

Miguel António Taveira Franco Sousa Arruda

“*Ciências Biomédicas*”

**Pesquisa de inibidores da
Acetilcolinesterase em *Hedychium
gardnerianum* dos Açores**



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS E DESENVOLVIMENTO

Ponta Delgada

2010

Miguel António Taveira Franco Sousa Arruda

**Pesquisa de inibidores da
Acetilcolinesterase em *Hedychium
gardnerianum* dos Açores**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas

**Trabalho efectuado sob a orientação da:
Professora Doutora Maria do Carmo Barreto**



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS E DESENVOLVIMENTO

Ponta Delgada

2010

Dedicatória

À Minha filha Lara Sofia,

A quem dedico esta dissertação, por ser o pilar de toda a minha vida, e por dar-me alegria e força para chegar onde actualmente cheguei e espero chegar no futuro...

Agradecimentos

Esta dissertação não teria sido possível sem a contribuição e disponibilidade de diversas pessoas que trabalharam comigo neste último ano. Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que este trabalho fosse realizado. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

- ✚ À Professora Doutora Maria do Carmo Barreto, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos, por me acolher no seu laboratório, desde o tempo da licenciatura, acreditando sempre no meu trabalho e na minha capacidade mesmo nos momentos mais difíceis. As notas dominantes da sua orientação foram a utilidade das suas recomendações e a cordialidade com que sempre me recebeu. Estou grato por ambas. A liberdade de acção em termos académicos e laboratoriais permitiu de forma decisiva o meu desenvolvimento pessoal e não apenas académico;
- ✚ Ao Professor Doutor José Silvino Rosa, tendo me aberto horizontes, ensinou-me principalmente a pensar. Foi fundamental, a transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus pequenos sucessos. Isto foi possível graças a diversos pequenos projectos de investigação paralelos a esta dissertação, sendo importante referir que o mesmo recebeu-me sempre com agrado no seio da sua equipa de trabalho;
- ✚ Ao Professor Doutor Luís Silva pelo auxílio, dedicação e colaboração, quer na análise estatística quer na componente ecológica da planta em estudo;
- ✚ Ao meu irmão, Dr. Rafael Arruda pela amizade constante demonstrada durante toda a minha vida, sendo que a mesma passa muito para além dos meros laços sanguíneos. É importante referir o seu apoio constante na concretização desta, e de outras etapas académicas que já concluí até ao momento desta dissertação;
- ✚ Ao Dr. Hugo Viana pelo incentivo amigo, pelo apoio, pelos conselhos e pelo tempo que despendeu para me ajudar na realização dessa dissertação em vários domínios. Como amigo, foi desde o primeiro dia um exemplo para a definição do mesmo adjectivo;
- ✚ Queria também deixar um agradecimento muito especial, ao Dr. Nuno Rainha, à Dr.^a Tânia Teixeira, à Dr.^a Joana Medeiros à Dr.^a Vera Gouveia, Dr.

Bruno Gonçalves, à Dra. Alexandra Pacheco, pela disponibilidade e por todo o apoio demonstrado na execução dessa dissertação;

- ✚ À Senhora Helena Figueiredo e ao Senhor Roberto Resendes, por todo o auxílio técnico e amizade demonstrada;
- ✚ Aos amigos Sara Bulhões, Mário Teixeira, Simone Simões, Maria da Conceição Araújo, José Edson, Diana Pina, Elisabete Borges, Emanuel Ferreira, Carla Arruda, Lúcia Fernandes, Ana Fernandes, por terem compartilhado comigo, de alguma forma, de todos os momentos de conquistas, frustrações e cansaço e, por acima de tudo, entenderem esses meus sentimentos;
- ✚ Deixo também uma palavra de agradecimento aos professores da UAC e à Directora do Mestrado Professora Doutora Manuela Lima, por me terem transmitido o interesse por todas as áreas de investigação e do conhecimento científico em geral;
- ✚ São também dignos de uma nota de apreço os colegas de todos os cursos que já concluí na UAC, os mesmos acompanharam-me pela boa disposição com que realizámos os muitos trabalhos em conjunto;
- ✚ Estou muito grato a todos os meus familiares pelo incentivo recebido ao longo destes anos, pelo apoio financeiro, por investirem e acreditarem em mim, pela motivação, carinho e compreensão que sempre demonstraram. O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente;
- ✚ Por último e não menos importante, à Achada, humilde freguesia do concelho do Nordeste, por todos os momentos que me proporcionou desde a infância, pela sua riqueza paisagística e pelas pessoas. Freguesia que homenageio com enorme orgulho.
- ✚ A todos que não referenciei, por lapso ou esquecimento, o meu muito obrigado!

Um bem-haja a todos!

Índice

1.	Revisão Bibliográfica	1
1.1.	Enquadramento do local de estudo	2
1.1.1.	Geografia e Clima	2
1.1.2.	Panorâmica geral da flora Açoriana	4
1.2.	<i>Hedychium gardnerianum</i> Sheppard ex Ker Gawl.	7
1.3.	Metabolitos secundários	10
1.3.1.	Óleos essenciais	11
1.3.1.1	Constituintes dos Óleos essenciais	13
1.3.1.2	Propriedades terapêuticas dos óleos essenciais	20
1.4.	Doença de Alzheimer	21

1.4.1.	Principais alterações cerebrais no cérebro com a DA	24
1.5.	Acetilcolina e a sua importância no sistema nervoso	27
1.6.	Colinesterases	29
1.6.1.	Acetilcolinesterase (AChE) (E.C. 3.1.1.7)	29
1.6.2.	Estrutura da acetilcolinesterase	29
1.6.3.	Mecanismo de acção	30
1.6.4.	Inibidores de Acetilcolinesterase	34
1.7.	Pesquisa de novos candidatos de origem natural para o tratamento da DA	41
2.	Material e Métodos	43
2.1.	Material Vegetal	43
2.2.	Preparação dos extractos	45
2.2.1	Extractos metanólico e diclorometânico	45

2.2.2.	Extracção e fraccionamento do extracto diclorometânico	46
2.2.3.	Extracção dos óleos essenciais	47
2.3.	Determinação da actividade da Acetilcolinesterase	49
2.3.1.	Determinação da percentagem de inibição da Acetilcolinesterase.	50
2.3.2.	Determinação do tipo de inibição	51
2.4.	Análise Estatística	52
3.	Resultados	53
3.1.	Inibição da actividade anticolinesterásica em diversas partes da planta	53
3.2.	Variação da actividade anticolinesterásica com o local de crescimento da planta	56
3.3.	Actividade anticolinesterásica de fracções dos extractos DCM de folhas maduras	61
3.4.	Caracterização do tipo de inibição da Acetilcolinesterase	62
4.	Discussão	71

5.	Conclusão	73
6.	Perspectivas de trabalho futuro	74
7.	Referências Bibliográficas	74

Anexo I

Anexo II

Objectivos

Fazendo os Açores parte de uma região rica do ponto de vista ecológico, no que diz respeito a vegetação, e havendo cada vez maior interesse no estudo da sua biodiversidade, quer do ponto de vista comercial quer do ponto de vista académico, é importante referir que mais de 50% dos medicamentos introduzidos no mercado nos últimos 20 anos foram derivados, directa ou indirectamente, a partir de moléculas de origem natural, geralmente compostos de defesa dos organismos.

A síntese de produtos secundários com actividade de inibição da acetilcolinesterase confere a uma planta, alga ou invertebrado sésil a capacidade de resistir à predação, ao interferir com a transmissão dos impulsos nervosos nos seus possíveis predadores. Estes organismos são assim os mais lógicos para procurar moléculas com esta actividade biológica.

Hedychium gardneranum é um exemplo duma planta que aparenta um interessante arsenal de defesas contra insectos e moluscos, uma vez que as suas folhas raramente apresentam sinais de predação. Deste modo, seleccionou-se esta planta como modelo para a pesquisa de inibidores da acetilcolinesterase.

O objectivo geral dessa dissertação de mestrado foi contribuir para a descoberta de novas substâncias naturais com potencial anticolinesterásico em diferentes extractos da planta, bem como de fracções isoladas a partir duma dessas fracções, e caracterização do tipo de inibição dos extractos e fracções mais activos.

Abreviaturas

A β	β -amilóide
Abs	Absorvância
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChEI	Anticolinesterásicos
AchI	Iodeto de acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
APP	Proteína precursora amilóide
BACE	β -secretase
BChE	Butirilcolinesterase
BSA	Albumina de soro bovino
ChAT	Colina acetiltransferase
DA	Doença de Alzheimer
DCM	Diclorometano (ou CH ₂ Cl ₂)
DMSO	Dimetilsulfóxido (ou (CH ₃) ₂ SO)
DTNB	Reagente de Ellman (ou ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico))
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPP	E,E-farnesilo
GC-MS	Cromatografia gasosa-espectrometria de massas
GPI	Glicofosfolípido
IC ₅₀	Metade da máxima concentração inibitória
IPP	Isopentenilo
K _m	Constante de Michaelis-Menten

MeOH	Metanol (ou CH ₃ OH)
PS - γ	Preseleína- γ -secretase
sAPP α	Fragmentos solúveis da APP
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i>
SAR	<i>Structure-Activity Relationships</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (ou Erro Padrão)
<i>Tau</i>	Proteína associada ao microtúbulo
U	Unidades de enzima
<i>Vmax</i>	Velocidade máxima

Resumo

Os inibidores da acetilcolinesterase são o tratamento principal da doença de Alzheimer, uma patologia multifactorial, neurodegenerativa progressiva caracterizada por alterações nas funções cognitivas como a aprendizagem e a memória, bem como alterações comportamentais. As espécies vegetais são excelentes fontes de substâncias naturais com actividade potencial anticolinesterásica, destacando-se alcalóides como a galantamina e huperzine A, como a principal classe de inibidores. Várias espécies de *Hedychium* são amplamente utilizadas na medicina tradicional. *Hedychium gardnerianum*, conhecido como "conreira" nos Açores, foi introduzida a partir dos Himalaias, onde é nativa, em meados do século XIX, e encontra-se difundida em todas as ilhas dos Açores. Como parte do estudo cujo objectivo principal é a descoberta do potencial utilização de espécies invasoras açorianas, foram avaliadas propriedades de inibição da acetilcolinesterase (Anti-AChE) de *H. gardnerianum*.

Na parte preliminar deste trabalho, foi estudado o poder relativo Anti-AChE de diferentes partes da planta. Os extractos metanólicos e diclorometânicos de folhas jovens, folhas maduras, caules, rizomas, sementes e frutos foram analisados usando uma modificação do método de Ellman. Os melhores resultados foram registados nos extractos diclorometânicos e metanólicos de folhas maduras, com $IC_{50}=0,74$ mg/mL e $0,86$ mg/mL, respectivamente. Continuando nosso estudo e utilizando uma metodologia de ensaio bio-guiado de Anti-AChE, a fracção mais activa (diclorometano de folhas maduras) foi fraccionada pela sua solubilidade em hexano e hexano: diclorometano (1:1) e por cromatografia em coluna eluída com hexano: acetato de etilo em várias proporções até que uma fracção semi-purificada foi obtida, sendo esta mais activa que o extracto original ($IC_{50}=0,30 \pm 0,04$ mg/mL)

Subsequentemente, foi estudada a variação da potência anti-AChE com a localização geográfica, em que foram colectadas *H. gardnerianum* no local anteriormente descrito, assim como noutros três locais. Foram preparados, extractos diclorometânicos e metanólicos e óleos essenciais de folhas maduras, uma vez que estas eram as que apresentavam maior actividade na parte inicial deste estudo.

