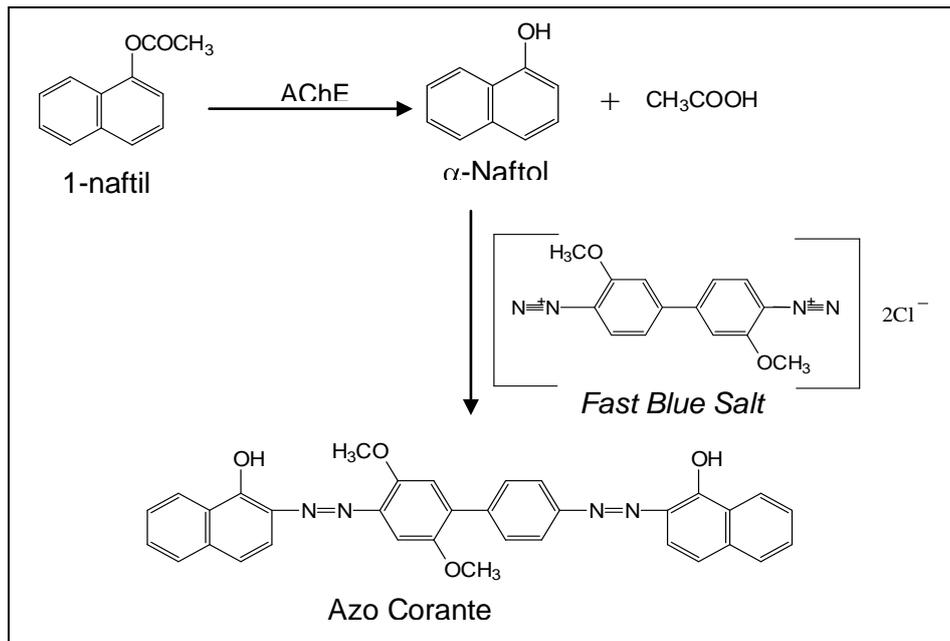


Figura 3: Esquema reacional para a formação de corante azo a partir do acetato de 1-naftil.

Fonte: Marston; Kissling; Hostettmann (2002).

Trevisan e Macedo (2003) descrevem o estudo de extratos (aquosos, hidroalcoólico, etanólico, metanólico, acetato de etila, clorofórmico e hexânico) de plantas pertencentes a vários gêneros e famílias (*Amburana*, *Anacardium*, *Auxemma*, *Bauhinia*, *Bowdichia*, *Cecropia*, *Cordia*, *Cróton*, *Datechampia*, *Egletes*, *Lippia*, *Lonchocarpus*, *Mimosa*, *Momordica*, *Paullinia*, *Philodendron*, *Plathymenia*, *Plathymiscium*, *Protium*, *Pterodon*, *Simarouba*, *Solanum*, *Triphasia*, *Vanilosmopsis*, *Verbezina*, *Vitex*) que poderiam inibir a atividade da enzima AChE. A tabela 1 mostra as plantas que obtiveram inibição da enzima AChE em ensaio com microplaca e CCD.

Tabela 1. Inibição da atividade da enzima AChE por extratos brutos de plantas ensaiados na microplaca (% de inibição) e CCD.

Plantas	Concentração extrato (mg / ml)	Microplacas (% inibição)	CCD
<i>Amburana cearensis</i> (casca do caule)	2,3	100	+
<i>Lippia sidoides</i> (folhas)	2,2	77	+
<i>Paullinia cupana</i>	1,5	65	+
<i>Plathymiscium floribundum</i> (cerne)	2,8	72	+
<i>Solanum asperum</i> (folhas)	1,4	60	+
<i>Triphasia trifolia</i> (folhas)	1,4	50	+
<i>Vanillosmopsis arborea</i>	1,2	50	+

TREVISAN; MACEDO, 2003

A atividade inibitória da AChE também pode ser avaliada pelo método espectrofotométrico de Ellman. Este método consiste na reação da acetilticolina na presença da acetilcolinesterase, resultando em acetato e tiocolina. É adicionado a tiocolina o ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) que formará um produto de coloração amarela. Quando a substância analisada inibe a AChE a tendência é diminuir a coloração amarela (figura 4) podendo ser verificado por espectroscopia de UV (PEREIRA; ADAMS; SILVA, 2004).

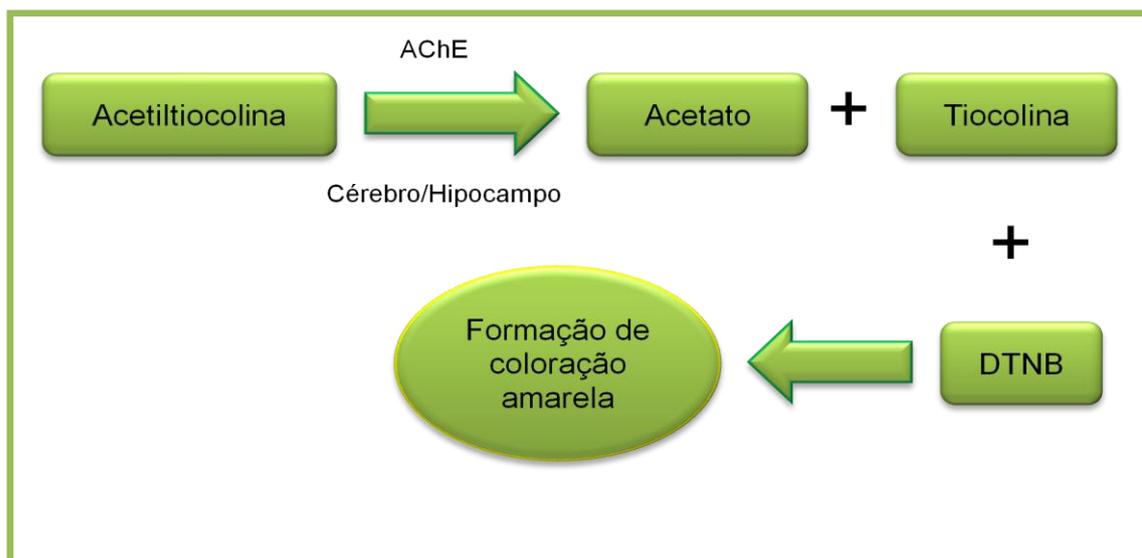


Figura 4: Esquema da reação *in vitro* segundo método de Ellman.

Fonte: Pereira; Adams; Silva (2004)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material:

4.1.1 *Material Vegetal:*

Os frutos, folhas e caules de *R. ferruginea* foram coletadas no início de julho de 2007 na cidade de Blumenau, rua Belo Horizonte - Santa Catarina. O material foi identificado pelo Prof. Oscar Benigno Iza (UNIVALI) e uma amostra da espécie foi depositada no Herbário Barbosa Rodrigues (HBR, Itajaí) e, posteriormente catalogada com o código HBR 52715.

4.1.2 *Material e Reagentes:*

O perfil cromatográfico por CCD dos extratos e compostos puros obtidos, foi realizado com placas de sílica gel 60 GF 254, de 20 µm de espessura preparados sobre folhas de alumínio da Merck. Utilizou-se vários sistemas de eluentes, dependendo da polaridade das amostras. Os reveladores químicos específicos empregados na CCD incluem o anisaldeído sulfúrico (identificação de terpenos e esteróides) e a solução de cloreto férrico a 3% em etanol (compostos fenólicos).

Foi utilizada como fase estacionária sílica gel 60 (Merck) de granulometria 70-230 mesh ($\phi = 0,063-0,20\text{mm}$). O diâmetro e altura das colunas foram escolhidos de acordo com a quantidade do material a ser cromatografado. A eluição foi realizada com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade. Os solventes utilizados foram hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e etanol (EtOH) provenientes dos Laboratórios Dinâmica, Quimex ou Vetec. As frações coletadas foram reunidas conforme as semelhanças de fator de retenção (R_f) identificadas na CCD.

Para análise de RMN ^1H e RMN ^{13}C foi utilizado solventes deuterados (acetona, clorofórmio e metanol), provenientes da Cambridge Isotope Laboratories Inc.

Além dos reagentes citados acima, foram utilizados acetona, clorofórmio, éter, metanol (MeOH), diclorometano (DCM) e sulfato de sódio, provenientes dos Laboratórios Dinâmica, Quimex e Vetec.

4.1.3 Equipamentos:

Para visualização da fluorescência dos compostos rastreados por CCD, foi utilizada radiação ultravioleta Minerallight ($\lambda = 254$ e 366nm).

Os espectros de IV foram obtidos através de espectrofotômetro Perkin-elmer FT-16-PC em pastilha de KBr. A referência utilizada foi absorção em 1028 cm^{-1} de um filme de poliestireno.

Os espectros de RMN¹H e RMN¹³C foram realizados em espectrômetro BRUKER AC-300F 300 MHz; tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Os deslocamentos químicos foram registrados em valores adimensionais δ (ppm).

Os extratos foram concentrados em rotavapor TECNAL TE-2II com controle de temperatura, e pesados em balança analítica SHIMADZU LIBROR-AEG-220 e SHIMADZU LIBROR EB-33OD.

Para isolamento de algumas substâncias foi utilizado sistema de cromatografia sob força centrífuga (Cromatotron) HARRISON HR 5101.

4.2 Métodos:

4.2.1 Obtenção dos extratos:

Os frutos (276,9 g), folhas (113,6 g) e caules (843,6 g) da *Rapanea ferrugínea* foram secos, moídos e posteriormente submetidos separadamente a um processo de extração exaustiva com etanol (EtOH) durante 7 dias (figura 5). Após filtração, o solvente (EtOH) foi removido por destilação em evaporador rotatório sob pressão reduzida (figura 6), para obtenção dos respectivos extratos (frutos 8,38 g, folhas 7,54 g e caules 8,48 g). Após, os extratos passaram por um particionamento por CC para obtenção das frações semi-purificadas (NIERO et al., 2003).

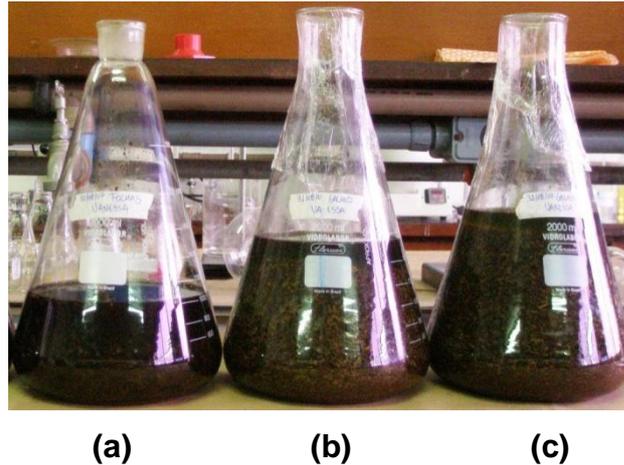


Figura 5: Folhas (a), caules (b) e frutos (c) de *R. ferruginea* em processo de maceração.

Fonte: Autor (2008)



Figura 6: Evaporador rotatório sob pressão reduzida concentrando a amostra.

Fonte: Autor (2008)

4.2.2 Isolamento de metabólitos secundários no extrato de folhas e caules

Os extratos brutos das folhas e caules após evaporação do solvente, foram reunidos por apresentarem um perfil cromatográfico semelhante quando observados por CCD. O extrato (folhas/caules 16 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária sílica gel (248,45 g, Ø_{int} 5,4cm). Esta coluna foi denominada COLUNA 1A (figura 7). Iniciou-se a eluição com hexano (H) 100%, posteriormente utilizou misturas de Hex e AcOEt aumentando gradativamente a polaridade e finalizando com EtOH 100%. Foram coletadas 74 frações. O volume de cada fração variou de 100 a 20 mL. As frações 29 e 30 (15 mg) eluídas com Hex:AcOEt (6:4) foram reunidas por apresentarem perfil semelhante por CCD, e

após lavagens com H:acetona (8:2) apresentaram uma única mancha quando revelada com anisaldeído sulfúrico. Esta junção foi denominada RF1A e apresentou-se como um sólido branco solúvel em acetona. Esta foi encaminhada a IV e RMN para elucidação de sua estrutura.

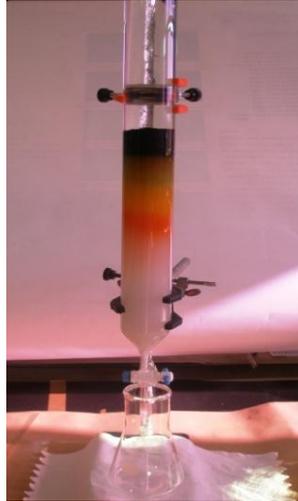


Figura 7: Cromatografia em coluna do extrato bruto das folhas e caules de *R. ferruginea* (coluna 1A).

Fonte: Autor (2008)

Utilizou-se a fração 31-40 (4,43 g) obtida da coluna 1A para uma nova CC de sílica gel (76,07 g, \varnothing_{int} 3,5 cm), denominada COLUNA 2A (figura 8). Iniciou-se a eluição com H 100%, posteriormente utilizou misturas de Hex e AcOEt aumentando gradativamente a polaridade e finalizando com EtOH 100%. Foram coletadas 187 frações de aproximadamente 50 mL cada. Da junção das frações 161-175 (17,4 mg) eluídas com DCM:ETOH (9:1) obteve-se uma única mancha na CCD quando revelada com anisaldeído sulfúrico. Esta substância foi denominada RF2A e apresentou-se como um sólido amorfo solúvel em acetona. A substância foi encaminhada a IV e RMN para elucidação de sua estrutura.



Figura 8: Cromatografia em coluna (coluna 2A).
Fonte: Autor (2008)

A fração 38-46 (0,295g) obtida da coluna 2A foi submetida a CC de sílica gel (27,07 g, \O_{int} 2,5 cm). Esta foi denominada COLUNA 3A (figura 9). Iniciou-se a eluição com Hex, posteriormente utilizou misturas de Hex e AcOEt aumentando gradativamente a polaridade e finalizando com EtOH 100%. Foram coletadas 86 frações de aproximadamente 20 mL cada. Da fração 29 e 30 (8 mg), eluída com Hex:AcOEt (6,5:3,5), obteve-se uma única mancha na CCD quando revelada com anisaldeído sulfúrico. Esta foi denominada RF3A apresentou-se como um sólido branco sendo solúvel em acetona e diclorometano. A substância foi encaminhada a IV e RMN para elucidação de sua estrutura.



Figura 9: Cromatografia em coluna (coluna 3A)
Fonte: Autor (2008)

A fração 31-35 (56 mg) proveniente da coluna 3A foi submetida a cromatotron para purificação de composto e foram coletadas 68 frações (figura 10). A fração 14-27 eluída com Hex:AcOEt (80:20) apresentou uma única mancha por CCD quando revelado com anisaldeído sulfúrico, está foi denominada RF4A e apresentou-se como um cristal sendo solúvel em acetona. A substância foi encaminhada a IV e RMN para elucidação de sua estrutura.

A fração 59-90 (175,5 mg) proveniente da coluna 2A, também foi submetida a cromatotron e foram coletadas 89 frações. A fração 27-28 (20,5 mg) eluída com HEX:AcOEt (60:40) foi denominada RF5A e apresentou-se como um sólido amorfo solúvel em acetona, a fração 36-38 (4,5 mg) eluída com H:AcOEt (50:50) foi denominada RF6A e apresentou-se como cristais solúveis em acetona. As substâncias foram encaminhadas a IV e RMN para elucidação de suas estruturas.



Figura 10: Equipamento Cromatotron.
Fonte: Autor (2008)

A fração 41-49 (900 mg) obtida da coluna 1A, foi submetida a CC de sílica gel (45,83 g, \varnothing_{int} 3,0 cm), denominada COLUNA 4A (figura 11). Esta foi eluída inicialmente com Hex, posteriormente utilizou misturas de Hex e AcOEt aumentando gradativamente a polaridade e finalizando com EtOH 100%. Foram coletadas 203 frações de aproximadamente 20 mL cada. Na fração 50-61 (9 mg), eluída com Hex:AcOEt (7:3), foi purificado o composto RF7A e apresentou-se como um sólido amarelo sendo solúvel em acetona e DCM. A substância foi encaminhada a IV e RMN para elucidação de sua estrutura.