Curiosamente, a actividade anti-AChE superior destes extractos diclorometânicos foi superior à obtida para as plantas colhidas na primeira parte deste estudo, com um IC_{50} entre $0,28$ e $0,41$ mg/mL, respectivamente. Este valor é inferior ao α -pineno, um composto frequentemente citado como um forte inibidor desta enzima

($IC_{50} = 1,43$ mg/mL) e da mesma ordem de grandeza do ácido ursólico ($IC_{50} = 0,185$ mg/mL), outro inibidor da AChE. A actividade dos extractos de metanol foi muito menor. Não se verificaram grandes diferenças entre os locais embora o extracto diclorometânico de Fogo foi significativamente menos activo que os extractos dos outros três sites ($P = 0,05$). Os óleos essenciais de todos os locais também inibiram a AChE, embora em graus diferentes, com valores de IC_{50} entre 1,03 e 1,37 mg/mL, o que significa que eram menos activos do que os extractos diclorometânicos, mas ainda bastante activo e comparáveis com o valor de α -pineno.

Finalmente, foi efectuada uma tentativa para caracterizar o tipo de inibição dos extractos diclorometânicos e óleos essenciais, uma vez que os inibidores competitivos reversíveis são preferíveis como agentes terapêuticos. Como seria de esperar em misturas, destacou-se um padrão misto de inibição na maioria dos casos, embora o extracto diclorometânico de Furnas e óleo essencial de Achada fossem quase exclusivamente competitivos.

Os resultados obtidos mostram a viabilidade da utilização de *Hedychium gardnerianum* como uma excelente fonte de inibidores da acetilcolinesterase. Os compostos activos responsáveis por este efeito parecem ser de natureza apolar, como evidenciado tanto nos extractos diclorometânicos como nos óleos essenciais.

Abstract

Acetylcholinesterase inhibitors are the primary treatment of Alzheimer's disease, a multifactorial, progressive neurodegenerative disorder characterized by changes in cognitive functions like learning and memory, as well as behavioural changes. Plant species are excellent sources of natural substances with potential anticholinesterase activity and alkaloids, such as galantamine and huperzine A, stand out as the major class of inhibitors. Several species of *Hedychium* are used widely in traditional medicine. *Hedychium gardnerianum*, known as “coniteira” in the Azores, was introduced from its native Himalayas in the middle of the 19th century, and is widespread on all Azorean Islands. As part of a study whose main objective is the discovery of potential commercial uses of azorean invasive species, the acetylcholinesterase inhibition (Anti-AChE) properties of *H. gardnerianum* was assessed.

In the preliminary part of this work, the relative Anti-AChE power of different parts of the plant was studied. The methanol and dichloromethane extracts from young leaves, mature leaves, stems, rhizomes, seeds and fruits were assayed using a modification of the Ellman method. The best results were recorded for the dichloromethane and methanol extracts of mature leaves with $IC_{50} = 0.74$ mg/mL and 0.86 mg/mL, respectively. Continuing our study and using an Anti-AChE bio-guided assay methodology, the most active fraction (dichloromethane extract from mature leaves) was fractionated by its solubility on hexane and hexane:dichloromethane (1:1) and by column chromatography eluted with hexane:ethyl acetate in several proportions until a semi-purified fraction more active than the original extract ($IC_{50} = 0.30 \pm 0.04$ mg/mL) was obtained.

Subsequently, the variation in Anti-AChE potency with geographic location was studied. *H. gardnerianum* were collected on the same location as previously and also on other three sites. Dichloromethane and methanol extracts, and essential oils from mature leaves were prepared, since these were where the highest activity was previously found. Interestingly, the Anti-AChE activity of these dichloromethane extracts was higher than in the plants collected in the first part of this study, with IC_{50} between 0.28 and 0.41 mg/mL, respectively. This is lower than α -pinene, a compound often cited as a strong inhibitor of this enzyme ($IC_{50} = 1.43$ mg/mL) and of the same order of magnitude as

ursolic acid ($IC_{50}=0.185$ mg/mL), another Anti-AChE inhibitor. The activity of methanol extracts was much lower. Differences between sites were not very high, although the dichloromethane extract from Fogo was significantly less active than extracts from the other three sites ($P=0.05$). The essential oils fractions from all the sites also inhibited AChE, although in different extents, with IC_{50} values between 1.03 and 1.37 mg/mL, which means they were less active than dichloromethane extracts but still quite active and comparable to the value for α -pinene.

Finally, an attempt was made to characterize the inhibition type of the dichloromethane extracts and essential oils, since ideally reversible competitive inhibitors are preferable as therapeutic agents. As would be expected in mixtures, a mixed pattern of inhibition was detected in most of the cases, although the dichloromethane extract from the Furnas and the essential oil from the Achada were almost truly competitive.

The obtained results show the feasibility of using *Hedychium gardnerianum* as an excellent source of acetylcholinesterase inhibitors. The active compounds responsible for this effect appear to be nonpolar in nature, as evidenced both in dichloromethanic extracts or essential oils.

1. Revisão Bibliográfica

Pesquisa de compostos com actividade farmacológica

Desde a antiguidade, o homem utiliza plantas para a cura de patologias, para o controlo de insectos e para a conservação de corpos. Estas propriedades das plantas foram descobertas por acaso e, em muitos casos, têm vindo a ser comprovadas pela ciência. Em diversas partes das plantas podem ser encontrados princípios activos importantes, sintetizados por metabolismo secundário das plantas e que podem ser substâncias como alcalóides, flavonóides, cumarinas, saponinas, terpenos e seus derivados, entre outros. Uma das classes mais importante é a constituinte dos óleos essenciais, compostos voláteis que, quando secretados pelas plantas, agem como sinais químicos para a comunicação entre espécies, protecção contra microrganismos, herbívoros e condições ambientais (Lima, 2006; Freire, 2008).

Nos países em desenvolvimento a falta de saneamento básico, desnutrição e dificuldade de acesso aos medicamentos são parcialmente compensadas pela prática da fitoterapia (Moreschi *et al.*, 2005). Entre as plantas medicinais mais utilizadas pelas populações, poucas têm acção comprovada. Contudo, o uso popular tradicionalmente consolidado tem sido utilizado como guia para pesquisas farmacológicas. Estas pesquisas têm levado muitas vezes à identificação das substâncias responsáveis pelos efeitos terapêuticos, constituindo o ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos; a estas substâncias é dado o nome de princípio activo (Nappi & Vass, 2002; Caetano *et al.*, 2003).

Outra estratégia para a descoberta de compostos com actividade farmacológica é a investigação de plantas que sejam particularmente resistentes à herbivoria e à acção de fungos e bactérias, uma vez que esta resistência lhes é provavelmente conferida pela existência de produtos secundários com actividade biológica. Por outro lado, quando estamos em presença de plantas pertencentes a grupos conhecidos pela sua riqueza em compostos secundários, a probabilidade de se encontrar substâncias de interesse aumenta.

Foram as características referidas no parágrafo anterior que levaram à selecção de *Hedychium gardnerianum*, uma planta invasora no arquipélago dos Açores, como alvo ideal para a pesquisa de compostos com actividade biológica, em particular de actividade de inibição da Acetilcolinesterase.

Para contextualizar adequadamente o trabalho realizado, a Revisão bibliográfica inicia-se com um breve enquadramento geográfico, climático e florístico dos Açores. Segue-se uma revisão bibliográfica da informação existente acerca de *Hedychium gardnerianum* e de plantas da mesma família. Em seguida, apresenta-se uma abordagem aos Metabolitos Secundários, quer do ponto de vista das suas vias biossintéticas, quer da sua composição, dando-se particular ênfase aos constituintes dos óleos essenciais. Finalmente, é feita uma síntese à doença de Alzheimer e ao papel dos inibidores da Acetilcolinesterase na sua terapêutica.

1.1. Enquadramento do local de estudo

1.1.1. Geografia e Clima

O Arquipélago dos Açores, assim como os arquipélagos da Madeira, Canárias e Cabo Verde, encontra-se na região geográfica da Macaronésia (Schäfer, 2003). Localiza-se em pleno Oceano Atlântico entre as coordenadas 36° 55' e 39° 45' de latitude Norte e entre 25° 00' e 31° 15' de longitude Oeste (Constância *et al.* 1997). De origem vulcânica, emerge de uma área com forma grosseiramente triangular, denominada Plataforma dos Açores, definida pela batimétrica dos 2000 metros (Needham & Francheteau, 1974 *fide* Borges, 2003). A dinâmica geoestrutural do arquipélago é fortemente condicionada pelo facto de se encontrar na zona de confluência de 3 placas litosféricas (Africana, Americana e Euroasiática) - Ponto Triplo dos Açores - o que constitui um quadro geotectónico complexo (Borges, 2003). A terra continental mais próxima é o Cabo da Roca, em Portugal, a quase 1300 km de São Miguel, enquanto o Estreito de Gibraltar fica a 1320 km para sueste e a Terra Nova a cerca de 1730 km para noroeste (Morton *et al.*, 1998). O arquipélago é constituído por 9 ilhas, divididas em 3 grupos: o grupo oriental, com as ilhas de Santa Maria e São Miguel; o grupo central, com as ilhas da Terceira, Graciosa, São Jorge, Pico e Faial; e o grupo ocidental, com as ilhas das Flores e Corvo (Constância *et al.*, 1997). A maior distância entre as ilhas é de cerca de 620 km ao longo de uma linha noroeste-sueste (Constância *et al.* 1997; Morton *et al.* 1998). Estas têm dimensões e áreas bastante díspares, perfazendo no seu conjunto uma área de 2344 km² (Neto, 1997) e uma linha de costa de aproximadamente 844 km (Borges, 2003) (**Figura. 1.1**).

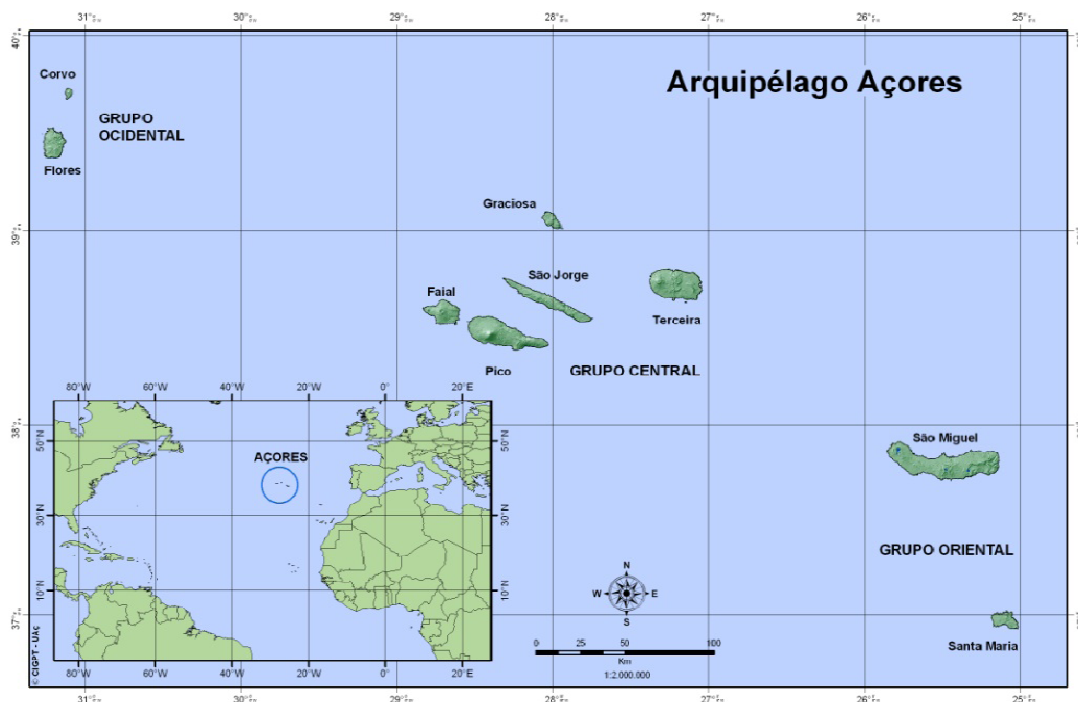


Figura. 1.1. Mapa do Arquipélago Açores (Fonte: Secção de Geografia, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores).

As condições meteorológicas do arquipélago dos Açores são fortemente marcadas pela sua localização na zona subtropical de anticiclones do hemisfério norte, mais concretamente sob a influência directa do anticiclone dos Açores (Borges, 2003).

O regime de marés na faixa costeira dos Açores é do tipo semi-diurno, ou seja com duas preiamares e duas baixa-mares bem marcadas, com amplitude média em águas vivas variando entre 1 e 1,3 metros, consoante a estação do ano (Borges, 2003).

A Ilha de São Miguel é a maior do arquipélago dos Açores com uma área de 747 km², sendo o comprimento e a largura máximos de 66 e 16 km, respectivamente. Possui a faixa costeira mais extensa do arquipélago, cerca de 213 km, o que corresponde a 25,3 % do litoral Açoriano (Borges, 2003) (*Figura 1.2.*).

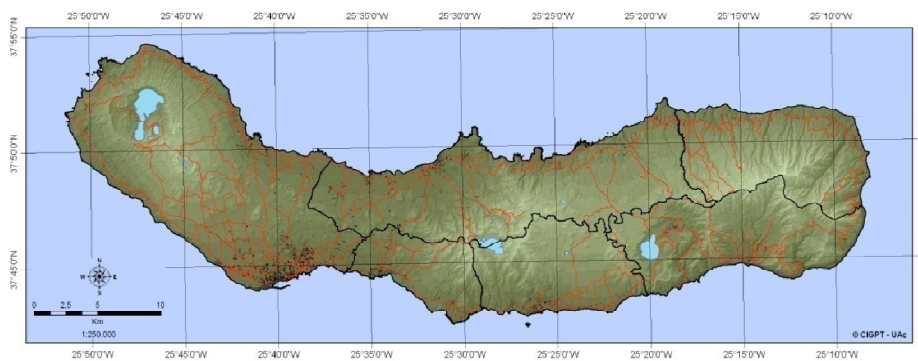


Figura. 1.2. Mapa da Ilha de São Miguel (Fonte: Secção de Geografia, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores).

As costas de São Miguel são variadas, indo de plataformas basálticas baixas a praias arenosas e elevadas falésias (Morton *et al.*, 1998). A ilha apresenta uma orientação Leste-Oeste, resultante dos condicionalismos tectónicos e vulcânicos existentes nesta região do Atlântico e a sua formação ocorreu ao longo de mais de quatro milhões de anos (Constância *et al.*, 1997). Em termos geomorfológicos é formada por duas áreas montanhosas de volumetria diferente, separadas por uma plataforma baixa (Região dos Picos). A mais pequena das regiões montanhosas situa-se no extremo ocidental da ilha e é formada pelo Maciço das Sete Cidades. A maior e mais complexa ocupa os 3/5 orientais da ilha e engloba, de poente para nascente, os Maciços do Fogo, das Furnas e da Povoação/Nordeste, onde se situa o ponto mais elevado da ilha (Borges, 2003) (**Figura. 1.2**)

1.1.2. Panorâmica geral da flora Açoriana

As primeiras referências ao coberto vegetal dos Açores são de Gaspar Frutuoso, na sua obra Saudades da Terra, escrita na segunda metade do séc. XVI. Embora estando a alguma distância do período de colonização, é bem evidente, nas descrições deste autor, o carácter inexplorado e denso da vegetação que cobria estas ilhas (Dias, 1996).

Desde cedo, a vegetação dos Açores despertou enorme interesse entre os naturalistas estrangeiros pela sua singularidade. O primeiro estudo botânico realizado por naturalistas estrangeiros deve-se a Seubert & Hochstetter (1843), seguindo-se os trabalhos de Seubert (1844), Watson (1844, 1847, 1870), Drouet (1866) e Trelease (1897). O fim dos anos 30 do século XX é rico em excursões aos Açores que descrevem as suas formações vegetais, algumas pela primeira vez. É também neste período que,

pela primeira vez, especialistas portugueses abordam este campo de explorações botânicas. No entanto esta movimentação deve-se apenas a duas equipas: a equipa Portuguesa, dinamizada pelo açoriano R. T. Palhinha e a equipa Francesa, liderada por P. Allorge (Dias, 1996).

Quando os primeiros colonos chegaram nos Açores, as ilhas eram quase completamente cobertas por uma variedade de florestas. Séculos de uma intensa e até descontrolada desflorestação, assim como a colheita de espécies de árvores com madeira considerada preciosa resultou numa diminuição considerável da floresta açoriana, tanto em termos quantitativos como qualitativos e até à extinção de espécies de árvores como *Taxus baccata* ou *Prunus lusitanica* ssp. *azorica* na maioria das ilhas (Schäfer, 2005).

Actualmente, a vegetação indígena só pode ser encontrada em alguns lugares inacessíveis, em crateras, falésias costeiras e em encostas montanhosas (Schäfer, 2005).

A vegetação de terreno pantanoso é mais comum, mas estas zonas são muitas vezes invadida por espécies americanas de *Hypericum* e para a plantação de *Criptomeria*. As florestas de laurissilva indígenas foram entretanto, seriamente afectadas pela influência humana (Schäfer, 2005).

A ideia que as ilhas e os habitats alterados são mais facilmente invadidos, baseia-se no pressuposto de que habitats com um menor número de espécies serão mais susceptíveis às invasões (Silva, 2008). No entanto, os estudos empíricos têm apresentado resultados contraditórios (Lavorel, 1999). Para além disso, a diferença em relação às ilhas será menos uma questão de vulnerabilidade, mas uma combinação de poucas espécies nativas, maior proporção de habitat alterado, e um maior entusiasmo pela introdução de exóticas no passado (Williamson, 1996). Além disso, as espécies continentais invadem comunidades insulares mais facilmente que vice-versa, apenas porque podem ter mais oportunidades para tal (Silva, 2008). Por outro lado, as comunidades poderão ser mais facilmente invadidas por espécies pertencentes a um tipo diferente (grupo funcional), não previamente representado (Lavorel, 1999). Nas ilhas tem-se verificado uma resistência mínima à invasão por certos grupos, capazes de explorar assim diversos nichos ecológicos (Silva, 2008).

De acordo com Ziller (2000), espécies invasoras são aquelas que, uma vez introduzidas a partir de outros ambientes, se adaptam e passam a reproduzir-se a ponto de ocupar o espaço de espécies nativas e produzir alterações nos processos ecológicos naturais, tendendo a tornar-se dominantes após um período de tempo mais ou menos

longo requerido para sua adaptação. Uma das espécies invasoras que se tem tornado mais problemática nos Açores é *Hedychium gardnerianum*, assistindo-se ano após ano ao avanço da sua colonização.

1.2. *Hedychium gardnerianum* Sheppard ex Ker Gawl.

A família Zingiberaceae apresenta distribuição em áreas tropicais e semitropicais, incluindo cerca de 50 géneros e 1100 espécies. Do ponto de vista económico destaca-se *Zingiber officinale* Rescoe, com rizomas aromáticos (Souza, 2005).

Hedychium gardnerianum Sheppard ex Ker. Gawl. (**Figura. 1.3.**) é uma Zingiberácea que foi introduzido no arquipélago dos Açores como planta ornamental em meados do século XIX (Palhinha *et al.*, 1966). É conhecida popularmente nestas ilhas como “Conteira”, “Roca-da-velha”, “Roca-do-vento”, “Rubim”, “Flor-de-besouro” e “Choupa” (Palhinha *et al.*, 1966; Silva, 2008).



Figura. 1.3. Inflorescências de *Hedychium gardnerianum* Sheppard ex Ker. Gawl. (Foto de: Carmo Barreto)

H. gardnerianum recebeu o seu nome científico em homenagem a Edward Gardner, um residente britânico na corte do Nepal, Kathmandu (Orchard, 1977). Os primeiros exemplares que chegaram à Europa foram enviados para a Inglaterra provenientes da Índia, em 1819, pelo Dr. Nathaniel Wallich do jardim Calcutá, sendo cultivados pela primeira vez no Jardim Botânico de Liverpool, em Outubro de 1820 (Orchard, 1977).

Hedychium gardnerianum é uma importante planta invasora nas ilhas dos Açores, Hawaii, Nova Zelândia e África do Sul. Apresenta-se como invasora emergente na Jamaica (Grubb & Tanner, 1976), Madeira (Cronk & Fuller, 1995), Ilhas Cook (Pacífico), Micronésia (Pacífico), Ilhas da Reunião (Oceano Índico) e Polinésia Francesa (Pacífico) (Pier, 2004).

Nos Açores os seus habitats são, segundo Silva (2008), floresta laurifólia, margens das águas correntes, valas e sistemas de drenagem, plantações de *Crytomeria japonica*, florestas de *Ilex*, zimbral, zimbral com turfeira, turfeiras, margens das lagoas oligotróficas, ravinas, crateras, quedas de água, matos costeiros, matos de montanha, pastagens permanentes e semi-naturais e matos de *Pittosporum*.

A sua ampla distribuição por todas a ilha dos Açores e mais especificamente em São Miguel (Schäfer, 2005) é um dos maiores perigos para a Laurissilva nativa da ilha (Silva & Smith, 2004), representando uma ameaça significativa, com enorme impacte nos habitats e nas espécies. É de referir que *Juniperus breviflora* e *Laurus azorica* são algumas das muitas espécies afectadas por *H. gardnerianum*.