Figura 11: Cromatografia em coluna (coluna 4A).
Fonte: Autor (2008)

A fração 55-69 (1,96 g) proveniente da coluna 1A, foi submetida a CC de sílica gel (78,23 g, \varnothing_{int} 3,5 cm), denominada COLUNA 5A (figura 12). Iniciou-se a eluição com Hex 100%, posteriormente utilizou misturas de Hex e AcOEt aumentando gradativamente a polaridade e finalizando com EtOH 100%. Foram coletadas 163 frações de aproximadamente 20 mL cada. Nas frações 122 (8 mg) e 139-142 (8,2 mg) eluídas com DCM:ETOH (9:1), foram purificados os compostos RF8A que apresentou-se como um sólido amarelo solúvel em acetona e RF9A, este apresentando-se como um sólido branco solúvel em acetona respectivamente. As substâncias foram encaminhadas a IV e RMN para elucidação de suas estruturas.



Figura 12: Cromatografia em coluna (coluna 5A).
Fonte: Autor (2008)

Na figura 13 está apresentado o fluxograma dos procedimentos cromatográficos realizados com o extrato das folhas e caules de *R. ferruginea*.

4.2.2 Isolamento de metabólitos secundários do extrato bruto dos frutos

O extrato etanólico dos frutos (7,5 g) foi submetido à cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica gel (49,3 g, \varnothing_{int} 2,5cm). Esta foi denominada COLUNA 1B. Iniciou-se a eluição com Hex 100%, posteriormente utilizou misturas de Hex e AcOEt aumentando gradativamente a polaridade e finalizando com EtOH 100%. Foram coletadas 221 frações de aproximadamente 20 mL cada. Nas frações 50-52 (918 mg), 95-101 (13,2 mg) e 194-195 (48,3 mg) eluídas com Hex:AcOEt (7:3), foram purificados os compostos previamente identificados como RF1B, RF2B e RF3B respectivamente. A substância RF1B que apresentou-se como um óleo amarelo sendo solúvel em acetona e diclorometano, a RF2B que apresentou-se como um sólido branco solúvel em acetona e RF3B que apresentou-se como um sólido amarelo solúvel em acetona foram encaminhadas a IV e RMN para elucidação de suas estruturas.

A fração 22-36 (785 mg) obtida da coluna 1B foi submetida a uma nova CC de sílica gel (19,0495 g, \varnothing_{int} 1,5 cm), denominada COLUNA 2B (figura 14). Iniciou-se a eluição com Hex 100%, posteriormente utilizou misturas de Hex e AcOEt aumentando gradativamente a polaridade e finalizando com EtOH 100%. Foram coletadas 99 frações de aproximadamente 20 mL cada. Nas frações 54-64 (22,5 mg) e 99 (42,3 mg) foram purificados, respectivamente os compostos previamente identificados como RF4B que apresentou-se como um sólido amorfo solúvel em acetona e RF5B que apresentou-se como um sólido amarelo solúvel em acetona. As substâncias foram encaminhadas a IV e RMN para elucidação de sua estrutura



Figura 14: Cromatografia em coluna (coluna 3B)

Fonte: Autor (2008)

A fração 110-179 (300 mg) obtida da coluna 1B foi submetida a uma nova CC de sílica gel (71,6873 g, \varnothing_{int} 9,5 cm), denominada COLUNA 4B (figura 15). Iniciou-se a eluição com Hex 100%, posteriormente utilizou misturas de Hex e AcOEt aumentando gradativamente a polaridade e finalizando com EtOH 100%. Foram coletadas 137 frações de aproximadamente 20 mL cada. Na fração 5-10 (3,2 mg) eluída com Hex:AcOEt (9,5:0,5) e 133 (5,0 mg) eluída com AcOEt:MeOH (9:1), foram purificadas as substâncias previamente identificadas como RF6B que apresentou-se como um óleo solúvel em acetona e RF7B que apresentou-se como um sólido amorfo sendo solúvel em acetona e diclorometano. VER CADERNO EXPERIMENTO As substâncias foram encaminhadas a IV e RMN para elucidação de sua estrutura.



Figura 15: Cromatografia em coluna (coluna 4B)
Fonte: Autor

As frações 180-206 (837,60 mg) e 207-221 (1,85 g) da coluna 1B foram submetidas a colunas cromatográficas das quais não foi possível a purificação de nenhuma substância.

Na figura 16 está o fluxograma com os procedimentos cromatográficos realizados com o extrato dos frutos de *R. ferruginea*.

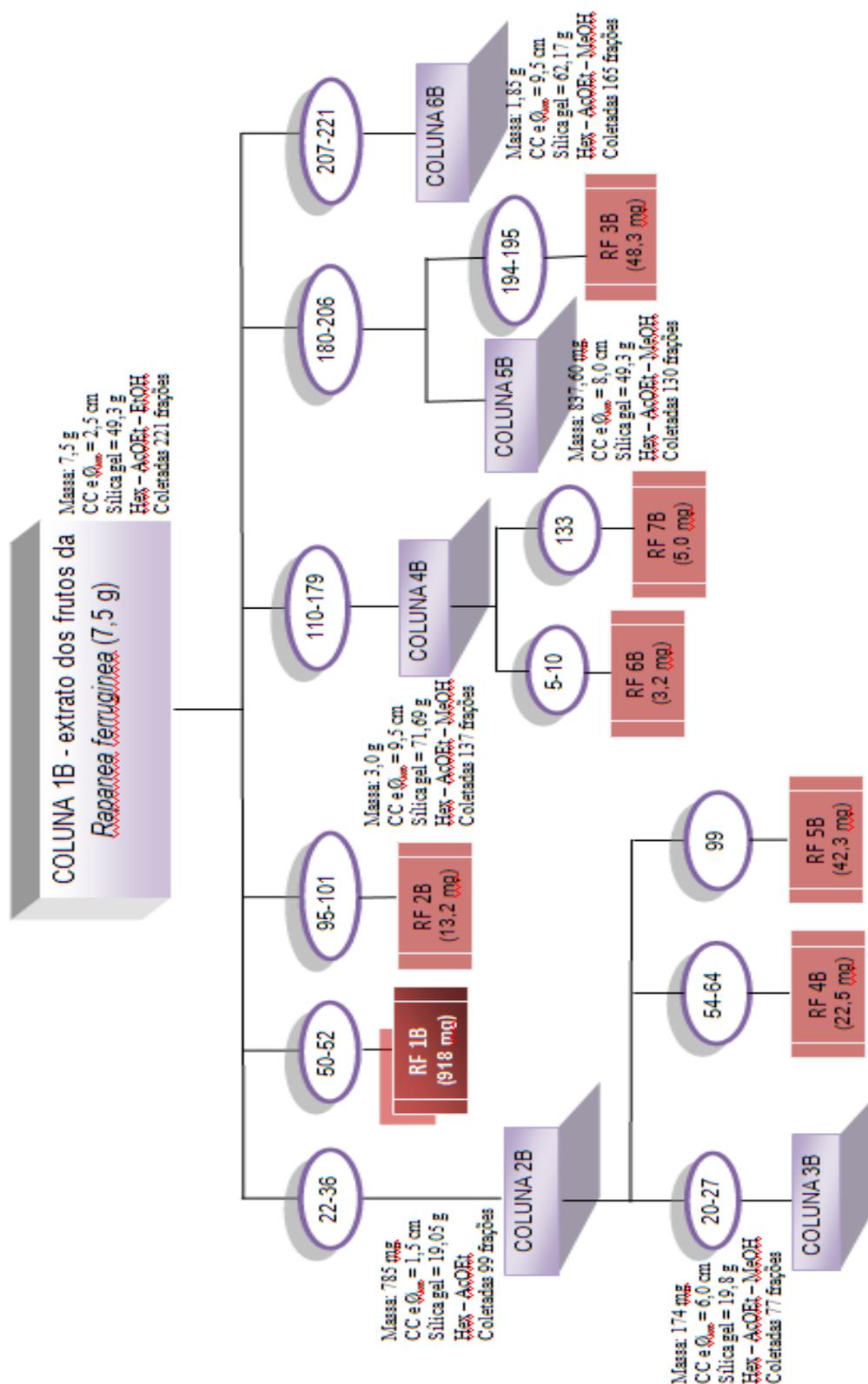


Figura 16: Fluxograma com os procedimentos cromatográficos realizados com o extrato dos frutos da *Rapanea ferruginea*.

Fonte: Autor (2008)

4.2.3 Ensaio Bioautográfico

O ensaio bioautográfico foi realizado conforme Marston, Kissling e Hostettmann (2002) com algumas modificações. As amostras dos materiais vegetais (extratos e substâncias isoladas) foram solubilizadas em solvente apropriado, aplicadas na placa cromatográfica e eluídas em mistura de solvente. Após migração das amostras a placa foi submetida à secagem com auxílio de secador. Posteriormente foi borrifada com a solução da enzima purificada (1052 UI) em tris-hidroximetilaminometano (pH 7,8; 0,05 M) e submetida novamente à secagem. Para incubação da enzima, a placa foi transferida para um tanque contendo água (sem tocar a placa) mantendo a umidade atmosférica na temperatura máxima de 37°C em estufa durante 20 minutos. Para a detecção da inibição enzimática, após os 20 minutos a placa foi borrifada com uma solução contendo acetato de 1-naftil e sal *fast blue B* promovendo a formação de coloração púrpura após 2 minutos em toda a placa cromatográfica. A atividade anticolinesterásica foi determinada pelo aparecimento de manchas brancas após 5 minutos

Foram utilizadas 80µg e 40 µg para folhas/caules. Para as substâncias ácido mirsinóico A (AMA) e ácido mirsinóico B (AMB) foram utilizadas 60 µg, 40 µg, 20 µg, 16 µg, 12 µg, 8 µg, 6 µg, 4 µg e 2 µg. Para o espinasterol foi utilizada 15 µg, 9 µg, 4 µg, 3,2 µg, 2,4 µg, 1,6 µg, 1,2 µg, 0,8 µg e 0,4 µg. Os extratos das folhas/caules e frutos e as substâncias AMA, AMB e espinasterol foram diluídas com diclorometano.

4.2.4 Ensaio “in vitro”

4.2.4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (250 a 300g), obtidos do Biotério Central da Univali, e mantidos no biotério da farmacologia experimental, com ciclo claro/escuro de 12 horas e aclimatados a temperatura de 22 ± 2° C. Os animais foram tratados com água e ração *ad libitum*, exceto durante os experimentos. Para o processo de adaptação, os animais permaneceram no ambiente de teste 1h antes da realização dos experimentos. Os protocolos experimentais foram apresentados ao Comitê de ética em Pesquisa da Instituição, e os experimentos foram realizados mediante aprovação 126/2008.

4.2.4.2 Preparação do material enzimático

Foram utilizados dez animais para a preparação de cada amostra: cérebro total e hipocampo. Os animais foram anestesiados com éter e decapitados com guilhotina. O cérebro total foi dissecado, pesado e homogeneizado em 10 volumes de Tris-HCl 10 mM, pH 7,2 contendo sacarose 160 mM. O homogeneizado foi submetido à centrifugação (1.000 g/10 min, à 4°C). O sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C até o momento dos ensaios enzimáticos. O mesmo protocolo foi seguido para a preparação do hipocampo onde este foi homogeneizado em 20 volumes do tampão Tris-HCl 10 mM. O homogeneizado foi submetido à centrifugação (1.000 g/15 min, 4°C) e o sobrenadante obtido armazenado a -20°C até o momento dos ensaios enzimáticos (PEREIRA; ADAMS; SILVA, 2004).

4.2.4.3 Ensaio Enzimático

As atividades específicas da AChE de cérebro total e hipocampo foram determinadas pelo método espectrofotométrico de Ellman et al. (1961), modificado por Pereira, Adams e Silva (2004). O meio de análise continha 50 µL de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 1mM, tampão fosfato de potássio 24 mM, pH 7,2, 50 µL de material enzimático (amostra de cérebro ou hipocampo) e a amostra em análise. Após 2 min de pré-incubação foi adicionado 25 µL de acetilticolina 0,8 mM (substrato) e monitorado durante 2 minutos a 412 nm em espectrofotômetro. A atividade da AChE foi expressa em µmol de acetilticolina hidrolisada por hora por mg de proteína (PEREIRA; ADAMS; SILVA, 2004).

4.2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do teste T, com auxílio do programa Graph Pad InStat 3.01. Valores correspondendo a $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média.

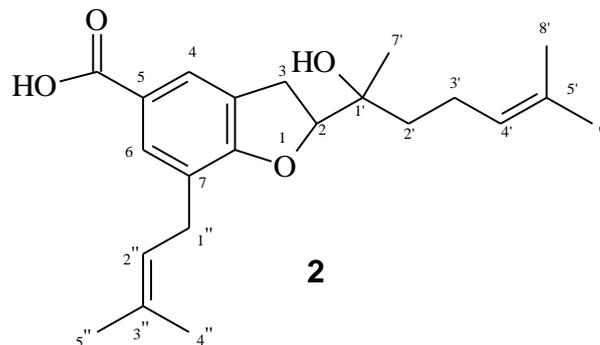
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação das substâncias isoladas das folhas e caules da *R. ferruginea*

O gênero *Rapanea* tem sido estudado fitoquimicamente apresentando trabalhos de isolamento e identificação de vários ácidos benzóicos prenilados, benzoquinonas, flavonóides, triterpenóides e glicosídeos fenólicos, porém as folhas/caules e frutos da espécie *R. ferruginea* estão sendo estudadas pela primeira vez tanto no aspecto fitoquímico quanto farmacológico.

5.1.1 Identificação da substância RF1A

O composto RF1A (15 mg) foi isolado por CC do extrato bruto das folhas e caules da *R. ferruginea*. Este composto apresentou-se como um sólido branco, solúvel em acetona, com ponto de fusão 119-121 °C. Sua estrutura foi confirmada através das análises espectroscópicas de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C como o ácido benzóico prenilado 5-carboxi-2,3-dihidro-2-(1', 5'-dimetil-1'-hidroxi-4'hexenil)-7-(3"-metil-2"butenil) benzofurano chamado de ácido mirsinóico B (AMB) (**2**). Entre os estudos realizados anteriormente pode-se destacar o isolamento do AMB do extrato das cascas *R. ferruginea* sendo este um dos compostos majoritários presentes neste extrato (TURMINA, 2005).



O espectro no IV (figura 17) apresentou uma banda de absorção com intensidade máxima em 3418 cm⁻¹ referente à deformação axial do grupamento OH, atribuída ao álcool. Sobreposta a esta, está presente uma banda bastante alargada, caracterizada pela deformação axial do grupamento OH de ácido (3500–2700 cm⁻¹)

que juntamente com o estiramento em 1670 cm^{-1} , referente a carbonila, caracteriza o grupamento ácido. As conjugações observadas na estrutura diminuem a frequência de estiramento da carbonila. Em 1605 cm^{-1} observou-se deformação axial de C=C e em 1194 cm^{-1} deformação axial de C-O.

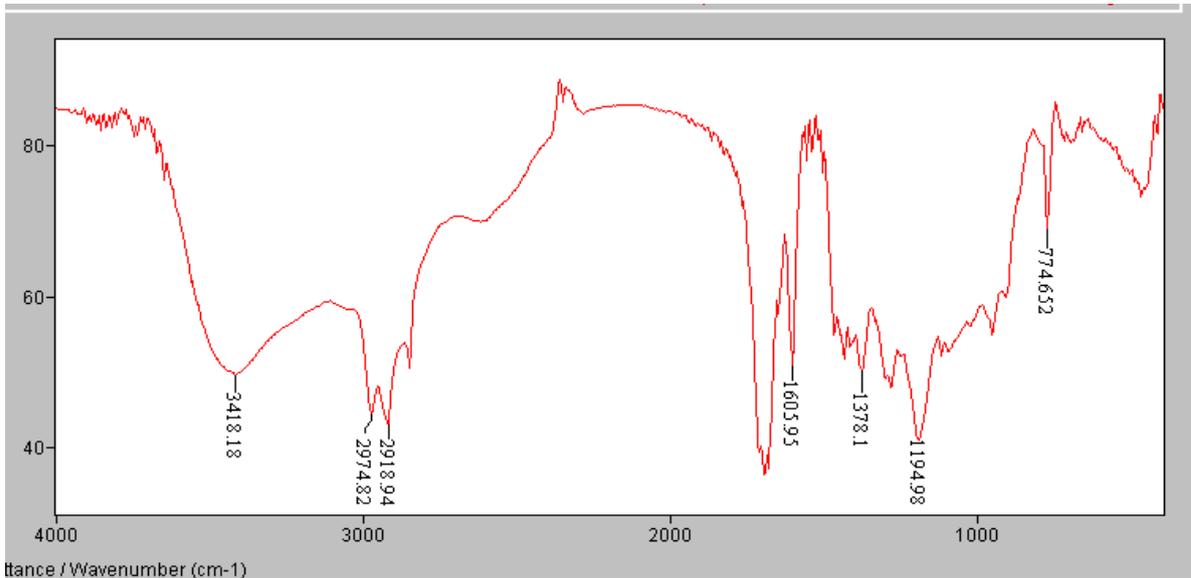


Figura 17: Espectro no IV (pastilha de KBr) do RF1A.

O espectro de RMN de ^1H (figura 18) apresentou em 7,76 ppm um sinal como simpleto com integral correspondente a 2 hidrogênios atribuído aos hidrogênios aromáticos H-4 e H-6. Os dois tripletos em 5,28 e 5,12 ppm com integral para 2 hidrogênios estão atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-2'' e H-4'. O tripleto com integral para 1 hidrogênio, em 4,74 ppm, refere-se ao hidrogênio vizinho a heteroátomo H-2. Entre 3,30 a 3,15 ppm, observou-se multipletos com integral para 2 hidrogênios, atribuídos aos H-3 e H-1'' que estão vizinhos ao aromático. Na região de 1,30 a 1,75 ppm observou-se 5 simpletos referentes as metilas. Demais sinais observados nesta região são referentes aos metilenos.

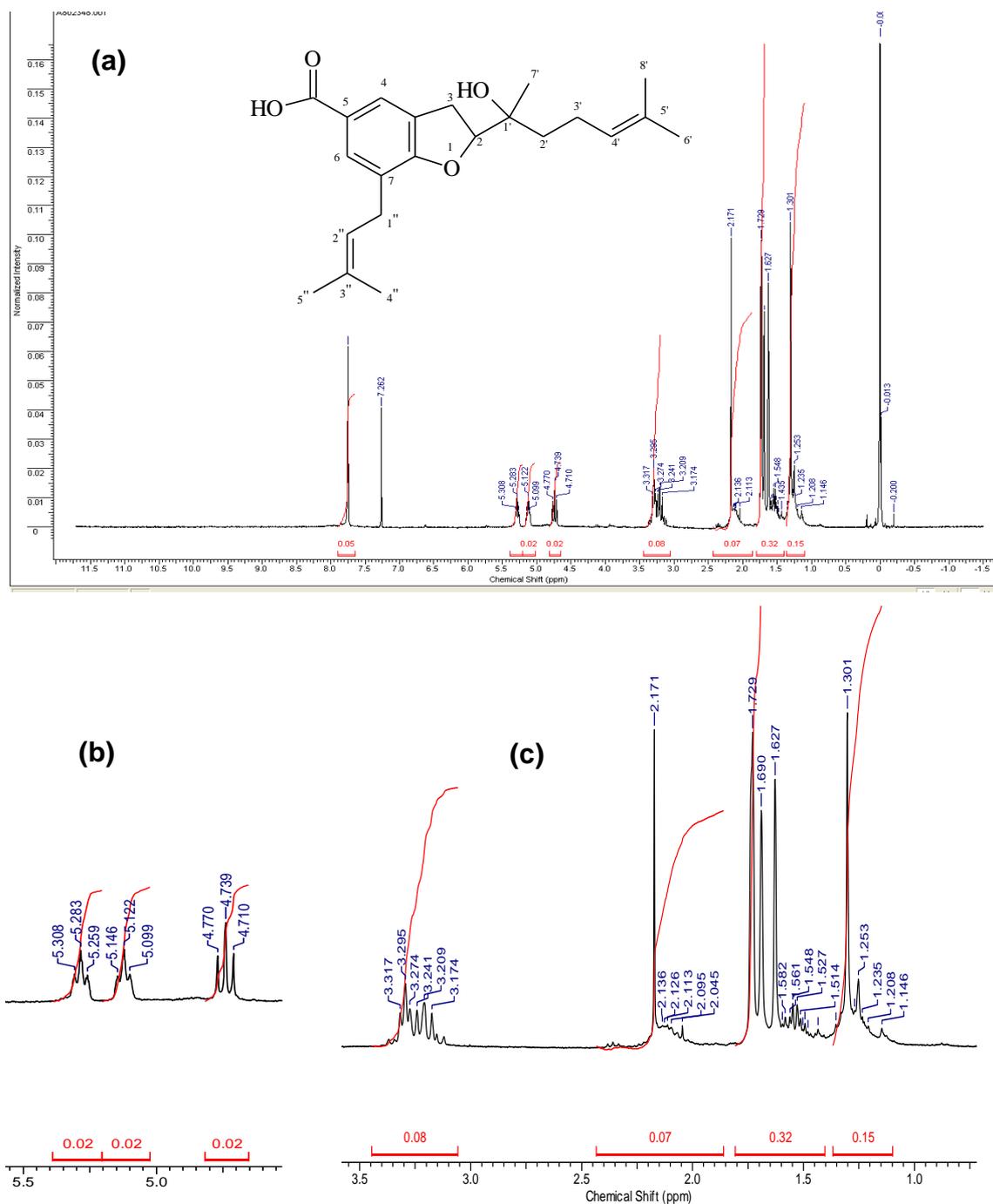


Figura 18: (a) Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do RF1A. (b) ampliação espectro RMN ^1H de 5,5 a 4,5 ppm (c) ampliação de 3,5 a 1,0 ppm do RF1A.

No espectro de RMN ^{13}C /DEPT (figura 19) verificou-se a presença de 22 carbonos, sendo 5 metilas, 4 metilenos, 5 metinos e 8 carbonos quaternários. Destacou-se no espectro o sinal referente a carboxila em 167,7 ppm. Os carbonos aromáticos e olefinicos foram encontrados em 163 a 120 ppm, sendo 4 destes sinais

como CH. Os carbonos oxigenados foram encontrados em 90,0 (CH) e 73,4 ppm (C). Abaixo de 40 ppm observou-se 9 sinais, sendo 5 para metilas e 4 metilenos.

Os sinais de RMN ^1H e ^{13}C estão de acordo com os dados da literatura (HIROTA et al., 2002) conforme tabela 2.

O ácido mirsinóico B foi detectado até o momento somente no gênero *Rapanea*. Ele foi encontrado na *R. umbellata*, *R. Myricoides* e *R. seguini* (JANUARIO et al., 1991; BLUNT, CHEN, WIEMER, 1998; HIROTA et al 2002). Ito, Narise e Shimura (2008) avaliaram a atividade antibacteriana do AMB no modelo de inibição da metionase agindo sobre as bactérias presentes na cavidade bucal como a *Fusobacterium nucleatum*, *Porphiromonas gingivalis* e *Treponema denticola* com seus respectivos IC_{50} de 10,5, 82,4 e 30,3. Makabe e colaboradores (2003) verificaram que o extrato metanólico da *R. seguini* e o ácido mirsinóico B apresentaram atividade antiinflamatória em modelo de edema induzido pela 12-O-tetradecanoil-phorbol-13-acetato (TPA).

Entre os estudos desenvolvidos com este composto por Pesquisadores da UNIVALI, vale destacar a atividade antinociceptica em vários modelos de dor avaliados (PEREIRA et al., 2004; HESS, 2006; ANTONIALLI, 2008) e a atividade antihiperlipemizante em animais diabéticos (MONTEIRO, 2007).

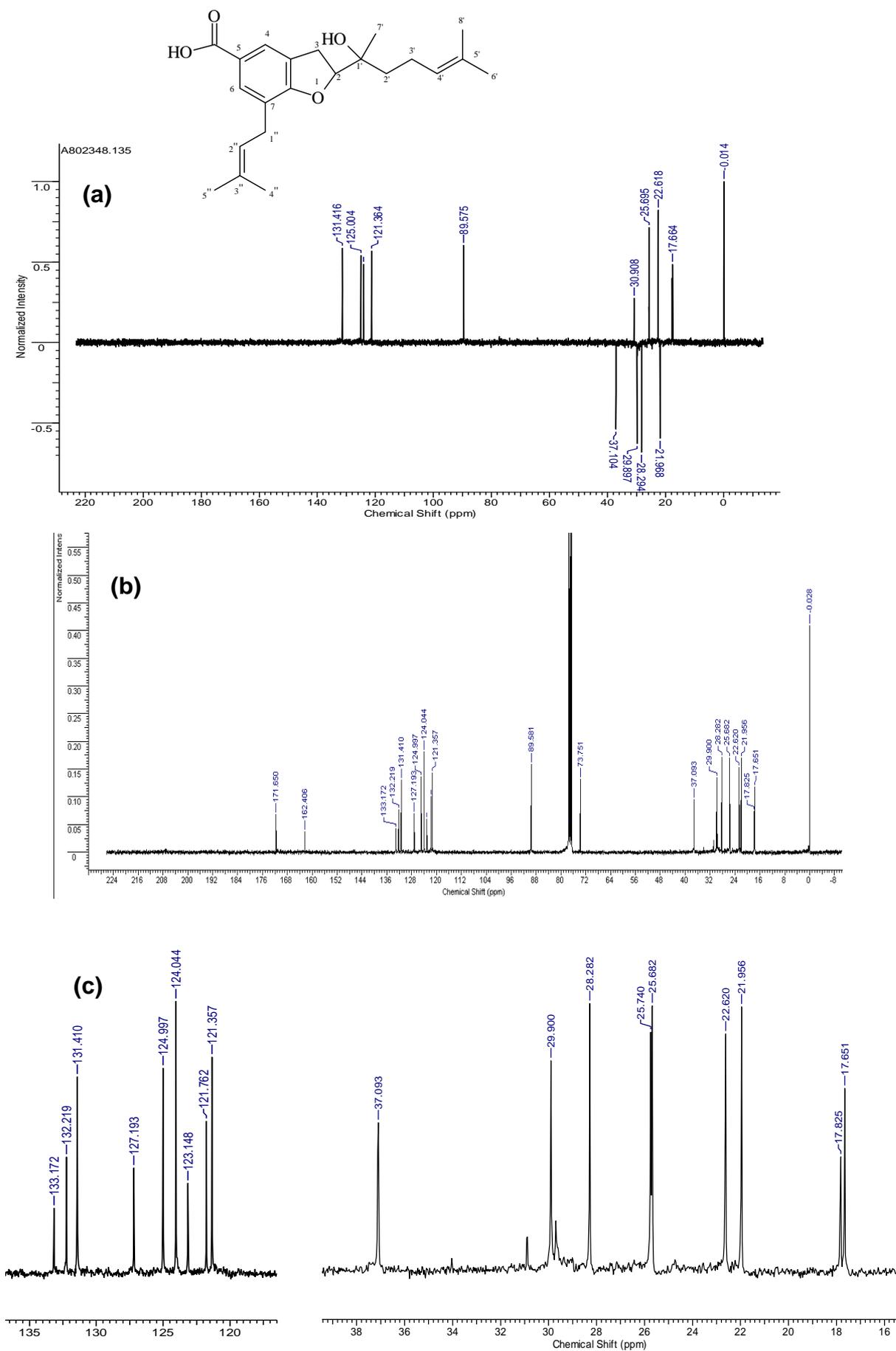


Figura 19: (a)(b) Espectro de RMN¹³C/DEPT (CDCl₃, 75,5 MHz) do RF1A. **(c)** ampliação espectro RMN¹³C de 16 a 135 ppm.

Tabela 2: Valores de deslocamentos químicos (δ =ppm) de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos para o RF1A e comparação com dados da literatura para o ácido mirsinóico B.

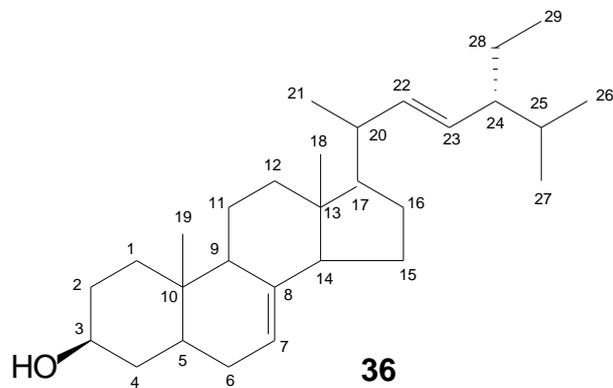
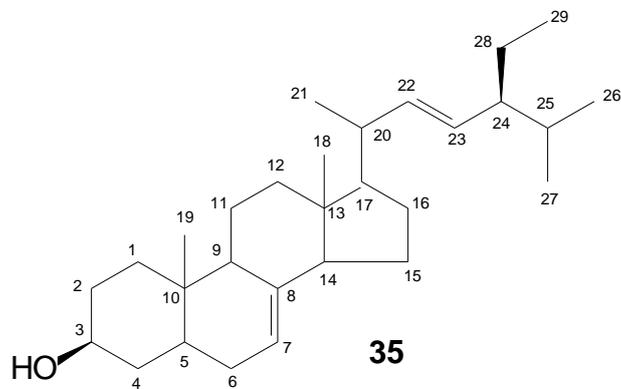
Carbono	RMN ^1H	RMN ^1H	RMN ^{13}C δ /	RMN ^{13}C δ / DEPT
	δ (ppm); mult; J (Hz) RF1A*	δ (ppm); mult; J (Hz) Hirota et al.,(2002)*	DEPT RF1A*	Hirota et al.. (2002)*
2	4,74; t; 9,3	4,74; t; 8,9	89,6 / CH	90,0 / CH
3	3,21; m	3,18; dd; 9,16; 15,8	29,9 / CH ₂	30,4 / CH ₂
3 ^a			123,1 / C	123,4 / C
4	7,76; s	7,67; s	131,4 / CH	131,1 / CH
5			121,8 / C	123,3 / C
6	7,76	7,75; s	125,0 / CH	125,2 / CH
7			127,2 / C	128,5 / C
7 ^a			162,4 / C	162,9 / C
1'			73,8 / C	73,4 / C
2'	1,53; m	1,55; m	37,1 / CH ₂	39,5 / CH ₂
3'	2,13; m	2,10; m	22,0 / CH ₂	22,6 / CH ₂
4'	5,12; t; 7,2	5,12; t; 6,8	124,1 / CH	125,6 / CH
5'			132,2 / C	133,1 / C
6'	1,63; s	1,63; s	17,7 / CH ₃	17,6 / CH ₃
7'	1,30; s	1,30; s	22,6 / CH ₃	22,0 / CH ₃
8'	1,69; s	1,69; s	25,7 / CH ₃	25,8 / CH ₃
1''	3,28; m	3,29; m	28,3 / CH ₂	28,8 / CH ₂
2''	5,28; t; 7,2	5,29; t; 7,3	121,4 / CH	122,7 / CH
3''			133,2 / C	131,7 / C
4''	1,73; s	1,73; s	17,9 / CH ₃	17,9 / CH ₃
5''	1,74; s	1,74; s	25,8 / CH ₃	25,8 / CH ₃
COOH			171,6 / C	167,7 / C

*Solvente: (CDCl₃)

5.1.2 Identificação da substância RF3A

O composto identificado previamente como RF3A (8 mg) foi isolado por CC da coluna 3A realizada com a fração 38-46 da coluna 2A. Este composto apresentou-se como um sólido amorfo, ponto de fusão 157-159 °C, solúvel em acetona e diclorometano. Sua estrutura foi confirmada através das análises espectroscópicas

de RMN ^1H e RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ como sendo uma mistura do (24 S)-24-etil-5 α -colesta-7,E-22-dien-3 β -ol também conhecido por espinasterol e (24 R)-24-etil-5 α -colesta-7,E-22-dien-3 β -ol chamado de condriasterol, estando o espinasterol em maior proporção. A diferença entre os dois esteróis esta na estereoquímica referente ao C 24 sendo o espinasterol o isômero S e o condriasterol o isômero R. Geralmente estes esteróis são encontrados como mistura e por técnicas cromatográficas não é possível separá-los. Na literatura verificou-se que o espinasterol sempre encontra-se em maior quantidade comparado com o seu isômero condriasterol.



O espectro no IV (figura 20) apresentou bandas de absorção na região de 3410 cm^{-1} referente à deformação axial do grupamento OH de álcool. Verificou-se também a presença de CH em 2942 cm^{-1} ; em 1699 cm^{-1} deformação axial de C=C e em 1381 cm^{-1} deformação axial de C-O.