H. gardnerianum é uma herbácea perene com altura até 1.5 - 2 metros e rizomas grandes e ramificados. Possui folhas oblongas e lanceoladas, sésseis, com 20-60 x 5-12.5 centímetros, superfície superior glabra, superfície inferior esparsamente pubescente e ápice acuminado. Tem flores aromáticas, inflorescências erectas, ovóides, de 15-20 x 8 centímetros, cálice cilíndrico, 4-5 centímetros, corola amarela, com tubo estreito, 8-9 centímetros, lobos linear a linear-lanceolados, 4-5 centímetros, labelum com uma mancha amarela escura no centro, amplamente ovado, tão longo quanto os estaminóides. Pode reproduzir-se por via assexuada (cormos) e sexuada (centenas de sementes/planta/ano) (Silva, 2008), tendo como dispersão a hidroconia, a endozoocoria e o transporte accidental de cormos e sementes (Franco, 2003; Silva, 2008)

H. gardnerianum, *H. flavescens* e *H. coronarium* são membros do género *Hedychium*, cuja taxonomia não é clara. Embora pelo menos 115 espécies tenham sido descritas na literatura, Wood *et al.* (2000) estimaram que apenas 65 deles são espécies biologicamente válidas. Híbridos interespecíficos de *Hedychium* são facilmente criados e a hibridação natural, sem dúvida, contribui para a confusão taxonómica (Wood *et al.*, 2000).

H. gardnerianum é popular como planta do jardim, estando amplamente disponível em centros de jardinagem e mercados (Blood, 2001). Embora nos Açores tenham sido introduzidas como ornamentais, poucas são as suas utilizações populares, à excepção da sua utilização em algumas zonas rurais remotas, no condicionamento de alguns produtos alimentares típicos, como massa sovada e queijo confeccionado a partir de leite cru de caprinos (**Figura. 1.4.**).



Figura. 1.4. Queijo confeccionado a partir de leite cru de caprinos, produzido artesanalmente na Ilha de São Miguel (Achada-Nordeste), onde é visível a utilização popular de folhas maduras de *Hedychium gardnerianum* (Foto de: Autor).

Recentemente, estudos mostraram uma actividade antibacteriana e antitumoral de extractos, óleos essenciais, e compostos da planta (Medeiros *et al.*, 2003; Kumrit *et al.*, 2010), assim como a actividade de antitrombina em extractos da parte aérea da planta (Medeiros *et al.*, 2000).

Hedychium gardnerianum é um exemplo duma planta que aparenta um interessante arsenal de defesas contra insectos e moluscos, uma vez que as suas folhas raramente apresentam sinais de predação. Deste modo, seleccionou-se esta planta como modelo para a pesquisa de inibidores da acetilcolinesterase, uma vez que este é um dos mecanismos de defesa contra a predação encontrado em muitos organismos. A síntese de produtos secundários com actividade de inibição da acetilcolinesterase confere a uma planta, alga ou invertebrado sésbil a capacidade de resistir à predação, ao interferir com a transmissão dos impulsos nervosos nos seus possíveis predadores. Estes organismos são assim os mais lógicos para procurar moléculas com esta actividade biológica.

1.3. Metabolitos secundários

Metabolitos secundários são compostos que os organismos sintetizam como compostos de defesa, de comunicação e em resposta a diversos tipos de stress ambiental. São moléculas que têm na sua origem metabolitos que participam no metabolismo normal dos organismos, tais como hidratos de carbono e acetil coenzima A, por intermédio de vias biossintéticas extremamente complexas e que recorrem a uma poderosa maquinaria enzimática, de modo que se obtém compostos de diversos grupos químicos (**Figura. 1.5**). (Simões *et al.*, 2003).

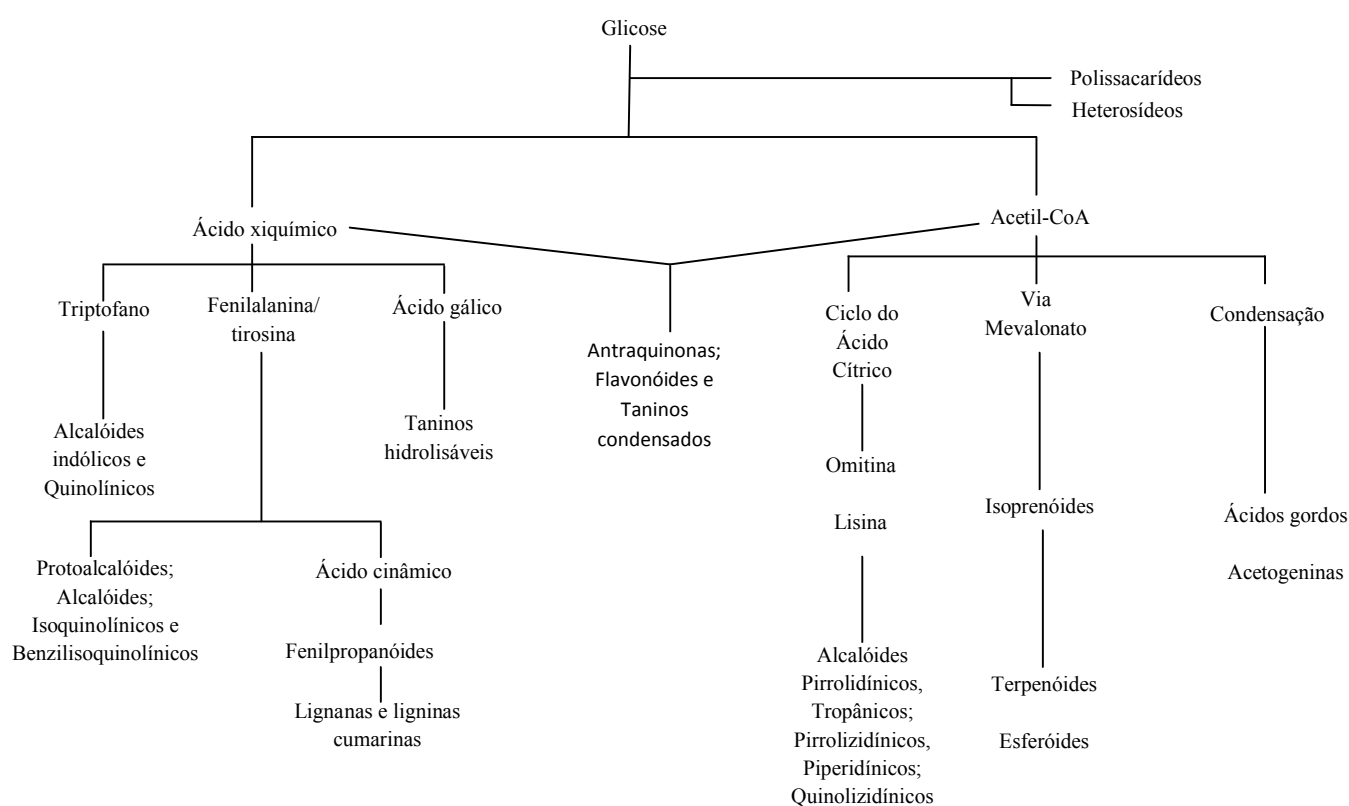


Figura. 1.5. Metabolitos secundários e moléculas precursoras (adaptado de Simões *et al.*, 2003).

Os produtos secundários de plantas podem ser divididos em grupos de acordo com o modo de biossíntese: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo componentes azotados (**Figura. 1.6**). Os terpenos são lípidos sintetizados através do Acetil-CoA na via do ácido mevalónico. Os compostos fenólicos são substâncias aromáticas formadas na via do ácido xiquímico ou do ácido mevalónico por várias vias. Os compostos contendo azoto, como os alcalóides, são biossintetizados essencialmente através dos aminoácidos (Taiz & Zeiger, 1991).

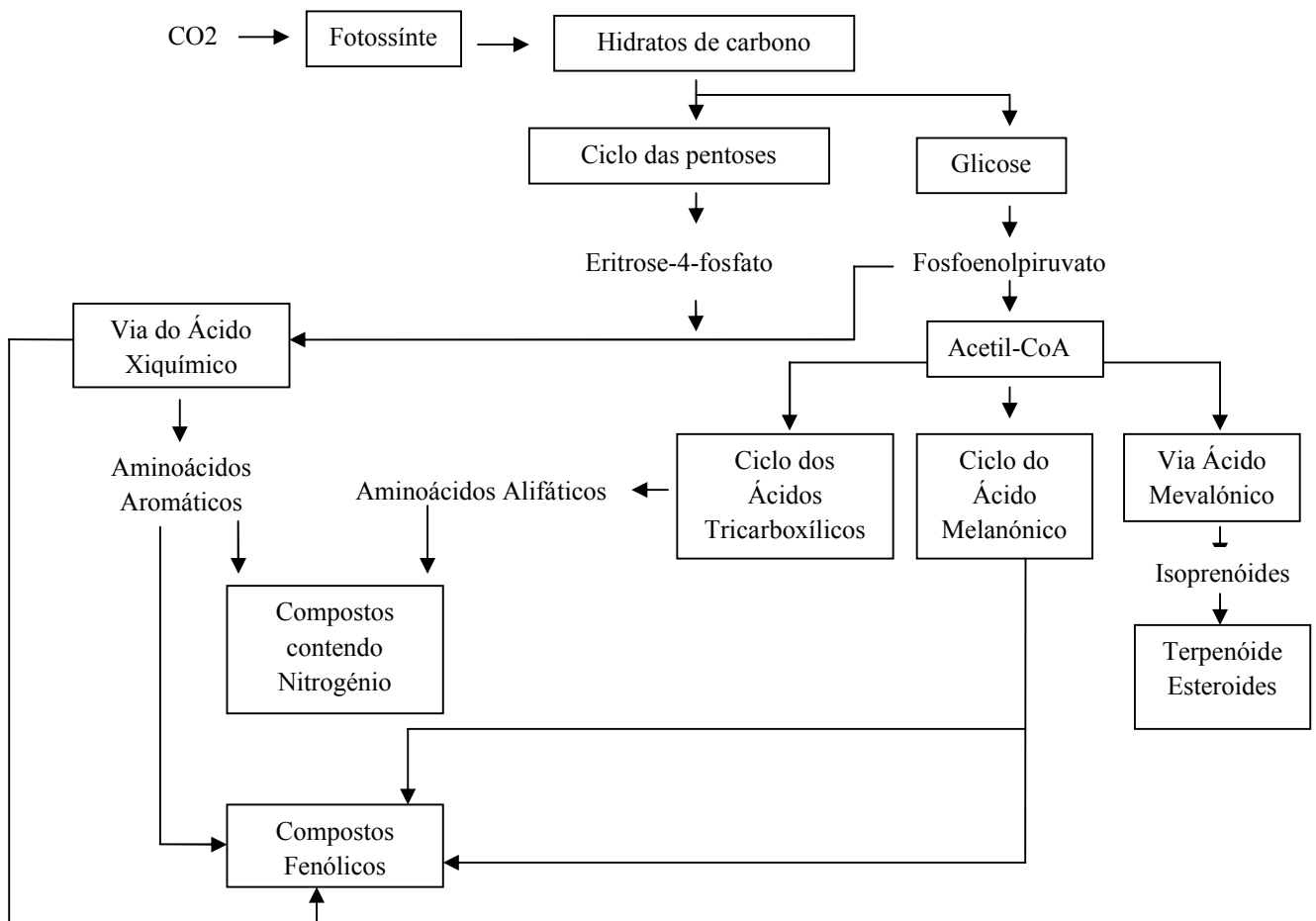


Figura. 1.6. Biossíntese dos principais metabolitos secundários de plantas de interesse para agricultura e medicina (Adaptado de Taiz & Zeiger, 1991).