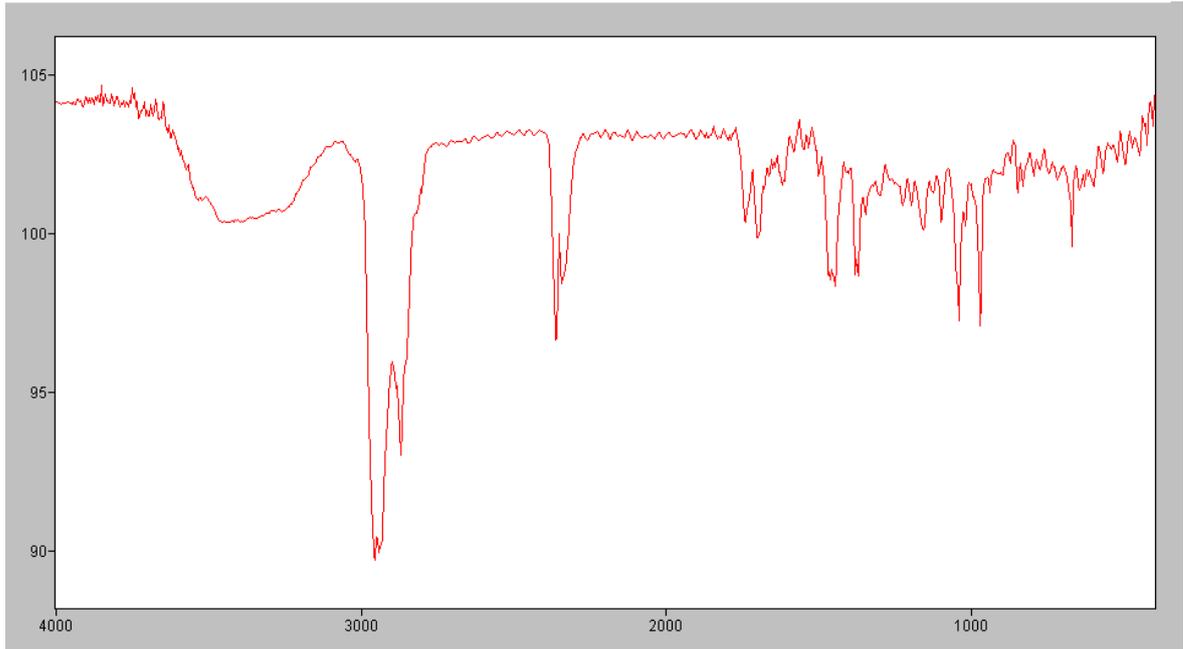
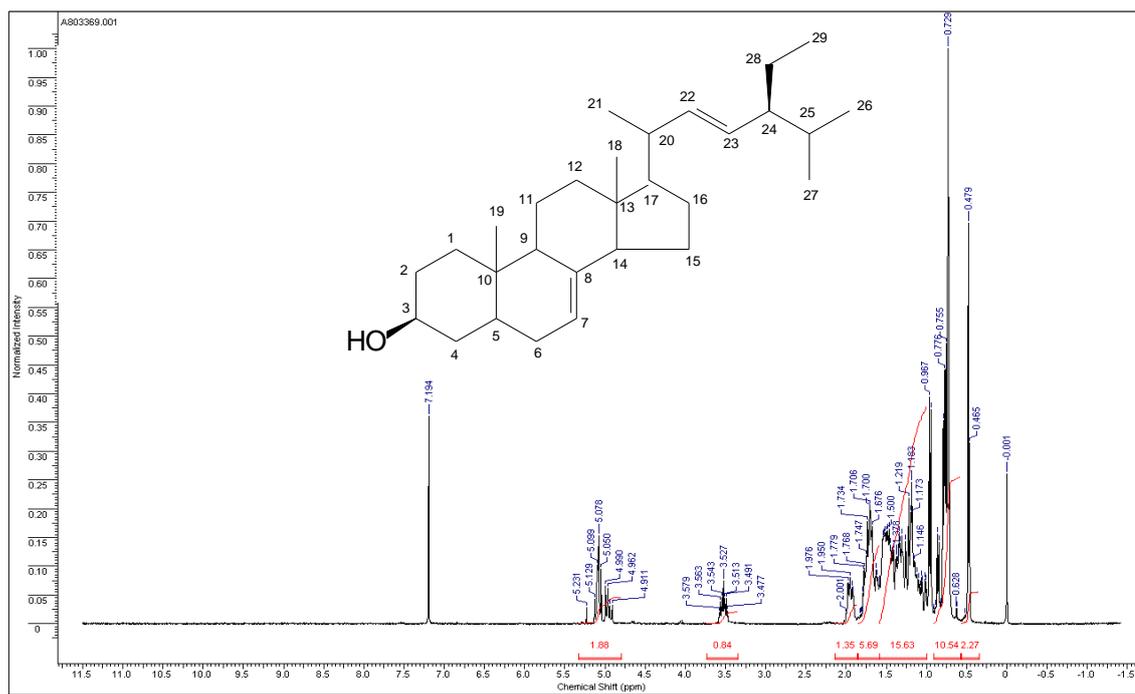
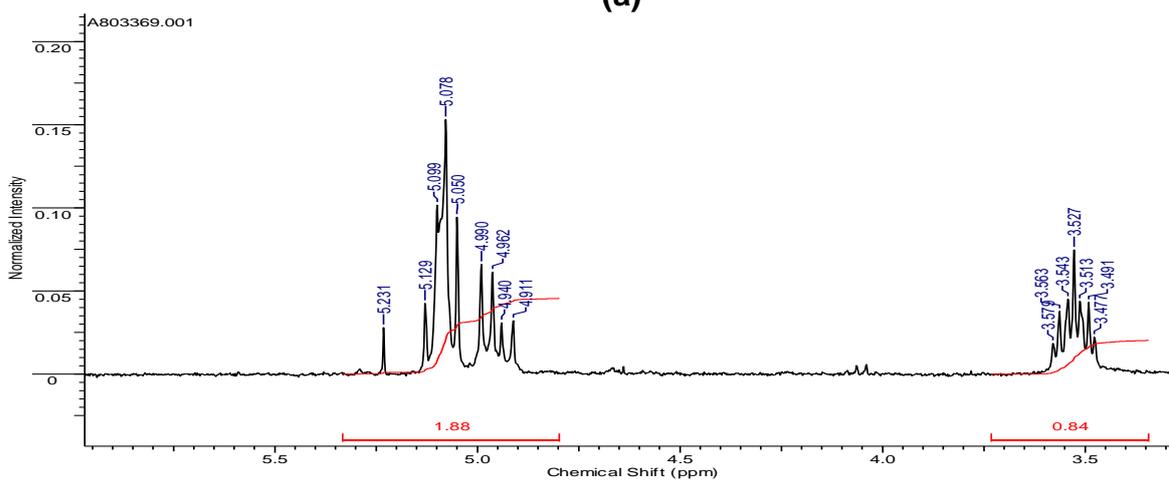


Figura 20: Espectro no IV (pastilha de KBr) do RF3A.

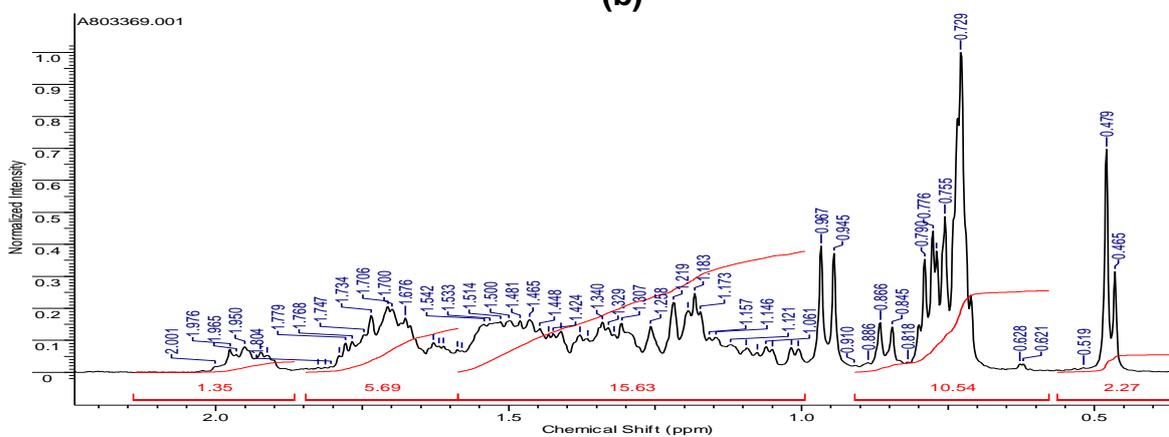
O espectro de RMN¹H (figura 21) apresentou seis sinais de grupo metila atribuídos ao espinasterol, sendo duas metilas terciárias como simpletos em 0,48 e 0,73 ppm correspondentes as H-18 e H-19, respectivamente. Os sinais referentes as metilas secundárias foram observados como dubletos em 0,95 ($J=6,5$ Hz) H-21, 0,75 ($J=6,0$ Hz) H-26 e 0,77 ($J=6,5$ Hz) H-27. O H-29 apresentou-se como tripleto em 0,73 ppm. Observou-se a presença do outro isômero pelo sinal 0,77 ppm (s) atribuído ao H-18. Os hidrogênios olefínicos H-22 e H-23 foram detectados em 5,10 ppm (dd, $J=16,0$ e 8,5 ppm) e 4,96 ppm (dd, $J=16,0$ e 8,5 ppm) respectivamente. Já H-7 foi encontrado em 5,07 (sl). O hidrogênio oximetínico H-3 foi encontrado em 3,52 ppm (septeto). Estes sinais são referentes aos dois isômeros.



(a)



(b)



(c)

Figura 21: (a) Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz). (b) Ampliação do espectro de RMN ^1H de 5,5 a 3,0 ppm. (c) Ampliação de 2,5 a 0,3 ppm do RF3A.

O espectro de RMN¹³C/DEPT (figura 22) apresentou sinais que evidenciam a mistura. A análise do espectro DEPT revelou 6 sinais para metilas, 9 metilenos, 11 metinos e 3 carbonos quartenários para o espinasterol. Para o condrilasterol alguns sinais foram equivalentes e outros se diferenciaram por pequenos valores.

Os valores de deslocamento químicos de hidrogênios e carbonos estão apresentados na tabela 3 e estão de acordo com os dados encontrados para o espinasterol e para o condrilasterol (IIDA, TAMURA, MATSUMOTO, 1980; SOUZA et al., 2001). Os valores do espectro RMN estão deslocados em 1 ppm devido ao sinal do solvente.

Esteróis tetracíclicos são geralmente compostos por 27, 28 ou 29 átomos de carbono e são insolúveis em solução aquosa. O espinasterol apresentou boa atividade carcinogênica quando testado em ratos com tumor cutâneo, obtendo 65% da diminuição dos tumores (KHALLOUKI et al., 2003). Uchida e colaboradores verificaram que o espinasterol apresentou atividade na redução dos níveis de colesterol no plasma. O espinasterol foi isolado pela primeira vez neste gênero.

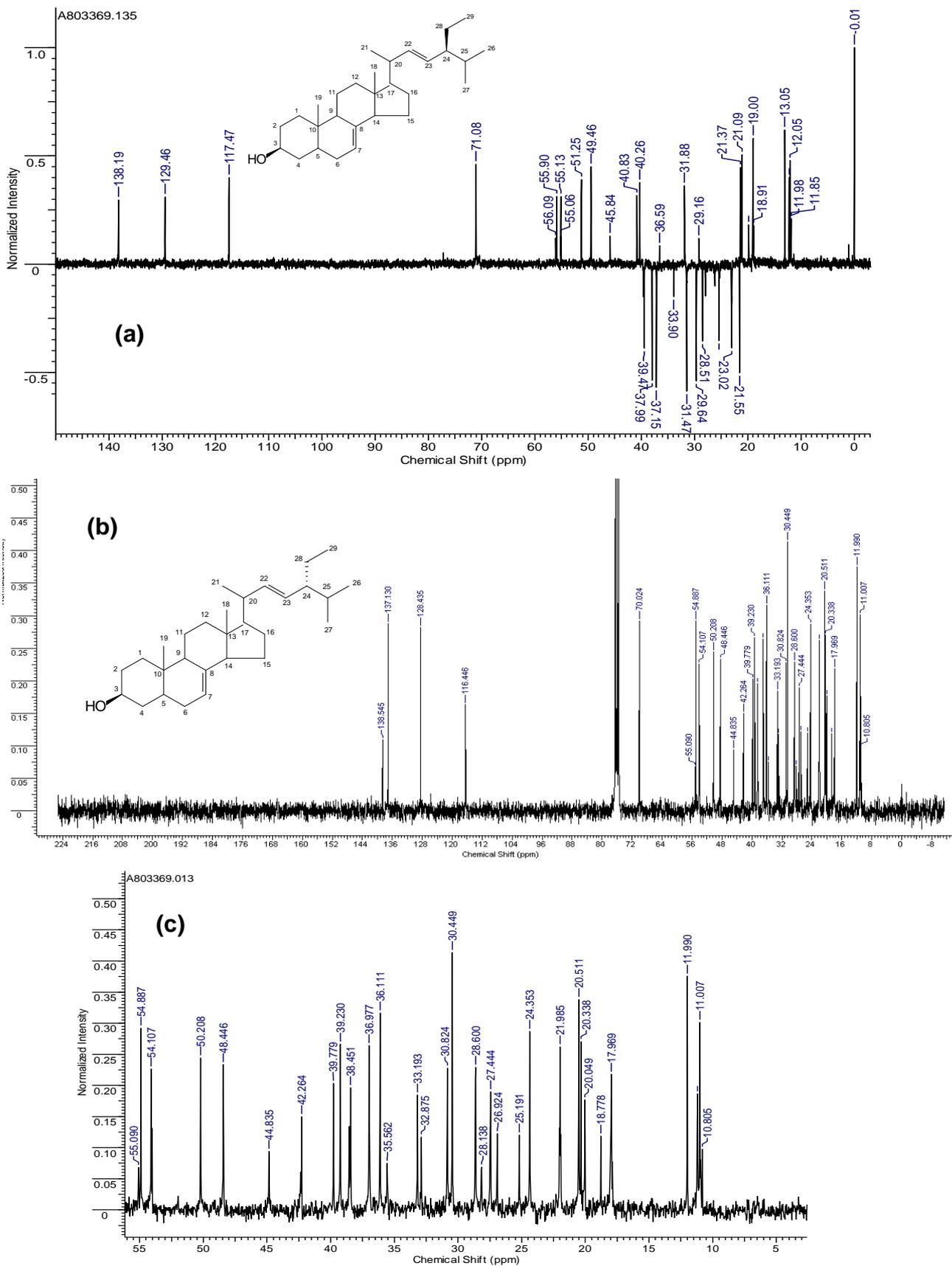


Figura 22: (a) (b) Espectro de RMN¹³C/DEPT (CDCl₃, 75,5 MHz) do RF3A. (c) ampliação do espectro de RMN¹³C de 5 a 55 ppm.

Tabela 3: Valores de deslocamentos químicos (δ =ppm) de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos para o RF3A e comparação com dados da literatura para o espinaesterol e para o condrilasterol (RF3A1).

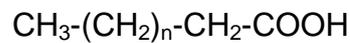
Carbono	RMN ^1H RF3A*	RMN ^1H δ (ppm); mult; <i>J</i> (Hz)	RMN ^{13}C δ / DEPT Espinaesterol RF3A*	RMN ^{13}C δ / DEPT Condrilasterol RF3A1*	RMN13C/ DEPT Espinaesterol Souza et al., (2001)*	RMN13C/ DEPT Condrilasterol Souza et al., (2001)*
	δ (ppm); mult; <i>J</i> (Hz)	Espinaesterol Souza et al., (2001)*				
1			37,1 / CH ₂	36,5 / CH ₂	37,11 / CH ₂	37,1 / CH ₂
2			31,5 / CH ₂	31,5 / CH ₂	31,45 / CH ₂	31,5 / CH ₂
3	3,52; <i>tt</i>	3,61; <i>tt</i> ; 11.0, 4.5	71,0 / CH	71,0 / CH	71,05 / CH	71,0 / CH
4			38,0 / CH ₂	38,0 / CH ₂	37,96 / CH ₂	38,0 / CH ₂
5			40,2 / CH	40,2 / CH	40,22 / CH	40,2 / CH
6			29,6 / CH ₂	29,1 / CH ₂	29,61 / CH ₂	29,6 / CH ₂
7	5,07; <i>brm</i>	5,16; <i>brm</i>	117,4 / CH	117,4 / CH	117,44 / CH	117,4 / CH
8			139,5 / C	139,5 / C	139,55 / C	139,5 / C
9			49,5 / CH	49,5 / CH	49,40 / CH	49,5 / CH
10			34,2 / C	33,8 / C	34,19 / C	34,2 / C
11			21,5 / CH ₂	21,5 / CH ₂	21,52 / CH ₂	21,5 / CH ₂
12			39,5 / CH ₂	39,5 / CH ₂	39,42 / CH ₂	39,5 / CH ₂
13			43,3 / CH	43,3 / CH	43,26 / CH	43,3 / CH
14			55,1 / CH	55,1 / CH	55,10 / CH	55,1 / CH
15			23,0 / CH ₂	23,0 / CH ₂	23,00 / CH ₂	23,0 / CH ₂
16			28,5 / CH ₂	28,0 / CH ₂	28,51 / CH ₂	28,4 / CH ₂
17			55,9 / CH	55,9 / CH	55,84 / CH	55,9 / CH
18	0,47; <i>s</i>	0,55; <i>s</i>	12,0 / CH ₃	11,8 / CH ₃	12,03 / CH ₂	12,0 / CH ₃
19	0,73; <i>s</i>	0,8; <i>s</i>	13,0 / CH ₃	13,0 / CH ₃	13,04 / CH ₂	13,0 / CH ₃
20			40,8 / CH	40,8 / CH	40,84 / CH	40,8 / CH
21	0,95; <i>d</i> ; 6.5	1,03; <i>d</i> ; 6.5	21,3 / CH ₃	21,05 / CH ₃	21,36 / CH ₂	21,0 / CH ₃
22	5,10; <i>dd</i> ; 16.0, 8.5	5,16; <i>dd</i> ; 15.5, 8.5	138,1 / CH	138,1 / CH	138,17 / CH	138,1 / CH
23	4,96; <i>dd</i> ; 16.0, 8.5	5,03; <i>dd</i> ; 15.5, 8.5	129,4 / CH	129,4 / CH	129,39 / CH	129,4 / CH
24			51,2 / CH	51,2 / CH	51,23 / CH	51,2 / CH
25			31,8 / CH	31,8 / CH	31,86 / CH	31,9 / CH
26	0,75; <i>d</i> ; 6.0	0,80; <i>d</i> ; 6.0	21,0 / CH ₃	19,0 / CH ₃	18,97 / CH ₂	21,5 / CH ₃
27	0,77; <i>d</i> ; 6.5	0,85; <i>d</i> ; 6.5	19,0 / CH ₃	21,0 / CH ₃	21,10 / CH ₂	19,0 / CH ₃
28			25,4 / CH ₂	26,2 / CH ₂	25,39 / CH ₂	25,4 / CH ₂
29	0,73; <i>t</i>	0,81; <i>t</i> ; 7.5	11,8 / CH ₃	11,8 / CH ₃	12,25 / CH ₂	12,5 / CH ₃

*Solvente: (CDCl₃)

5.1.3 Identificação da substância RF7A

O composto identificado previamente como RF7A (9 mg) foi isolado por CC da coluna 4A realizada com a fração 50-69 (1,95 g) proveniente da coluna 1A. Este composto apresentou-se como um sólido branco, solúvel em acetona e diclorometano.

No espectro de RMN ^1H (figura 23) observou-se um sinal em 0,88 ppm (*t*, $J=6,0$ Hz), 1,29 ppm (*s*), 2,27 ppm (*t*, $J=6,0$ Hz). Estes sinais estão de acordo para ácidos graxos saturados sendo o sinal em 0,88 ppm referente a metila terminal, 1,29 ppm referente aos $(\text{CH}_2)_n$ e 2,27 ppm referente ao metileno vizinho a carbonila.



Para este composto até o momento têm-se somente esta análise, para a determinação da estrutura seria necessário análise de espectrometria de massas.

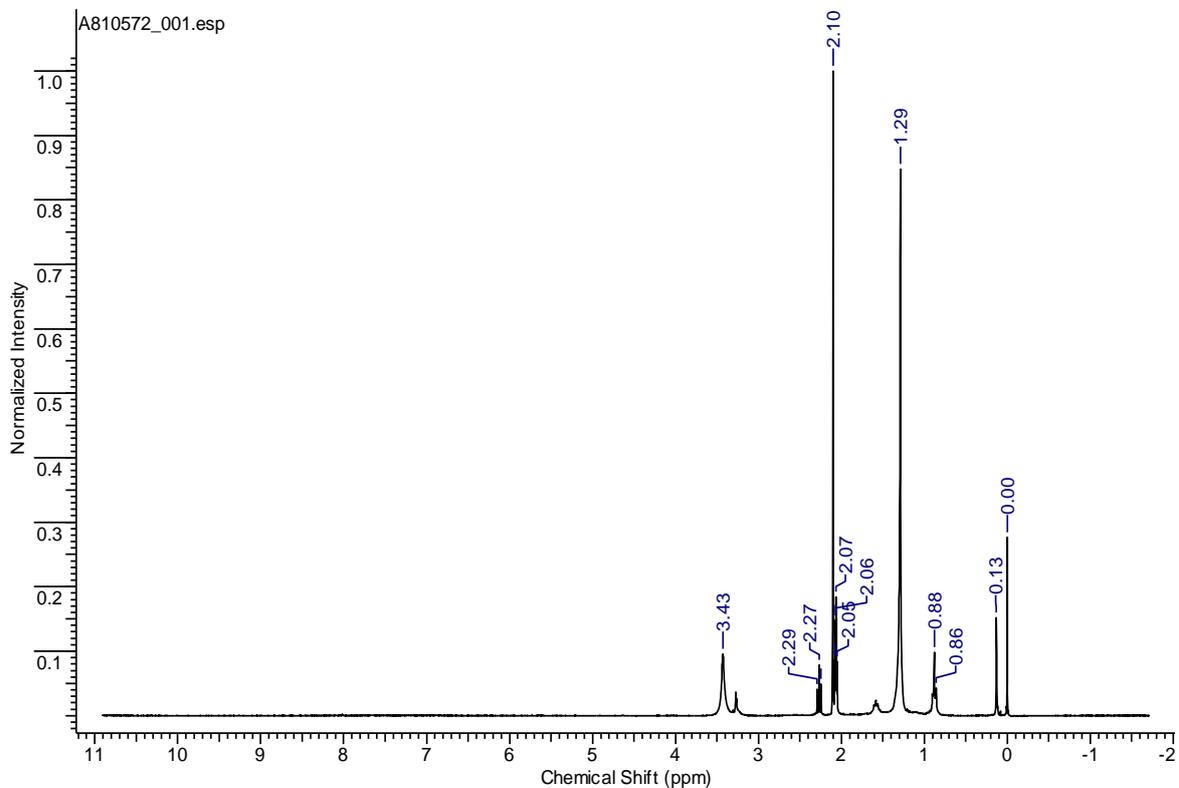


Figura 23: Espectro de RMN ^1H ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, 300 MHz) do RF7A.

5.1.4 Identificação da substância RF9A

O composto identificado previamente como RF9A (8,2 mg) foi isolado por CC da coluna 5A realizada com a fração 55-69 proveniente da coluna 1A. Este composto apresenta-se como um sólido branco, solúvel em acetona e diclorometano.

No espectro de IV (figura 24) observa-se em 3382 cm^{-1} um sinal que referente a deformação axial de OH, em 2922 e 2849 cm^{-1} deformação axial de C-H; em 1472 cm^{-1} deformação angular de CH_2 , em 1075 deformação axial de C-O. Os sinais apresentados acima indicam álcool de cadeia longa. Para este composto até o momento têm-se somente esta análise, para a determinação da estrutura seria necessário análise de espectrometria de massas.

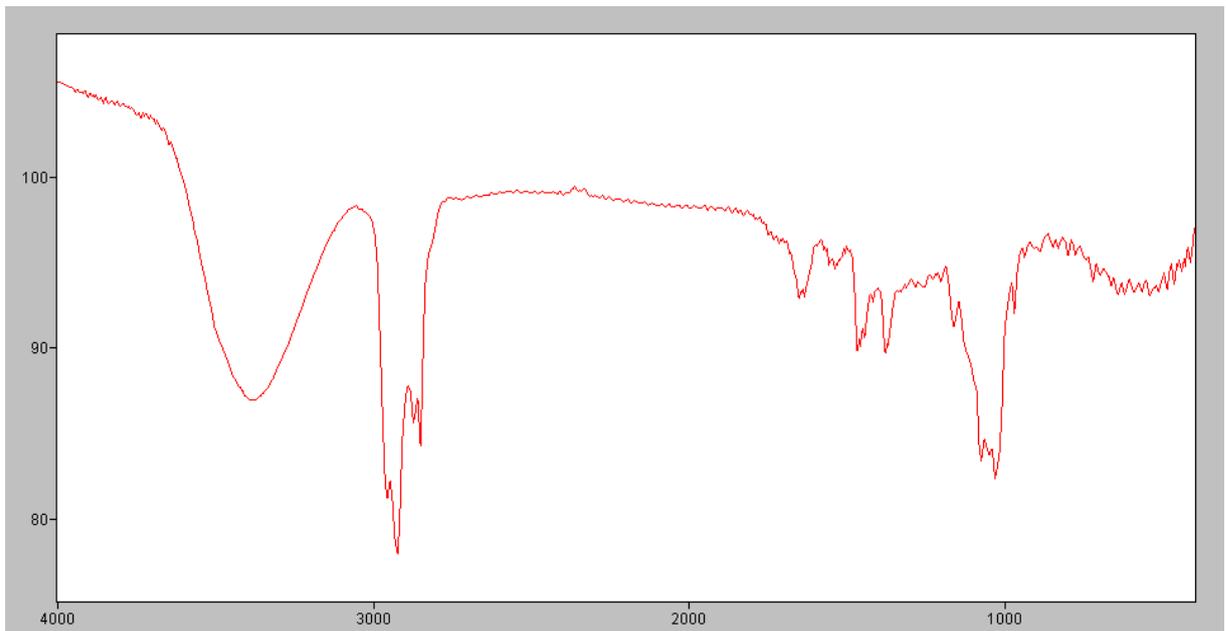
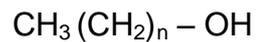
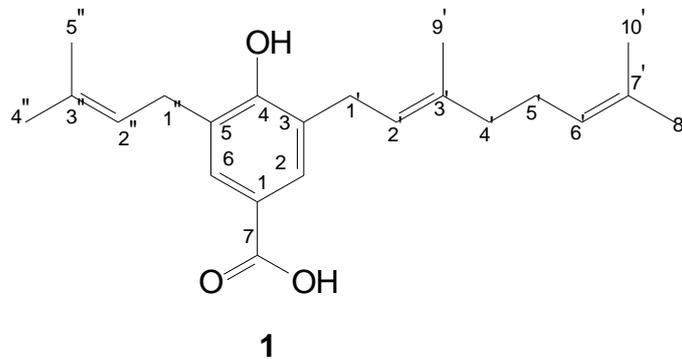


Figura 24: Espectro no IV (pastilha de KBr) do RF11A.

5.2 Identificação dos compostos isolados dos frutos da *R. ferruginea*

5.2.1 Identificação da substância RF1B

O composto identificado previamente como RF1B (900 mg) foi isolado por CC do extrato bruto dos frutos. Este composto apresentou-se como um óleo amarelo, solúvel em acetona e diclorometano. Sua estrutura foi confirmada através das análises espectroscópicas de IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C /DEPT como sendo o ácido benzóico prenilado ácido 3-geranil-4-hidroxi-5-(3"-metil-2"butenil)-benzoico (**1**) chamado de ácido mirsinóico A (AMA).



O espectro de absorção no IV (figura 25) apresentou bandas de absorção com intensidade máxima em 3426 cm^{-1} , referente à deformação axial do grupamento OH fenólico. Sobreposta a esta, está presente uma banda bastante alargada, caracterizada pela deformação axial do grupamento OH ($3500\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$), que juntamente com a presença da carbonila em 1681 cm^{-1} caracteriza o grupamento funcional ácido; em 1601 cm^{-1} deformação axial de C=C e em 1226 cm^{-1} deformação axial de C-O.

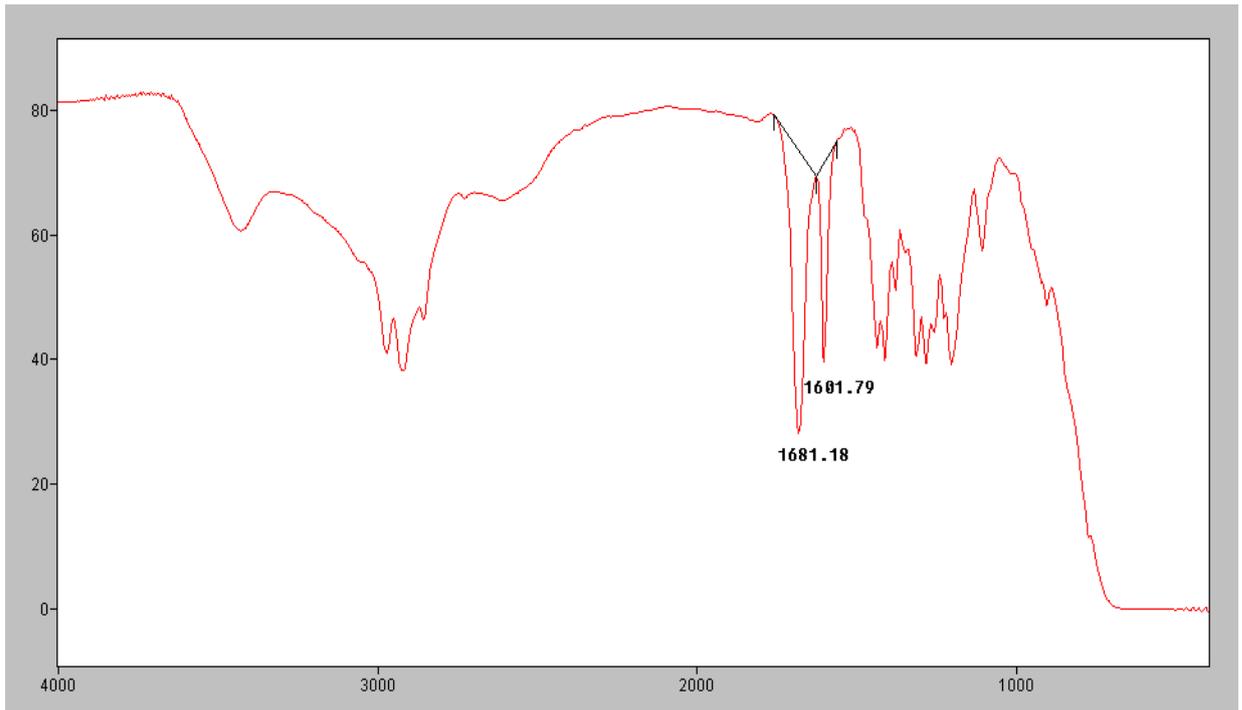


Figura 25: Espectro no IV (pastilha de KBr) do RF1B.

No espectro de RMN ^1H (figura 26) observou-se em 7,77 ppm um simpleto com integral correspondente a 2 hidrogênios, atribuído aos dois hidrogênios aromáticos H-2 e H-6. Os dois tripletos em 5,32 e 5,08 ppm ($J = 6,0$ Hz) apresentaram integral para 3 hidrogênios correspondem aos hidrogênios olefínicos H-2', H-2'' e H-6'. Já o tripleto em 3,38 ppm apresentou integral para 4 hidrogênios, atribuídos aos metilenos H-1' e H-1''. Os três simpletos em 1,77, 1,69 e 1,60 ppm apresentaram integral para 15 hidrogênios e são referentes as 5 metilas existentes.