Particularmente interessantes do ponto de vista das aplicações em agricultura, medicina e biotecnologia são os metabolitos secundários voláteis que se incluem nos chamados óleos essenciais.

1.3.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser denominados óleos voláteis, óleos etéreos devido à sua solubilidade em éter, ou essências pelos seus aromas característicos (Castro, 2007).

O termo “óleo volátil”, segundo Busatta (2006) tem sido mais usado devido à relação com as propriedades físico-químicas da planta, já que “óleo essencial” pode designar também produtos odorantes não formados anteriormente no vegetal, que são as “*essências heterosídicas*” obtidas através da hidrólise enzimática de heterosídeos.

De acordo com a ISO (*International Standard Organization*), óleos voláteis são produtos obtidos de partes de plantas através da destilação. São geralmente voláteis e lipofílicos, ao contrário dos óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes (Castro, 2007) (**Figura. 1.7.**).



Figura. 1.7. Foto de óleo essencial de *Hedychium gardnerianum* extraído por hidrodestilação por um aparelho tipo Clevenger (Foto: Carmo Barreto)

A designação de óleo volátil dá-se devido a algumas características físico-químicas usadas na sua identificação e controlo de qualidade, como o facto de serem líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, voláteis, com aroma intenso, solúveis em solventes orgânicos apolares, geralmente incolores ou ligeiramente amarelados (Garlet *et al.* 2007). Em água apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas que são denominadas hidrolatos. Apresentam sabor geralmente acre (ácido) e picante. Em geral, os óleos voláteis não são muito estáveis, principalmente na presença de luz, ar, calor, humidade e metais (Zamboni, 1983).

Os óleos voláteis são produtos obtidos tradicionalmente a partir de plantas através de destilação por arrasto com vapor de água, também conhecida por hidrodestilação (Simões *et al.*, 2003).

Localizam-se nos espaços intercelulares ou bolsas oleíferas, presentes praticamente em todas as partes da planta, embora cada tipo os possua em órgãos anatómicos específicos (Zamboni, 1983).

1.3.1.1. Constituintes dos Óleos essenciais

Terpenos

Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é formada por derivados de fenilpropanoídes, a partir do ácido xiquímico, ou por terpenóides, a partir do isopreno. A maior parte das moléculas que ocorrem em óleos voláteis tem até 12 átomos de carbono, o que permite uma grande volatilidade e diversidade de estruturas. A maior parte destas moléculas são terpenos, classe de compostos orgânicos baseados na unidade de isopreno, C_5H_8 (Dewick, 2009) (**Figuras 1.8 e 1.9**).

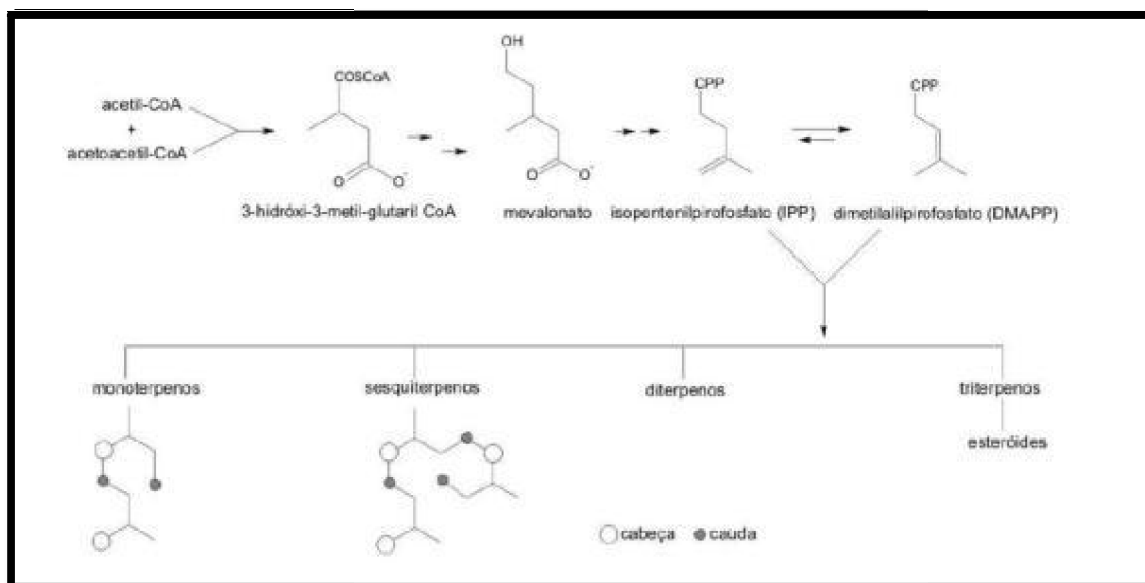


Figura. 1.8. Estruturas precursoras dos terpenóides (Simões *et al.*, 2003.)

Os terpenos, principais constiuintes destes óleos, apresentam diversas actividades biológicas, entre elas a actividade herbicida, antimicrobiana, citostática e antitumoral (Lavabre, 1990; Silva *et al.*, 2003).

Os monoterpenos, formados por duas moléculas de isopreno, representam cerca de 90% da constituição dos óleos essenciais. Seguem-se, em termos de abundância, os sesquiterpenos, formados por três moléculas de isopreno (Dewick, 2009).

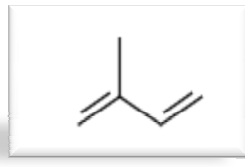


Figura. 1.9. Estrutura Química do isopreno (Dewick, 2009).

A biossíntese dos terpenóides é resumidamente apresentada na **Figura. 1.10.** O mevalonato é formado da condensação de uma unidade de acetoacetyl-CoA com uma molécula de acetyl-CoA. Após a condensação aldólica ocorre uma hidrólise originando o 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA que é reduzido a mevalonato, numa reacção irreversível. O mevalonato é então convertido em isopentenil-pirofosfato, ou isopreno activo, a unidade básica na formação dos terpenos e esteróides. A polimerização do mevalonato origina moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono. A molécula de isopentenil-pirofosfato e seu isómero dimetilalil-pirofosfato formam trans-geranyl-pirofosfato, a partir do qual se formam os demais terpenos (Aguiar, 2003).

Novas ligações cabeça-cauda entre trans-geranyl-pirofosfato e isopentenilpirofosfato resultarão em sesqui (C_{15}) e diterpenos (C_{20}). Já a ligação cabeça-cabeça entre duas moléculas de farnesil-pirofosfato (C_{15}) dará origem ao esqualeno, o precursor da maioria dos triterpenos e esteróides. Os triterpenos (C_{30}) originam-se da ciclização do esqualeno, enquanto os esteróides (C_{27}) podem ser considerados metabolitos dos triterpenos. (Aguiar, 2003).

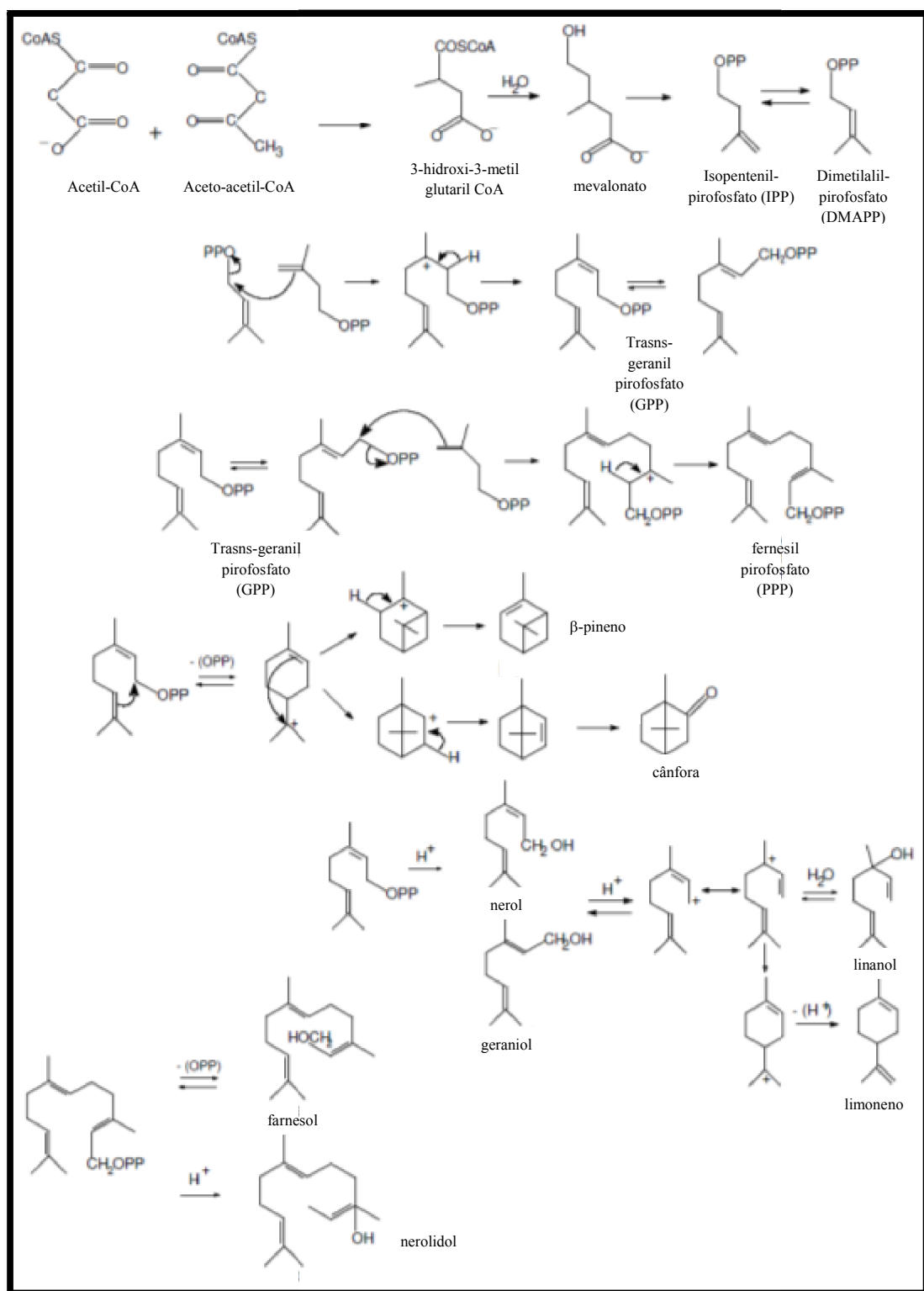


Figura. 1.10. Biossíntese dos terpenóides (adaptado de Dewick, 2009).