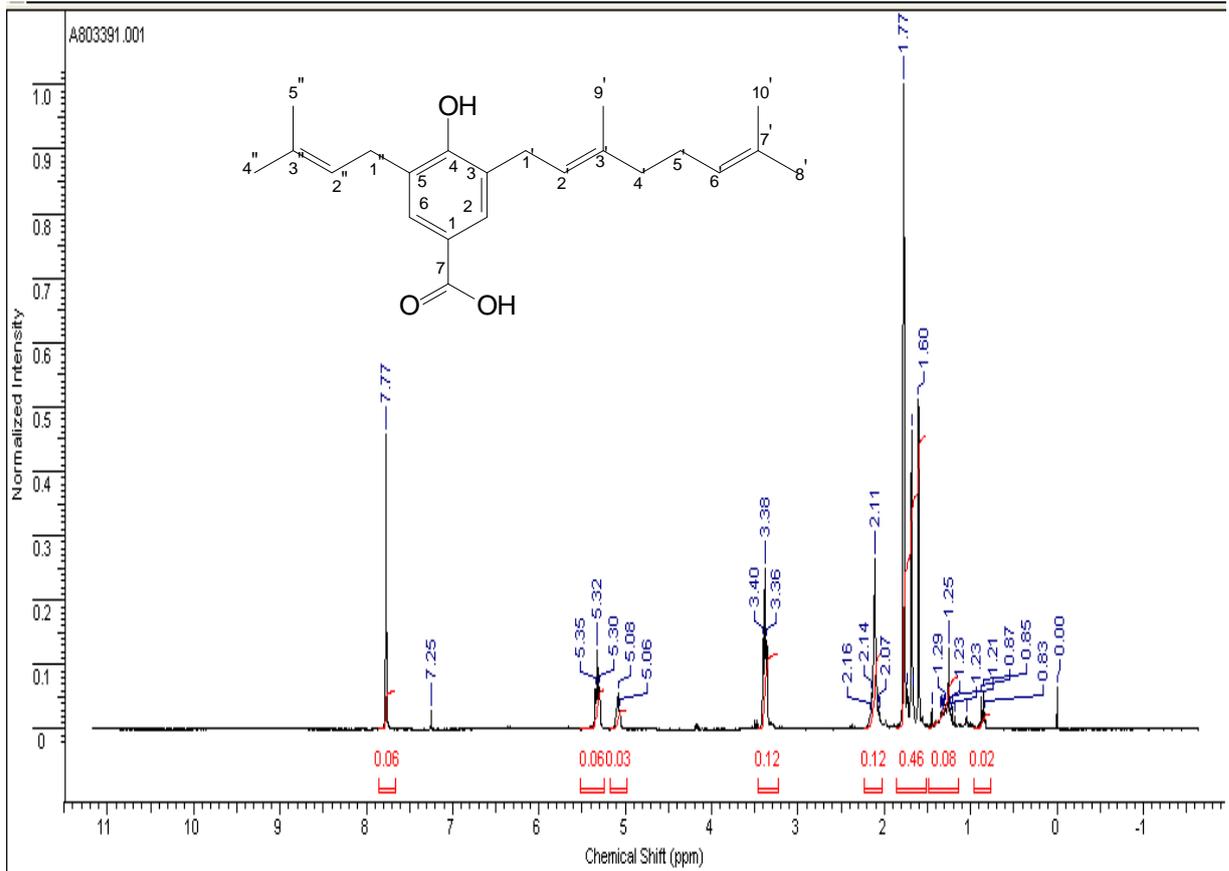


Figura 26: Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do RF1B.

No espectro de RMN¹³C/DEPT (Figura 27) verificou-se a presença de 21 carbonos, sendo 5 metilas, 4 metilenos, 4 metinos e 8 carbonos quaternários. Porém na estrutura existem 22 carbonos, devido a sobreposição dos carbonos C-2 e C-6 em 130,5 ppm. Destacou-se no espectro em 172 ppm o sinal do carbono da carboxila, de 150 a 120 ppm os carbonos aromáticos e olefínicos, sendo 4 destes sinais como CH. Abaixo de 40 ppm os carbonos alifáticos, sendo 5 metilas e 4 metilenos.

Os sinais de RMN ¹H e ¹³C estão apresentados na tabela 4 e estão de acordo com os dados da literatura para o ácido mirsinóico A.

O ácido mirsinóico A foi detectado até o momento somente no gênero *Rapanea*. Ele foi encontrado nas folhas da *Myrsine seguini* e apresentou intensa atividade antiinflamatória em modelo de edema induzido em ratos machos (DONG et al., 1999; HIROTA et al 2002). Mizushina e colaboradores (2000) descreveram que o AMA inibe a DNA-polimerase servindo para o tratamento de doenças virais, como por exemplo a herpes, verificando-se também atividade contra o câncer. Verificou-se que o AMA foi isolado pela primeira vez dos frutos de *R. ferruginea*.

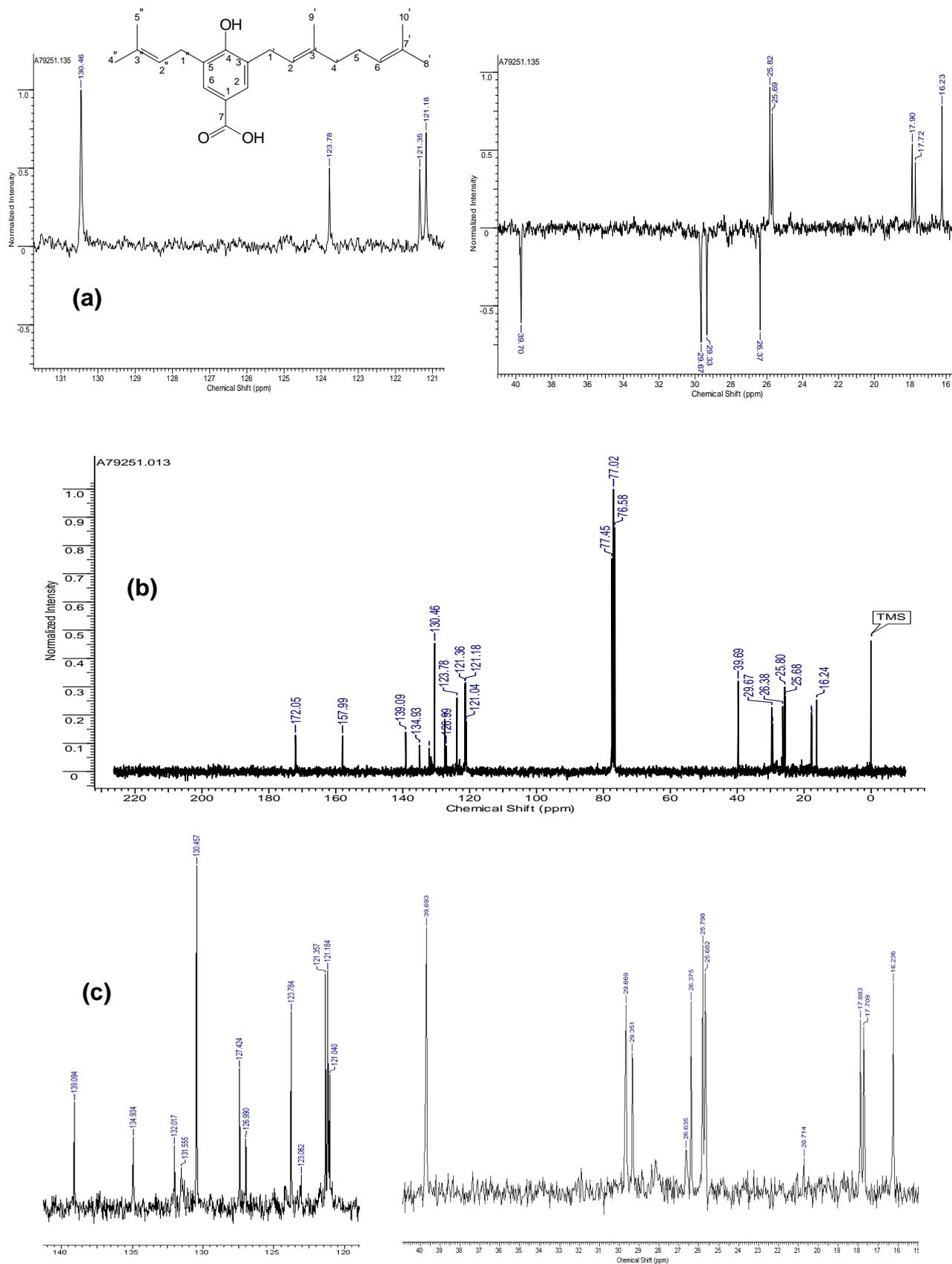


Figura 27: (a) Ampliação DEPT. **(b)** espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) do RF1B. **(c)** ampliação espectro RMN ^{13}C de 10 a 140 ppm.

Tabela 4: Valores de deslocamentos químicos (δ =ppm) de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos para o RF1B e comparação com dados da literatura para o ácido mirsinóico A.

Carbono	RMN ^1H	RMN ^1H	RMN ^{13}C δ / DEPT RF1B*	RMN ^{13}C δ / DEPT
	δ (ppm); mult; J (Hz) RF1B*	δ (ppm); mult; J (Hz) RF1B Makabe et al., (2003)*		Makabe et al., (2003)*
1			121,0 / C	120,92 / C
2	7,77; s	7,74; s; 6,0	130,5 / CH	130,46 / CH
3			127,0 / C	127,5 / C
4			158,0 / C	158,0 / C
5			127,0 / C	127,5 / C
6	7,77; s	7,74	130,5 / CH	130,46 / CH
1'	3,3; <i>m</i>	3,38; <i>m</i> ; 6,8	29,7 / CH ₂	29,48 / CH ₂
2'	5,32; <i>t</i> ; 6,0	5,32; <i>t</i> ; 6,6	121,2 / CH	121,26 / CH
3'			139,1 / C	138,84 / C
4'		2,09	39,7 / CH ₂	39,73 / CH ₂
5'	2,11; <i>m</i>	2,09	26,3 / CH ₂	26,46 / CH ₂
6'	5,08; <i>d</i>	5,08; <i>d</i> ; 6,7	123,8 / CH	123,86 / CH
7'			131,8 / C	131,94 / C
8'	1,69; s	1,68	25,7 / CH ₃	25,68 / CH ₃
9'	1,77; s	1,76	16,2 / CH ₃	16,24 / CH ₃
10'	1,60; s	1,60	17,7 / CH ₃	17,72 / CH ₃
1''	3,4; <i>t</i> ; 6,0	3,38; <i>t</i> ; 6,8	29,3 / CH ₂	28,8 / CH ₂
2''	5,32; <i>t</i> ; 6,0	5,32; <i>t</i> ; 6,6	121,4 / CH	122,7 / CH
3''			134,0 / C	131,7 / C
4''	1,77; s	2,09	17,9 / CH ₃	17,9 / CH ₃
5''	1,77; s	2,09	25,8 / CH ₃	25,8 / CH ₃
COOH			172,0 / C	170,44 / C

*Solvente: (CDCl₃)

5.3 Estudos Biológicos

5.3.1 Ensaio Bioautográfico

O ensaio bioautográfico foi realizado como um teste preliminar para verificar uma possível ação dos extratos dos frutos, folhas e caules da *Rapanea ferruginea* na inibição da enzima AChE. Após a revelação, substâncias capazes de inibir a AChE, apresentam mancha branca contra um fundo púrpura (a reação está apresentada na figura 25. A partir deste procedimento foi detectado possíveis substâncias que apresentaram inibição da AChE, e que após a sua purificação foram submetidas a ensaio “*in vitro*”. Este ensaio até o momento foi realizado para o AMB.

Aplicou-se na placa de CCD 80 µg dos extratos dos frutos, folhas e caules para identificar as possíveis manchas brancas características da inibição da AChE (figura 28). Pode-se observar reação positiva de uma substância com Rf 0,7 presente em todos os extratos avaliados. Além desta, também nas folhas pode-se evidenciar uma mancha branca com Rf 0,3, e Rf 0,2.

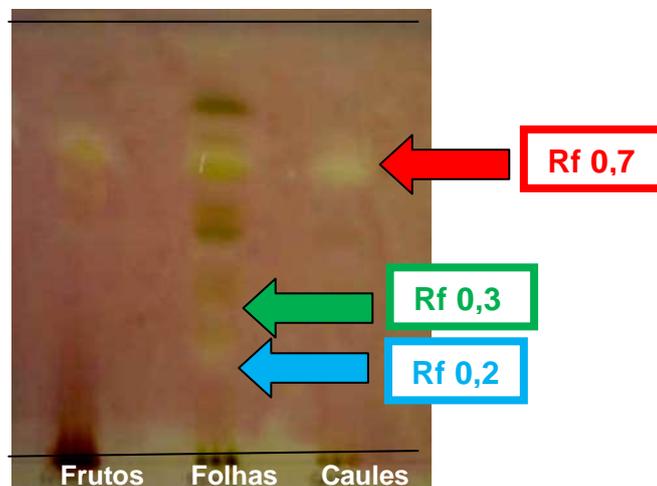


Figura 28: Ensaio bioautográfico por CCD dos extratos etanólicos dos frutos, folhas e caules de *R. ferruginea*.

Na figura 29 está apresentado a placa contendo os extratos previamente avaliados e as substâncias isoladas AMA, AMB e espinasterol. Observa-se na placa manchas brancas que correspondem aos Rfs das substâncias AMA Rf = 0,3, AMB Rf = 0,2, espinasterol Rf = 0,37. Foram observados manchas com Rf similares ao AMA e espinasterol nos três extratos avaliados. Para o AMB verificou-se Rf similar

nos frutos e cascas. Além das manchas referentes às substâncias avaliadas, observou-se também uma mancha branca nos frutos e cascas $R_f = 0,7$.

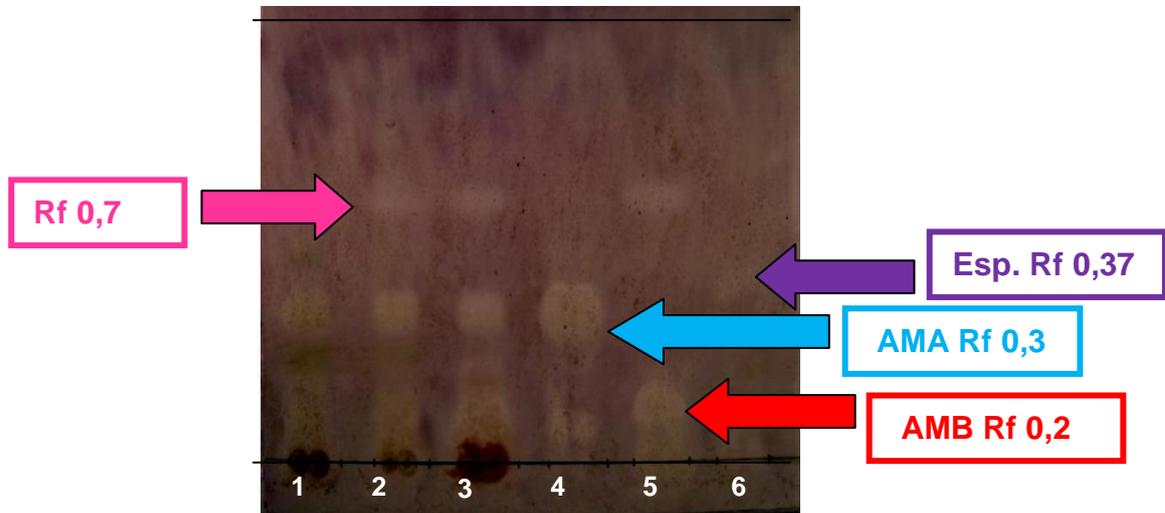


Figura 29: Ensaio bioautográfico: (1) Folhas e Caules, (2) Frutos, (3) Cascas, (4) AMA, (5) AMB e (6) Espinasterol.

Tendo em vista que as substâncias AMA, AMB e espinasterol inibiram a AChE, estes foram avaliados separadamente na tentativa de identificar a concentração mínima inibitória. Foram preparadas várias diluições de cada uma das substâncias e como pode ser observado na figura 30 o AMA (1) apresentou reação positiva até 8 μg . Já a substância AMB (2) inibiu até 2 μg (figura 31).

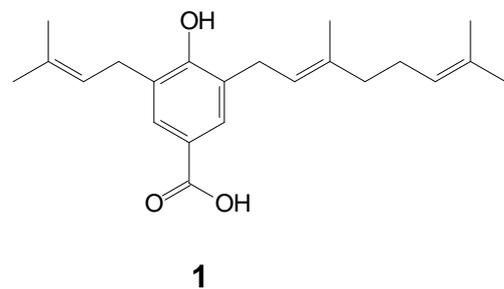
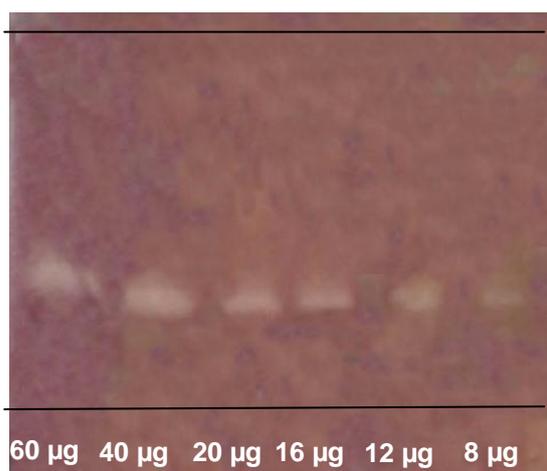


Figura 30: Ensaio bioautográfico com AMA.

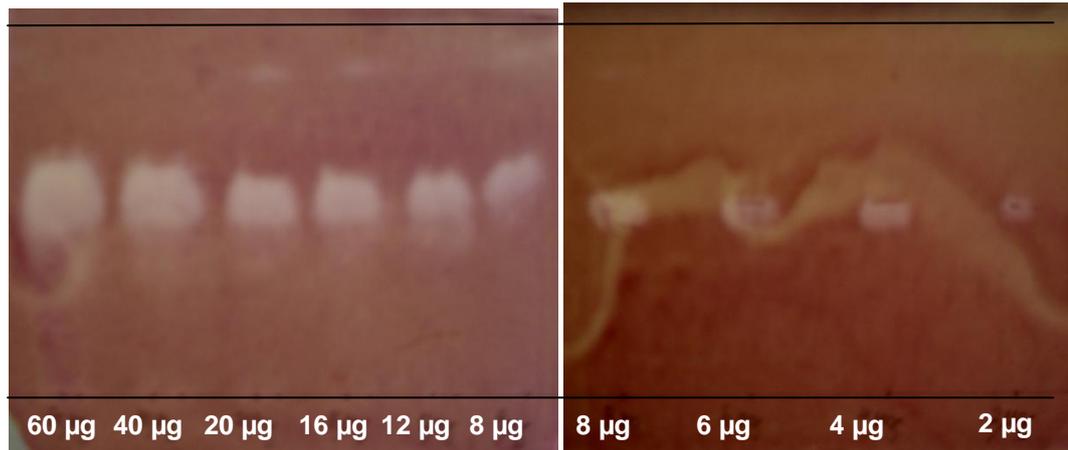
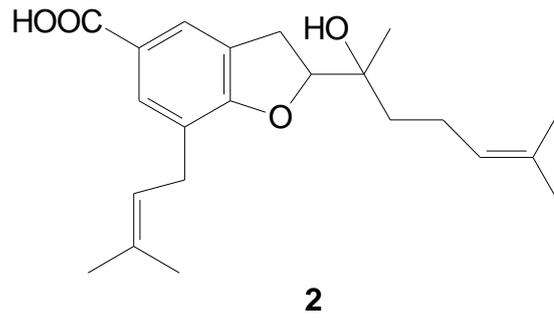


Figura 31: Ensaio bioautográfico com AMB.

Na figura 32 esta apresentada a CCD contendo o espinasterol (**32**), no qual pode-se observar manchas brancas até 2,4 µg característico da inibição da AChE.

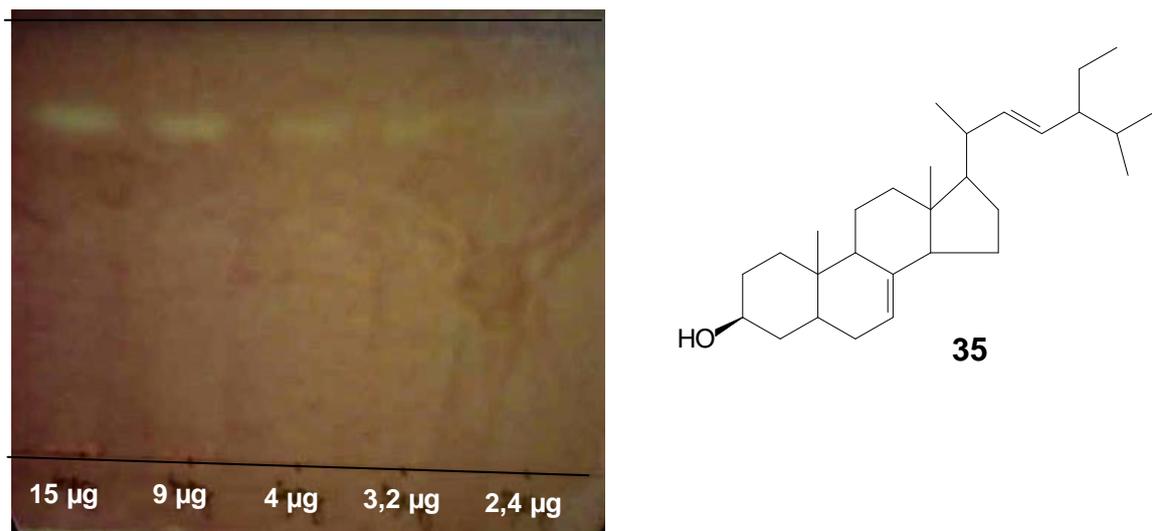


Figura 32: Ensaio bioautográfico com o espinasterol.

Devido aos resultados satisfatórios obtidos com a bioautografia, escolheu-se o AMB, que é o composto majoritário da *R. ferruginea* para se fazer uma avaliação

mais detalhada da inibição da AChE, utilizando-se tecido cerebral como fonte da enzima

5.3.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica em cérebro total e hipocampo de ratos

Na figura 33, estão apresentados os dados de inibição da AChE em cérebro total e em hipocampo, na concentração de 44 μM . A inibição para cérebro total nesta concentração utilizada foi de 30,10% e de 22,08 % para o hipocampo. Esses dados demonstram que a inibição causada pelo AMB em cérebro total foi maior que no hipocampo. O córtex cerebral por também ser rico em vias colinérgicas foi utilizado como fonte de enzima. Não houve diferença na atividade enzimática na presença do AMB ($386,61 \pm 35,14$ para o controle x $472,90 \pm 43,25$ $\mu\text{g ATC/min/mg proteína}$ para o AMB 44 μM). Estes resultados não são muito significativos quando comparados com a fisostigmina (também conhecida como eserina), que é um composto obtido das sementes da *Physostigma venenosum* e é inibidor de AChE com IC_{50} de 0,25 μM quando testada em eritrócitos bovinos (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006). Já a cumarina escopoletina, isolada do extrato metanólico de *Vaccinium oldhami* (Eriacaceae), apresentou um valor de IC_{50} de 10 $\mu\text{g/mL}$ (79 μM), quando testada no cérebro mediano de ratos (LEE et al, 2004).

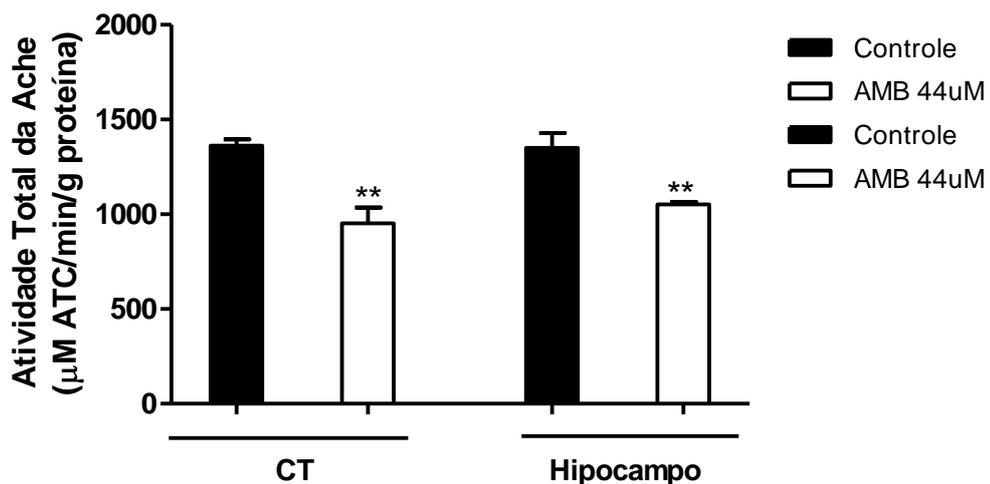


Figura 33: Efeito do AMB sobre a atividade da AChE em cérebro total (CT) e hipocampo de ratos. Os dados representam a média de 5 experimentos independentes realizados em duplicata \pm E.P.M., analisados através do teste T. ** $p < 0,01$ quando comparados com o grupo controle (barras pretas).

Os dados obtidos nesse estudo para o AMB, mostram através de duas técnicas (bioautografia e método de Ellman) que ele inibe a AChE. Através da bioautografia a concentração de 2 µg foi suficiente para inibir a atividade da enzima ($5,58 \times 10^{-3}$ µmol). Quando se utilizou o método de Ellman e tecido cerebral (cérebro total, hipocampo e córtex) para fazer a avaliação, também houve inibição da atividade da enzima, embora tenha sido um pouco diferente. A inibição parece não ser específica para o hipocampo, estrutura cerebral rica em vias colinérgicas que está envolvida nos processos de aquisição e consolidação da memória.

A diferença de resultados obtida nas diferentes metodologias utilizadas neste trabalho já foi objeto de estudo de um grupo de pesquisadores. Di Giovanni e colaboradores (2008) mostraram que há divergências entre os resultados obtidos através das duas metodologias. Para a maioria dos compostos que eles testaram, os resultados foram equivalentes, mas em uma pequena porcentagem das amostras testadas, havia uma diferença dos resultados. Essa divergência pode ser causada por uma interação da enzima ou das amostras testadas com a sílica utilizada na placa, e esta interação pode resultar em uma afinidade alterada da enzima pelos compostos.

Em estudos anteriores realizados com a escopoletina, utilizando o método de Ellman (inibição da AChE), os autores encontraram uma IC_{50} relativamente elevada quando comparada com a fisostigmina. A inibição da AChE pela escopoletina foi no cérebro mediano, região cerebral onde encontram-se estruturas como hipocampo e amígdala, as quais estão envolvidas no processo de formação da memória. Como em nossos estudos a inibição da AChE pelo AMB foi maior no cérebro total, não foram testadas outras concentrações do AMB, mesmo sabendo que os sintomas da DA iniciam no hipocampo e posteriormente se espalham para o restante das estruturas do SNC.

Não foram encontrados até o momento na literatura dados sobre os efeitos dos ácidos benzóicos prenilados no SNC, sendo este trabalho o primeiro a relatar esta atividade.

6 CONCLUSÕES

Através de procedimentos cromatográficos realizados com o extrato etanólico das folhas/caules da *R. ferruginea* foi possível isolar o ácido mirsinóico B, o espinasterol, ácido graxo de cadeia longa e álcool de cadeia longa. No extrato etanólico dos frutos da *R. ferruginea* isolou-se o ácido mirsinóico A. Estas substâncias foram isoladas pela primeira vez nesta espécie. Outras substâncias foram isoladas, mas até o momento não foi possível a identificação de suas estruturas.

Os extratos das folhas, caules, frutos e cascas foram avaliados quanto a atividade anticolinesterásica através do ensaio bioautográfico. Verificou-se que na concentração de 80 µg houve inibição da AChE para todos os extratos brutos testados.

Quando testadas as substâncias isoladas, verificou-se a inibição da AChE para os compostos ácido mirsinóico A, ácido mirsinóico B e espinasterol nas concentrações de até 8 µg, 2 µg e 3,2 µg, respectivamente.

No teste “*in vitro*” foi avaliado, até o momento, o AMB no qual apresentou atividade mais intensa no cérebro total (30,10%) que no hipocampo (22,08%) na concentração de 44 µM.

Os resultados do presente trabalho indicam a necessidade de continuar os estudos fitoquímicos e farmacológicos com a *Rapanea ferruginea* no intuito de esclarecer a estrutura das substâncias ainda não identificadas, bem como esclarecer possíveis mecanismos envolvidos na atividade anticolinesterásica.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, VU; KHAN, A.; FAROOQ U.; KOUSAR F.; KHAN SS.; NAWAZ SA.; ABBASI MA.; CHOUDHARY MI. Three new cholinesterase-inhibiting cis-clerodane diterpenoids from *Otostegia limbata*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 53, p. 378-381, 2005.
- AHMAD I.; ANIS I.; MALIK A.; NAWAS AS.; CHOUDHARY MI. Cholinesterase inhibitory constituents from *Onosma hispida*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 51, p. 412-414, 2003.
- ALMEIDA OP. Biologia molecular da doença de Alzheimer: Uma luz no fim do tunel? **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, p. 77-81, 1997.
- ANTONIALI, C.S.; MONTEIRO, E.R.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; QUINTÃO, N.L.M. Avaliação do efeito do ácido mirsinóico B em diferentes modelos de hipernocicepção inflamatória e neuropática persistentes em camundongos. In: **XX Simpósio de plantas medicinais do Brasil e X International congresso ethnopharmacology**, 2008, São Paulo-SP.
- AREOSA, S.A.; SHERRIFF, F.; McSHANE, R. Memantine for dementia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 20, CD003154, 2005.
- AROT, L.O.M.; MIDIWO, J.O; KRAUS, W. A flavonol glycoside from *Myrsine Africana* leaves. **Phytochemistry**. v. 43, n. 5, p. 1107-1109, 1996.
- ATTA-UR-RAHMAN.; AKHTAR MN.; CHOUDHARY MI.; TSUDA Y.; SENER B.; KHALID A.; PARVEZ M. New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperiales* and their cholinesterase inhibiting activities. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 50, p. 1013-1016, 2002.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; DA CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 2, p. 258-285, 2006.
- BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S.; JUNIOR, C.V. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- BECKER, RE.; COLLIVER, JA.; MARKWELL, SJ.; MORIEARTY, PL.; UNNI, LK.; VICARI, S. Effects of metrifonate on cognitive decline in Alzheimer's diseases: a double-blind, placebo-controlled, 6 month study. **Alzheimer disease and Associated Disorders**. v. 12, p. 54-57, 1998.
- BIERER, L.M.; HAROUTUNIAN, V.; GABRIEL, S.; KNOTT, P.J.; CARLIN, L.S.; PUROHIT, D.P.; PERL, D.P.; PHILIPKANANOF, J.S.; DAVIS, K.L. Neurochemical Correlats of Dementia Severity in Alzheimer's Disease: Relative Importance of the Cholinergic Déficits. **Neurochemistry**. v. 64, p. 749-760, 1995.

BLUNT, S. B.; CHEN, T. B.; WIEMER, D. F. Prenylated benzoic acids from *Rapanea myricoides*. **Journal of Natural Products**. v. 6, n. 11, p. 1400-1403, 1998.

BÜRGER, C. ; GALVAN, F. ; MONTEIRO, E.R. ; FRONZA, L. M. ; MALHEIROS, A. ; SOUZA, M. M. . Effects antinociceptive of myrsinoic acid B in two rat models for painful diabetic neuropathy. In: **39º congresso brasileiro de farmacologia e terapêutica experimental**, 2007, ribeirão preto- SP. programa do 39º congresso brasileiro de farmacologia e terapêutica experimental, 2007.

BUTLER, M. S. Reviews: Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**. v. 25, p. 475-516, 2008.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. **Neurobiology of Aging**. v. 18, p. 351-357, 1997.

BROOKMEYER, R.; GRAY, S.; KAWAS, C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. **American Journal of Public Health**. v. 88, p. 1337-1342, 1998.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras, recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: Embrapa/CNPQ, 1994. 640 p.

CECHINEL F., V., YUNES, R. A. Breve Análise Histórica da Química de Plantas Medicinais: sua Importância na Atual Concepção de Fármaco Segundo os Paradigmas Ocidental e Oriental. In: **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p. 18-46.

CHAVES, M.B; FERREIRA, T.A.A. Terapia medicamentosa da Doença de Alzheimer. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, p. 1-7, 2008.