Monoterpenos

Os monoterpenos são os constituintes mais conhecidos dos óleos essenciais, cerca de 90% dos óleos voláteis, essências florais e de plantas aromáticas e resinas defensivas (Loza, 1999; Little & Croteau, 1999). Os monoterpenos são uma grande família de compostos naturais de plantas e as suas acções biológicas são cruciais, como no processo de polinização, interacções alelopáticas e de defesa contra herbívoros e patógenos. Alguns destes compostos possuem importância comercial como aromatizantes, fragrâncias e também podem servir como agentes terapêuticos na medicina (Zárate *et. al.*, 2008). Alguns monoterpenos têm actividade anti-tumoral, não somente prevenindo a formação ou progresso do cancro, mas também possuindo a capacidade de regredir tumores malignos existentes (Crowell, 1999).

Os monoterpenos podem ser divididos em acíclicos, monocíclicos e bicíclicos, e esses grupos podem ainda ser sub-divididos em hidrocarbonetos saturados e insaturados, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas e tropolonas (Simões, 2007).

Os monoterpenos podem ser isolados directamente de amostras de óleos essenciais e apresentam como principais características estruturais a presença de diferentes grupos funcionais tais como hidroxilos e carbonilos nas mais variadas posições, a presença ou não de insaturações, causando efeitos significativos nas actividades biológicas destes compostos (Simões, 2007).

O limoneno é o monoterpene monocíclico mais abundante na natureza, e ocorre numa grande variedade de espécies de plantas, sendo o principal constituinte de óleo de casca de laranja e de imão. É um quimioprotector e agente terapêutico contra muitos tipos de células tumorais (Crowell, 1999; Duetz *et al.*, 2001).

O álcool perílico, o análogo hidroxilado do limoneno, exhibe actividade quimiopreventiva contra o cancro do fígado induzido quimicamente em ratos. Além disso, em modelos animais, no caso dos tumores mamário e do pâncreas, em ratos e *hamsters* respectivamente, o mesmo álcool foi capaz de reduzir a maioria dos tumores, inclusive os de cérebro. (Mills *et al.*, 1995; Haag & Gould, 1994).

A carvona é o principal monoterpene do óleo de alcaravia e previne o desenvolvimento de carcinomas de pulmão e estômago induzidos quimicamente (Wattenberb *et al.*, 1989).

Dentre os monoterpenos podemos ainda citar as piretrinas, que são monoterpenos ésteres, e apresentam actividade insecticida (Viegas Junior, 2003). São de referir ainda monoterpenos acíclicos halogenados como a halomina, isolada da alga

vermelha *Portieria hornemnnii*, esta demonstra efeitos prometedores na utilização terapêutica dos cancros renal, colo, cérebro, e pulmão (Fuller *et al.*, 1994).

Alguns monoterpenos têm sido referidos como inibidores da acetilcolinesterase. Perry *et al.* (2000), ao estudar os compostos maioritários dos óleos essenciais de *Salvia lavandulaefolia* e de *S. officinalis* (Lamiaceae), concluíram que a actividade anticolinesterásica dos mesmos se deve à presença de dois monoterpenos, o 1,8-cineol, e o α -pineno.

Sesquiterpenos (C₁₅)

Os sesquiterpenos são o tipo mais numeroso dos terpenos, com aproximadamente 5.000 compostos conhecidos, com mais de 200 esqueletos diferentes. A sua distribuição nas plantas basicamente é a mesma dos monoterpenos, sendo que os sesquiterpenos também são comuns em óleos voláteis (Seigler, 1998).

O pirofosfato de E,E-farnesilo (FPP) é o precursor biossintético comum dos sesquiterpenos, o qual é formado pela adição de uma unidade de Isopentenila (IPP) (C₅) ao E-pirofosfato de geranilo com participação da enzima prenil transferase (**Figura. 1.11**). (Seigler, 1998).

Muitos sesquiterpenos apresentam actividades biológicas das mais diversas. O β -bisaboleno e o bergamoteno são agentes alelopáticos, inibidores do crescimento de raízes; o capsidiol e o hemigossipol são fitoalexinas; o debneiol possui actividade fungitóxica; o gossipol, sendo um dímero de sesquiterpeno, apresenta propriedade contraceptiva em mamíferos machos (Seigler, 1998).

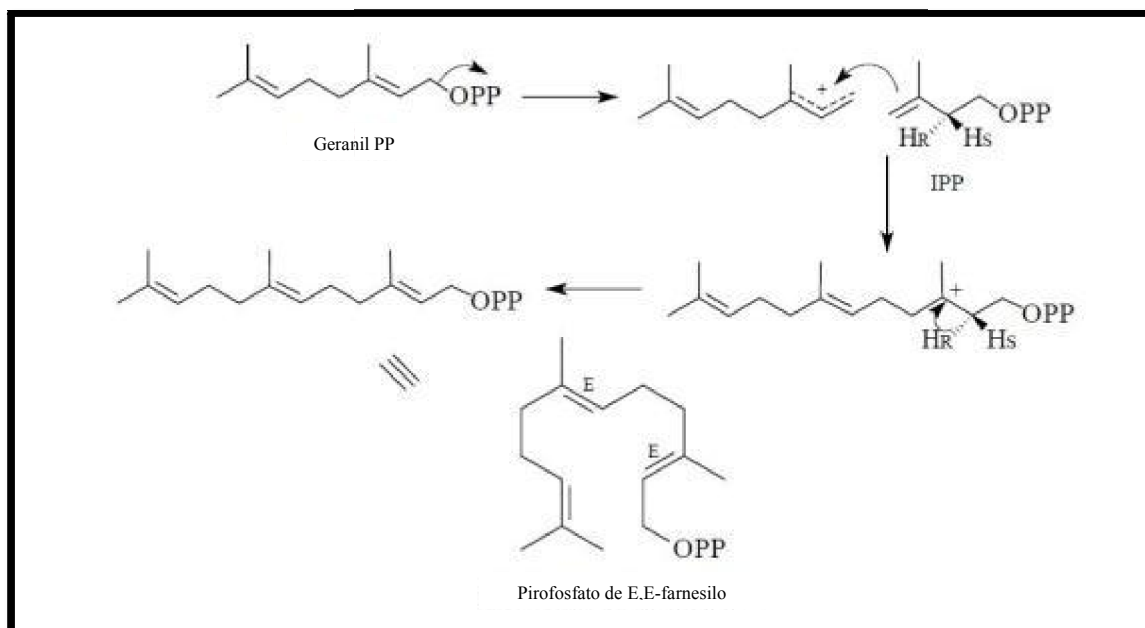


Figura. 1.11. Formação do Pirofosfato de E,E-farnesilo, precursor geral dos sesquiterpenos (*adaptado de Dewick, 2009*).

Triterpenos (C₃₀)

A diversidade estrutural dos terpenos é imensa, incluindo compostos acíclicos, monocíclicos e policíclicos. A sua importância, nomeadamente a nível terapêutico, justifica os numerosos esforços realizados ao longo das últimas quatro décadas no sentido da elucidação da sua biogénese (Eisenreich *et al.*, 2004).

Triterpenos são compostos que possuem 30 átomos de carbono, sendo formados pela adição de duas moléculas de pirofosfato de farnesilo. Os triterpenos possuem esqueleto derivado da ciclização do 2,3-epoxiesqualeno, que leva ao cicloartenol e a outros triterpenos subsequentes (**Figura. 1.12.**) (Dewick, 2009).

Muitos triterpenos apresentam actividades biológicas, o que lhes confere uma importância terapêutica e comercial (Mahato & Kundu, 1994). Como exemplo, tem-se o ácido ursólico e o seu isómero, o ácido oleanólico (**Figura. 1.13.**), amplamente distribuídos no reino vegetal e que têm sido frequentemente isolados como mistura isomérica (Vasconcelos *et al.*, 2006). Durante a última década muitos artigos foram publicados, reflectindo o grande interesse e progresso na percepção destes triterpenos. Os diversos estudos incluem o isolamento e purificação destes compostos a partir de várias plantas, modificações químicas, pesquisas farmacológicas e estudos toxicológicos (Liu, 2005).

De entre as inúmeras actividades biológicas atribuídas ao ácido ursólico e ácido oleanólico, refira-se a actividade analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena e anticolinesterásica (Chung *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2009).

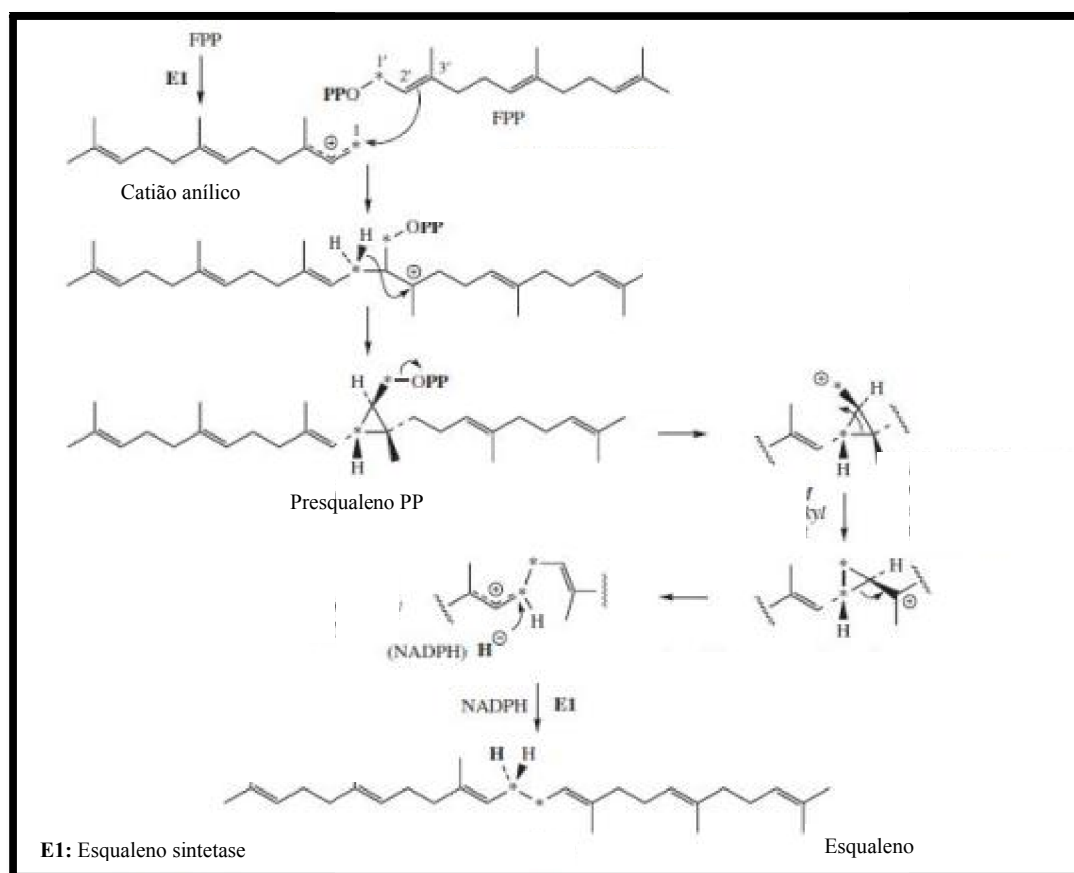


Figura. 1.12. Biossíntese de Triterpenos (Adaptado de Dewick, 2009).

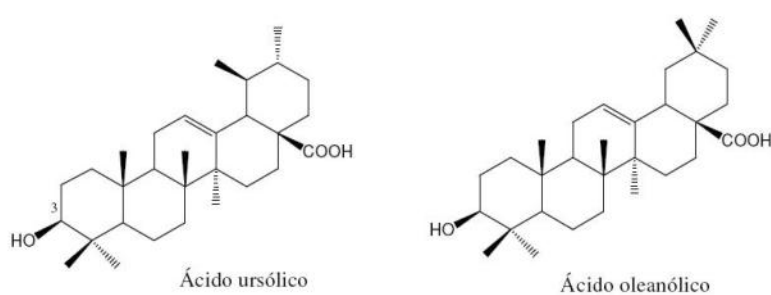


Figura. 1.13. Estrutura química dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico.

1.3.1.2. Propriedades terapêuticas dos óleos essenciais

Segundo Siani (2000), os óleos essenciais encontram a sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos. Esta capacidade, presente na grande maioria destes compostos, de certa maneira, irá representar uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as das bactérias, fungos fitopatológicos e predadores.

Os óleos essenciais apresentam propriedades medicinais tais como adstringente, antimicrobiana, analgésica, antidepressiva, antipirética, antiviral, estimulante, e imunoestimulante (Worwood, 1995; Davis, 1996; Cheng *et al.*, 2003).

Os óleos essenciais presentes nas plantas, ervas e condimentos têm apresentado actividade biológica e servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos contra patógenos causadores de doenças alimentares ou deteriorantes de alimentos, sendo esses causadores de diversos prejuízos para as indústrias alimentícias. Como foi mencionado anteriormente, foi detectada actividade antibacteriana e antitrombina no óleo essencial extraído da parte aérea de *Hedychium gardnerianum* (Medeiros *et al.*, 2000).

A utilização de óleos essenciais na terapia da doença de Alzheimer é referida em vários estudos que comprovaram a sua eficácia, sendo que os óleos essenciais do género *Salvia* têm sido objecto de muitos estudos laboratoriais *in vitro* com resultados positivos (Perry, 2003). Em ensaios com ratos aos quais foram administradas doses diárias de óleo essencial de *Salvia lavandulaefolia*, verificou-se a inibição da acetilcolinesterase com melhoria da doença de Alzheimer. Em ensaios efectuados com humanos verificou-se uma importante melhoria cognitiva e comportamental no grupo ao qual foi administrado óleo essencial de *Salvia lavandulaefolia*, quando comparado com o grupo controlo, ao qual foi administrado um placebo (Perry, 2003; Loizzo, 2009).

É interessante referir que nenhum dos constituintes dos óleos anteriormente mencionados exhibe uma elevada inibição de acetilcolinesterase. Segundo Savelev *et al.* (2003), estes resultados revelam que a actividade inibitória dos resultados dos óleos são atribuídos a uma complexa interacção entre seus componentes, que produzem respostas sinérgicas ou antagónicas entre os seus constituintes.

1.4. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer foi descrita inicialmente pelo médico alemão Alois Alzheimer, em 1906 (**Figura. 1.14.**), por ocasião do 37º Congresso do Sudoeste da Alemanha de Psiquiatria, na cidade de Tübingen. Durante sua conferência intitulada “*Eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*” (*Uma Doença Peculiar dos Neurónios do Córtex Cerebral*) Alzheimer definiu-a como uma patologia neurológica, não reconhecida, caracterizado por demência, destacando os sintomas de défice de memória, alterações comportamentais e incapacidade para as actividades rotineiras. Posteriormente, Alzheimer ainda viria a descrever os aspectos anatomopatológicos da patologia, cujas principais características eram o acumular de placas senis e de emaranhados neurofibrilares e a perda neuronal (Moller & Graeber, 1998; Goedert & Spillantini, 2006).

Em 1910, na oitava edição do “*Handbook of Psychiatry*”, Emil Kraepelin, após estudar casos semelhantes, propôs a denominação de doença de Alzheimer (DA) em homenagem ao seu descobridor (Moller & Graeber, 1998).



Figura. 1.14. Foto de Alois Alzheimer, psiquiatra alemão creditado com a identificação do primeiro caso publicado de "demência pré-senil", que posteriormente ficou conhecida como a doença de Alzheimer (Kelly, 2008).

Um estudo anatomopatológico publicado em 1970 demonstrou que a maioria das demências que ocorrem no período senil são resultado da doença de Alzheimer. A partir de então, o anteriormente designado de pré-senil e senil pela idade, passaram a ser chamadas e consideradas como uma única entidade: “*doença de Alzheimer*” (Tomlinson *et al.*, 1970; Blennow & Willian, 1992).

A susceptibilidade para a doença de Alzheimer (DA) é resultante de múltiplos determinantes ambientais e genéticos que interagem durante a vida. Os factores de risco relacionados com a doença de Alzheimer compreendem baixa escolaridade, traumatismo craniano associado à perda de consciência, sexo feminino, depressão, diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, tabagismo, hiperinsulinemia, inactividade física, fibrilação arterial, dieta rica em gorduras e factores genéticos (Cotman & Berchtold, 2002; Ritchie & Lovestone, 2002; Mattson, 2003; Gorelick, 2004; Luchsinger & Mayeux, 2004). Quanto aos factores genéticos, estão incluídas anormalidades em genes localizados nos cromossomas 21 (gene codificador da proteína precursora amiloide, APP), 14 (gene da presenilina 1), 19 (relacionado com a apolipoproteína E, especificamente ao alelo $\epsilon 4$), 1 (gene da presenilina 2) e 12 (codificador da proteína relacionada com o receptor de LDL) (Sherrington *et al.*, 1995; Levy-Lahad *et al.*, 1995; Blennow *et al.*, 2006).

Contudo, o principal factor de risco associado à doença de Alzheimer é a idade. Estimativas indicam que a enfermidade afecta 8-15 % da população com mais de 65 anos, sendo que a partir dessa idade o risco duplica a cada cinco anos. Actualmente, existem em todo o mundo aproximadamente 25 milhões de pessoas com a doença de Alzheimer, o que demonstra a sua grande importância. Nos países desenvolvidos, a doença de Alzheimer representa a terceira causa de morte, sendo apenas superada pelas enfermidades cardiovasculares e pelo cancro (Mattson, 2004; Mount & Downton, 2006).

Nos estágios iniciais da doença de Alzheimer, há alguma preservação da memória, mas, conforme a enfermidade evolui, a incapacidade de lembrança torna-se generalizada. A dificuldade de aquisição de novas informações aumenta até que não ocorra mais aprendizagem. Na linguagem, ocorre perda de fluência verbal, esvaziamento de conteúdos e diminuição da compreensão, além de erros de leitura e escrita. Além disso, o paciente perde progressivamente habilidades visuo-espaciais. Numa etapa avançada, a enfermidade traz dificuldades de expressão, movimentação e poder de reconhecimento perceptivo sensorial. As alterações psíquicas e

comportamentais ocorrem em até 75 % dos casos, comprometendo a vida social e ocupacional. Os sintomas incluem quadros depressivos e psicóticos (alucinações e delírios), apatia, agressividade, agitação psicomotora, condutas repetitivas, perturbações no ciclo de sono-vigília e mudanças nos hábitos de locomoção (McKhann *et al.*, 1984; Romanelli *et al.*, 1990; Morris & Rubin, 1991; Mortimer *et al.*, 1992; Walsh & Selkoe, 2004).

Ainda não foram identificados marcadores biológicos ou características clínicas que estabeleçam um diagnóstico definitivo para a doença de Alzheimer. Este só é obtido com a demonstração de lesões neuropatológicas no cérebro (Gearing *et al.*, 1995).

Do ponto de vista anatomopatológico, observa-se no cérebro de indivíduos com a doença de Alzheimer atrofia cortical difusa, presença de grande número de placas senis (**Figura. 1.15.**) e de emaranhados neurofibrilares, degenerações grânulo-vacuolares e perda neuronal (Dickson, 1997; Gomez-Isla *et al.*, 1997; Braak & Braak, 1998; Uylings & de Brabander, 2002).

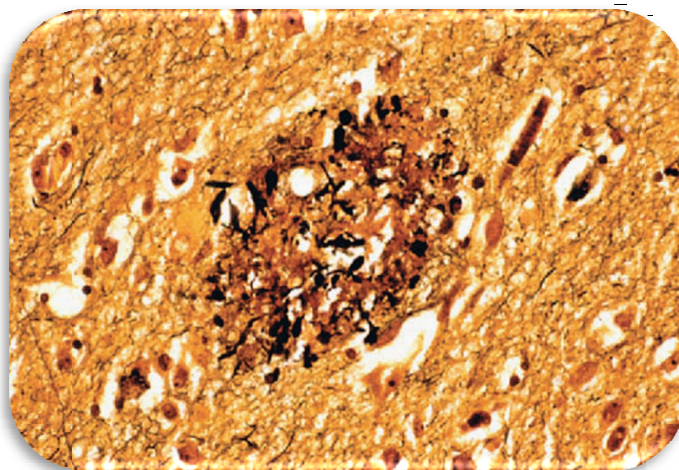


Figura. 1.15. Esta fotografia mostra os depósitos ou placas, característica da doença de Alzheimer. (Kelly, 2008).

Os emaranhados neurofibrilares e as placas senis podem estar presentes nos cérebros normalmente senis, mas em menor quantidade e com distribuição menos extensa. Acredita-se que a concentração das placas senis esteja correlacionada ao grau de demência nos afetados (Hardy & Higgins, 1992; Selkoe, 2002; Walsh & Selkoe, 2004) (**Figura. 1.16.**).



Figura. 1.16. Esquema de um corte “transversal” do cérebro. À esquerda, surge um cérebro saudável, à direita, um que apresenta doença de Alzheimer avançada. No último, o córtex cerebral decresceu e os ventrículos (espaços cheios de líquido) aumentaram consideravelmente (Adaptado de Kelly, 2008).

1.4.1. Principais alterações cerebrais no cérebro com a DA

As três principais alterações que agredem o cérebro de pessoas com a DA são as placas amilóides, os emaranhados neurofibrilares e a perda de conexões celulares e morte celular (Kim *et al.*, 2010; Selkoe, 2004a).

As placas amilóides são encontradas nos espaços entre os neurónios e consistem principalmente de depósitos extracelulares de fragmentos insolúveis em placas senis do fragmento de proteína designado β -amilóide, de outras proteínas, de remanescentes de neurónios, dendritos e axónios em degeneração, de glia e outros materiais celulares. O β -amilóide deposita-se em placas, que causam destruição de neurónios por criarem processos inflamatórios crónicos nas regiões afectadas, interferirem com a regulação de cálcio, essencial para a condução dos estímulos nervosos, e aumentarem a produção de radicais livres, tóxicos para as células nervosas.