CHOUDHARY MI.; YOUSUF S.; NAWAS SA.; AHMED S.; ATTA-UR-RAHMAN. Cholinesterase inhibiting withanolides from *Withania somnifera*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 52, p. 1358-1361, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.

COSTA, A. F. **Farmacognosia: farmacognosia experimental**. 3 ed. Lisboa: Editora Fundação Clouste Gulbenkian, 2000, p. 130.

COSTA NETO, C. **Análise Orgânica: métodos e procedimentos para caracterização de organoquímicos**. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 2004, p. 547-728.

COYLE, JT.; PRICE, DL.; DELONG, MR. Alzheimer's diseases: a disorder of cholinergic innervations. **Science**. v. 219, p. 1184-1190, 1983.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversidade um componente essencial na descoberta de fármacos. In: YUNES, R. A., CECHINEL, V. F. **Química de produtos**

naturais, novos farmacos e a moderna farmacognosia. 2 ed. Itajaí: UNIVALI, 2009, p. 51-79.

CRAGG, G.; NEWMAN, D. J. Natural Products as Source of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural products.** v. 70, p. 461-477, 2007.

DONG, M.; NAGAOKA, M.; MIYAZAKI, S.; IRIYE, R.; HIROTA, M. 3-Geranyl-4-hydroxy-5-(3'-methyl-2''-butenyl)benzoic acid as an anti-inflammatory compound from *Myrsine seguinii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** v. 63, n. 9, p. 1650-1653, 1999.

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

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

FAMING ZHUANLI SHENQING GONGKAI SHUOMINGSHU. A Chinese medicinal liquor for treating traumatic injury and rheumatism. WANG, H. **Patent CN 1762443,** 2006.

FAMING ZHUANLI SHENQING GONGKAI SHUOMINGSHU. A medicine for treating gynecological diseases and its preparation method. FRANG, M. **Patent CN 1569145,** 2005.

FENNEL, C.W.; STADEN, J. *Crinum* species in traditional and modern medicine. **Journal Ethnopharmacology.** v. 78, p. 15-26, 2001.

FERHEEN S.; AHMED E.; AFZA N.; MALIK A.; SHAN M.R.; NAWAS S.A.; CHOUDHARY MI. Haloxylines A and B, antifungal and cholinesterase inhibiting piperidine alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. **Chemical Pharmaceutical Bulletin.** v. 53, p. 570-572, 2005.

FILLEY, C. M. Alzheimer's disease: it's irreversible but not untreatable. **Geriatrics,** v. 50, p. 18-23, 1995.

FORLENZA, O.V. Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease. **Revista de Psiquiatria Clinica.** v. 32, n. 3, p. 137-148, 2005.

FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; JUNIOR, C.V.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Natural aproducts as Candidates For Drugs in The Treatment of Alzheimer's Disease. **Química Nova.** V. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

FREITAS, Elisabete Viana e colaboradores. **Tratado de Geriatria e Gerontologia.** Guanabara Koogan, 2002.

GALVAN, F. ; MONTEIRO, E.R. ; FRONZA, L. M. ; MALHEIROS, A. ; BÜRGER, C. ; SOUZA, M. M. Antinociceptive Effect Of *Rapanea Ferruginea* And Myrsinoic Acid B In a Rat Model For Painful Diabetic Neuropathy. In: **6th International congress of pharmaceutical sciences**, 2007, ribeirão preto. Livro de resumos do 6th International congress of pharmaceutical sciences, 2007.

GOATE, A.; CHATIER-HARLIN, M.; MULLAN, M. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. **Nature**. v. 349, p. 704-706, 1991.

GURIB-FAKIM, A. Review: Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HARDEN, G. J. Myrsinaceae. In: **Flora of New South Wales**. Kensington: New South Wales University Press. V. 1, p. 501-504, 1990.

HESS, S. **Atividade antinociceptiva do ácido mirsinóico B**. Itajaí, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI.

HIROTA, M.; MIYAZAKI, S.; MINAKUCHI, T.; TAKAGI, T.; SHIBOTA, H. Myrsinoic acids B, C and F, anti-inflammatory compounds from *Myrsine seguinii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 66, n.3, p. 655-659, 2002.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. **Preparative Chromatography Techniques: applications in Natural Product Isolation**, 2° ed, cap. 4, p. 33-49, 1997.

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

HOUGHTON PJ.; AGBEDAHUNSI JM.; ADEGBULUGBE A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. **Phytochemistry**. v. 65, p. 2893-2896, 2004.

IIDA, I.; TAMURA, T.; MATSUMOTO, T. Proton nuclear magnetic resonance identification and discrimination of side chain isomers of phytosterols using a lanthanide shift reagent. **Journal of Lipid Research**. v. 21, p. 326-338, 1980.

INGKANINAN, K.; BEST, C.M.; HEIDJEN, R.; HOFTE, A.J.P.; KARABATAK, B.; IRTH, H.; TJADEN, U.R.; GREEF, J.; VERPOORTE, R. High performance liquid chromatography with on line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. **Journal of Chromatography A**. v. 872, p. 61-73, 2000.

ITO, S.; NARISE, A.; SHIMURA, S. Identification of a methioninase inhibitor, myrsinoic acid B, from *Myrsine seguinii* Lév., and its inhibitory activities. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. V. 72, n. 9, p. 2411-2414, 2008.

JANUÁRIO, A. H.; DAS F. M.; SILVA F. G.; VIEIRA P. C.; FERNANDES B. J. Dammarane and cycloartane triterpenoids from three *Rapanea* sp. **Phytochemistry**. v. 31, n. 4, p.1251-1253, 1992.

KHALLOUKI, F; YOUNOS, C; SOULIMANI, R; OSTER, T; CHARROUF, Z; SPIEGELHALDER, B; BARTSCH, H; OWEN, R. W. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. **European Journal of Cancer Prevention**. v. 12, p. 67–75, 2003.

KATZMAN R. Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*. V. 314, p. 964-973, 1986.

KILLER, B. Mental health and substance abuse. Agost. 2006. Disponível em: <http://www.searo.who.int/EN/Section1174/Section1199/Section1567/Section1823_8066.htm>. Acesso em: 07. fev. 2009.

LANCTÔT, K.L. HERRMANN, N.; YAU, K.K.; KHAN, L.R.; LIU, B.A.; LOULOU, M.M.; EINARSON, T.R. Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's diseases: a meta analysis. **Canadian Medical Association or its licensors**. v. 16, p. 557-564, 2003.

LEE, J.H.; LEE, K.T.; YANG, J.H.; BAEK, N.I.; KIM, D.K. Acetylcholinesterase inhibitors from the twigs of *Vaccinium oldhami* Miquel. **Archives of Pharmacal Research**. v. 27, n. 1, p. 53-56, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. V. I. 3 ed. Editora: Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, 2000.

MAKABE, H.; MIYAZAKI, S.; KAMO, T.; HIROTA, M. Myrsinoic acid E, an anti-inflammatory compound from *Myrsine seguinii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 67, n. 9, p. 2038-2041, 2003.

MANGURO, L.O.A.; MIDIWO, J.O.; KRAUS, W. Triterpenoids and steroids of *Myrsine africana* leaves. **Planta Médica**. v. 63, n. 3, p. 290, 1997.

MANGURO, L.O.A.; MIDIWO, J.O.; KRAUS, W.; UGI, I. Benzoquinone derivatives of *Myrsine africana* and *Maesa lanceolata*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 855-862, 2003.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitions in plants. **Phytochemical Analysis**. v. 13, p. 51-54, 2002.

MARUM, R. J. V. Current and future therapy in Alzheimer's disease. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 22, p. 265-274, 2008.

MATTOS, F.B. **Análise do efeito hipoglicemiante do extrato bruto da planta**

Rapanea sp. sobre a glicemia de animais hiperglicêmicos. 2006. 57 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação)-Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

MCMURRY, J. **Química Orgânica.** 6 ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2005.

MIDIWO, J. O.; GHEBREMESKEL, Y. Benzoquinones in Kenyan Myrsinaceae: Melanphlone- a new symmetrical long alkyl side chain bisbenzoquinone from *Rapanea melanphloes* (L), Mez., **International Journal of Biochemiphysics.** v. 2, n. 1-2, p. 117-18, 1993.

MIDIWO, J.; MWANGI, R.W.; GHEBREMESKEL, Y. Insect antifeedant, growth-inhibiting and larvicidal compounds from *Rapanea melanphloes* (Myrsinaceae). **Insect Science and Its Application**, v. 16, n. 2, p. 163-166, 1995.

MIZUSHINA, Y.; MIYAZAKI, S; IRIYE, R.; HIROTA, M. Novel anti-inflammatory compounds from *Myrsine seguinii*, terpeno benzoic acids are inhibitors of mammalian DNA polymerase. **Biochimica et Biophysica Acta General Subjects.** v. 1475, p. 1-4, 2000.

MONTEIRO, E.R. ; FRONZA, L. M. ; BÜRGER, C. ; MALHEIROS, A. Isolamento de derivados de ácidos benzóicos das cascas de *Rapanea sp.* In: **VII Jornada Farmacêutica da Univali, II simpósio ibero-americano de plantas**, 2007, Itajaí. VII Jornada Farmacêutica da Univali, II simpósio ibero-americano de plantas, 2007.

MONTEIRO, E.R. ; MALHEIROS, A. ; YUNES, R. A. ; BÜRGER, C. . Myrsinoic acid B (MAB), a compound from *Rapanea ferruginea* with anti-hyperglycemic activity. In: XX simpósio de plantas medicinais do Brasil; X international congress of ethnopharmacology, 2008, São Paulo. Programa do XX simpósio de plantas medicinais do Brasil; X international congress of ethnopharmacology, 2008. p. 115-115.

NEVE, D. L.; McPHIC, Y. C. Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. **Brain Research.** v. 886, p. 54, 2000.

NEUROPATOLOGIA. Disponível em: <www.neuropatologia.pt>. Acesso em: 03. Fev. 2009.

NEWHOUSE, PA. Alzheimer's disease and the cholinergic system: an introduction to clinical pharmacological research. In Heston LL (ed). Progress in Alzheimer's disease and similar conditions. **Washington DC: American Psychiatric Press.** p. 213-231, 1997.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; FILHO, V. C. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: CECHINEL, V. F., BRESOLIN, T. M. B. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.** Itajaí: UNIVALI, 2003, p. 11-56.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. In: CECHINEL, V. F. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2 ed. Itajaí: UNIVALI, 2009, p. 239-257.

NORDBERG, A.; CARLSON, LA.; WINBLAD, B. Biological markers and the cholinergic hypothesis in Alzheimer's diseases. **Acta Neurologica Scandinavica**. v. 85, p. 54-58, 1992.

OLIVEIRA, A. E. ; MATTOS, F. B. ; STIEVEN, C. ; YUNES, R. A. ; MALHEIROS, A. ; BÜRGER, C. . **Effect of oral administration of Rapanea ferruginea on blood glucose levels in alloxan-treated diabetic rats**. In: 39º congresso brasileiro de farmacologia e terapêutica experimental, 2007, ribeirão preto- SP. Programa do 39º congresso brasileiro de farmacologia e terapêutica experimental, 2007.

OSPINA, L.F.; CALLE, J.; ARTEAGA, L.; PINZON, R.; ALCARAZ, M.J.; PAYA, M. Inhibition of acute and chronic inflammatory responses by the hydroxybenzoquinonic derivative rapanone. **Planta Médica**. v. 67, n. 9, p. 791-795, 2001.

PENG, L.F. Acetylcholinesterase inhibition by territrem B derivatives. **Journal Natural Products**. v. 58, p. 857-862, 1995.

PEREIRA, S. ; TESTONI, B.L. ; GIGLIO, K.C. ; A., Y. R. ; De SOUZA, M. M. ; MALHEIROS, A. Isolamento do Ácido Benzoico Prenilado da Rapanea sp. Avaliação da atividade Antinociceptiva do Extrato e do Composto Isolado. In: II Encontro de Pesquisa em Saúde : o SUS e a atenção á saúde da família, 2004, Itajaí. **Anais**. Itajaí : UNIVALI, 2004. v. 1. p. 181-181.

PEREIRA, M.E.; ADAMS, A.I.H.; SILVA, N.S. 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity *in vitro*. **Toxicology Letters**. v. 146, p. 269–274, 2004.

PERRY, E.K. The Cholinergic Hypothesis-Ten Years on. **British Medicinal, Bulletin**, v. 42, p. 63-69, 1986.

QUOC-TRUAN, D.; BERNARD, P. Pharmacognosy and reverse pharmacognosy: A new concept for accelerating natural drug discovery. **Drugs**. v. 7, n. 11, p. 1-11, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RUTTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

REISBERG, B.; DOODY, R.; STOFFLER, A.; SCHMITT, F.; FERRIS, S.; MOBIUS, H.J.; MEMANTINE STUDY GROUP. Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**. v. 348, p. 1333-1341, 2003.

RHEE, I.K.; MEENT, M.V.; INGKAMINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Mamyryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity stainin. **Journal of Chromatografy A**. v. 915, p. 217-223, 2001.

RHEE, I.K.; APPELS, N.; HFTE, B.; KARABATAK, B.; ERKELENS, C.; STARK, L.M.; FLIPPIN, L.A.; VERPOORTE, R. Isolation of the acetylcholinesterase inhibitor ungeremine from *Nerine bowdenii* by preparative HPLC coupled on line to a flow assay system. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 27, p. 1804-1809, 2004.

RODDICK JG. The acetylcholinesterase inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. **Phytochemistry**. v. 28, p. 2631-2634, 1989.

SMART IMAGEBASE. Scientific & Medical art. Disponível em: <http://www.ebscostandard.smartimagebase.com>. Acesso em: 07. Fev. 2009.

SANCHOTENE, M. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre: FEPLAM, 1985. p. 311.

SCHRÖDER, H.; WEVERS, A. Nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's diseases. **Alzheimer disease and associated disorders**. v. 3, p. 20-27, 1998.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, S. A., 1994, p. 387.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003.

SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookmann. 2002. p. 621-647.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

TARIOT, P. N.; FARLOW, M. R.; GROSSBERG, G. T.; GRAHAM, S. M.; McDONALD, S.; GERGEL, I.; MEMANTINE STUDY GROUP. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**. v. 291, p. 317-324, 2004.

TERRY, R. D.; HANSEN, L. A.; DETERESA, R.; DAVIES, P. TOBIAS, H. KATZMAN, R. Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**. v. 46, p. 262, 1987.

TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V. Screening for Acetylcholinesterase inhibitors from plants to treat Alzheimer's Disease. **Química Nova**. v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003

TREVISAN, M.T.S.; BEZERRA, M.Z.B.; SANTIAGO, G.M.P.; VEPOORTE, R.; FILHO, R.B. Larvicides and Acetylcholinesterase inhibitors from *Kalanchoe* species. **Química Nova**. v. 29, n. 3, p. 415-418, 2006.

TURMINA, M. **Estudos fitoquímicos com as cascas da *Rapanea sp.*** 2005. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação)-Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

WAGNER, H. Pesquisa fitomédica do novo milênio: tendência e mudanças. In: CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.: **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2 ed. Itajaí: UNIVALI, 2009, p. 31-47.

WHITEHOUSE, PJ.; PRICE, DL.; STRUBLE, RG.; CLARCK, AW.; COYLE, JT.; DELONG, MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. **Science**. v. 215, p. 1237-1239, 1982.

WINBLAD, B.; PORITIS, N. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). **International Journal of Geriatric Psychiatry**. v. 14, p. 135-146, 1999.

ZHONG, X.N.; OTSUKA, H.; IDE, T.; HIRATA, E.; TAKUSHI, A.; TAKEDA, Y. Three flavonol glycosides leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**. V. 46, n. 5, p. 943-946, 1997.

ZHONG, X.N.; IDE, T.; OTSUKA, H.; HIRATA, E.; TAKEDA, Y. (+)-isolarisiresinol 3a-O-sulphate from leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**. v. 49, n. 6, p. 1777-1778, 1998a.

ZHONG, X.N.; OTSUKA, H.; IDE, T.; HIRATA, E.; TAKUSHI, A.; TAKEDA, Y. Hidroquinone glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**. v. 49, n. 7, p. 2149-2153, 1998b.

ZHONG, X.N.; OTSUKA, H.; IDE, T.; HIRATA, E.; TAKEDA, Y. Hidroquinone diglycoside acyl esters from the leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**. v. 52, p. 923-927, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)