Os emaranhados neurofibrilares encontrados dentro dos neurónios são agregados anormais da proteína associada ao microtúbulo (*Tau*). Em neurónios saudáveis, os microtúbulos formam-se com a finalidade de guiar os nutrientes e outras moléculas do corpo da célula até o fim do axónio. A *Tau*, que normalmente tem certo número de grupos fosfato, liga-se ao microtúbulo estabilizando-o. Em pessoas com a DA ocorre uma fosforilação anormal da *Tau* que se acaba desligando do microtúbulo, aglutinando-

se juntamente com outros fragmentos da *Tau* e formando os emaranhados neurofibrilares. Quando isto ocorre, os microtúbulos desintegram-se e o sistema de transporte neuronal colapsa-se.

A perda das conexões celulares e morte celular resultam provavelmente do acumular anormal do β -amilóide e dos emaranhados neurofibrilares. Quando ocorre a perda de conexão entre os neurónios, eles não conseguem funcionar normalmente e eventualmente morrem. Como a morte dos neurónios acontece em todo o cérebro, as regiões afectadas começam a diminuir num processo denominado atrofia cerebral. Na fase final da DA o dano é generalizado e o tecido cerebral encontra-se significativamente diminuído.

A **Figura. 1.17.** ilustra os principais eventos relacionados com o desenvolvimento do processo neurodegenerativo durante a evolução da doença de Alzheimer (Selkoe, 2004b).

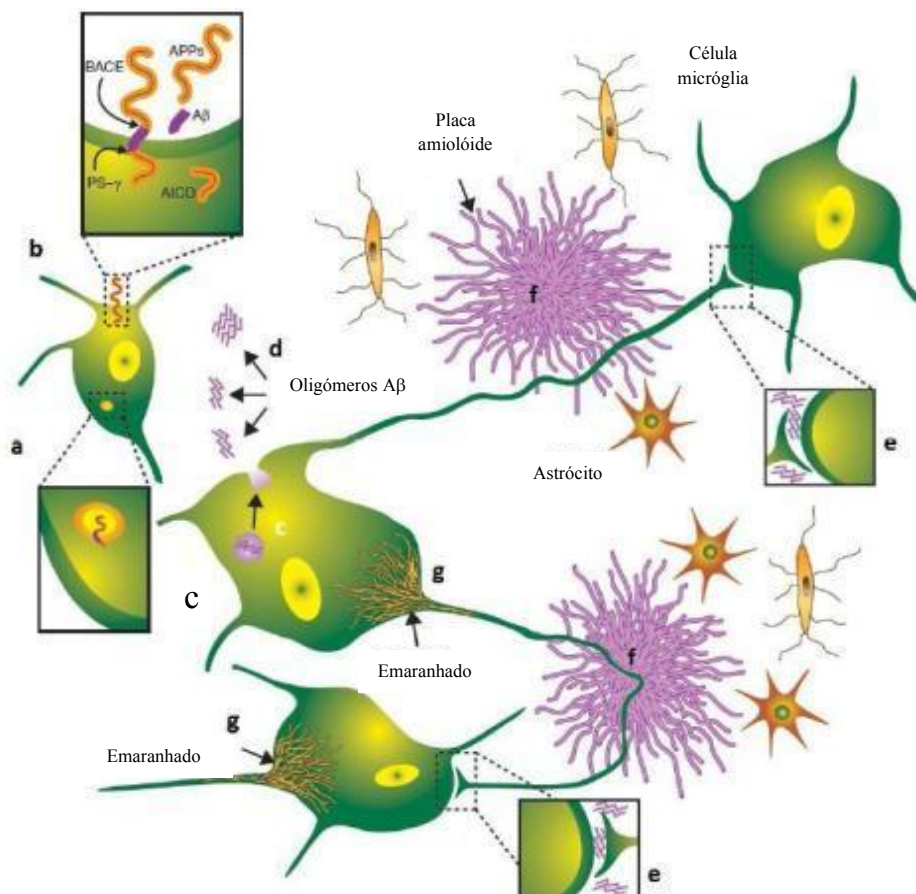


Figura. 1.17. Modelo de eventos chave relacionados com a patologia da DA baseado nas evidências disponíveis. As moléculas de APP (proteína precursora amilóide) presentes no plasma (b) e em vesículas intracelulares como os endossomas (a), são quebradas pela β -secretase (BACE) e pelo complexo presenilina- γ -secretase (PS - γ) para libertar a região de β -amilóide (A β). Uma porção de A β pode sofrer oligomerização, inicialmente dentro das vesículas (c), e depois ser libertado no líquido intersticial cerebral (d), onde os oligómeros solúveis se podem difundir para as fendas sinápticas e interferir com as funções sinápticas de maneira ainda desconhecida (e). Os oligómeros de A β podem ainda polimerizar-se em fibras amilóides insolúveis, que se agregam em placas esféricas, prejudicando estrutural e funcionalmente os axónios e dendrites adjacentes (f). A activação de cinases no citoplasma dos neurónios acompanha este efeito e leva à hiperfosforilação da proteína associada ao microtúbulo (*Tau*) e à sua subsequente polimerização em filamentos insolúveis que se agregam na forma de emaranhados neurofibrilares (g). Células da microglia activadas e astrócitos reactivos em redor das placas participam na resposta inflamatória localizada o que pode contribuir para a neurotoxicidade (Adaptado de Selkoe, 2004b).

1.5. Acetilcolina e a sua importância no sistema nervoso

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor das sinapses e junções neuroefectoras colinérgicas dos sistemas nervoso central e periférico. É sintetizada no citosol do neurónio a partir do acetil coenzima-A e da colina (Silva,1998) (**Figura. 1.18.**)

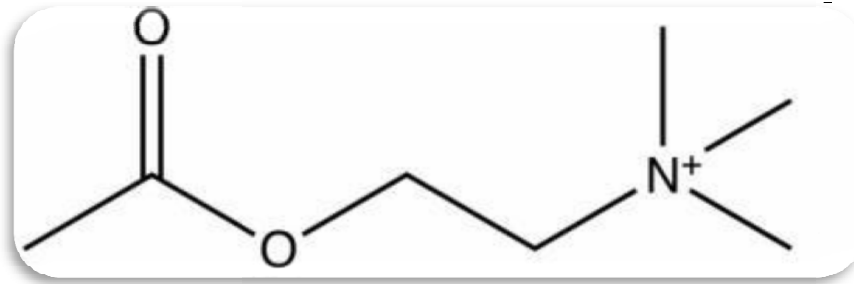


Figura. 1.18. Estrutura química da acetilcolina .

O acetil coenzima-A tem origem mitocondrial, ao passo que a colina provém da fenda sináptica, extracelular. A colina atravessa a membrana do terminal axónico por um mecanismo de transporte activo específico. A combinação do acetil- CoA à colina é catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT). Depois de sintetizada, a ACh é armazenada nas vesículas sinápticas. Este neurotransmissor possui um papel crucial no sistema nervoso central. No terminal axonal, as vesículas pré-sinápticas contendo ACh ficam armazenadas até que haja um estímulo que as liberte (Silva, 1998).

O impulso nervoso, ou potencial de acção, ao chegar ao botão sináptico onde estão as vesículas sinápticas, ocasiona uma despolarização da membrana pré-sináptica, aumentando a condutância do cálcio, o que favorece a entrada deste no axónio. A libertação da acetilcolina varia directamente com a concentração de cálcio (Prado *et al.*, 2002). Posteriormente ocorre o “*rompimento das vesículas*” e o extravasamento do neurotransmissor na fenda sináptica, ocorrendo a fusão com a membrana. A acetilcolina libertada pode difundir-se no espaço extracelular, ser degradada a colina e ácido acético pela acetilcolinesterase ou ainda combinar-se com receptores colinérgicos pós e pré-sinápticos (Rang *et al.*, 2004; Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004).

Logo após exercer a sua acção a acetilcolina sofre hidrólise pelas colinesterases, libertando ácido acético e colina. Nesta hidrólise, que ocorre na fenda sináptica, cerca

de 50% da colina produzida é recaptada pelo terminal axônico, e, posteriormente, é reutilizada para a biossíntese de acetilcolina (Silva, 1998) (**Figura. 1.19.**).

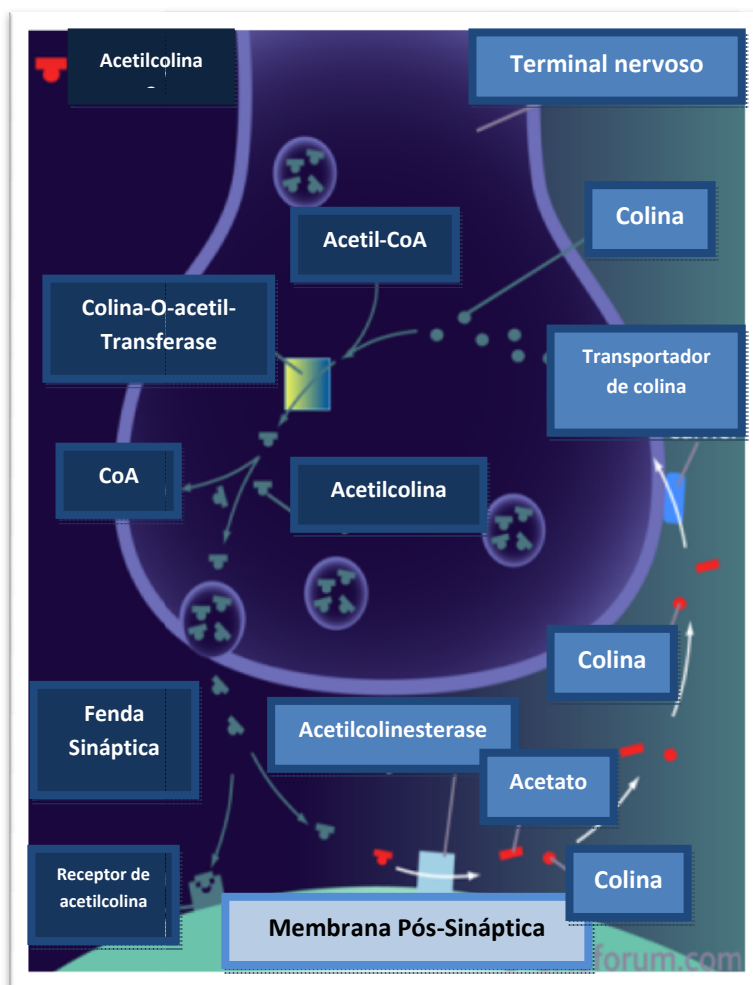


Figura. 1.19. Acetilcolinesterase catalisa a hidrólise da acetilcolina em acetato e colina após a ação do neurotransmissor (adaptado de *CNSforum.com*)

A reposição da acetilcolina tem apresentado eficácia na melhoria da capacidade cognitiva e do comportamento de portadores da doença. Os medicamentos usados neste tipo de terapia são descritos com inibidores da acetilcolinesterase. Essas drogas têm efeito sintomático discreto sobre a cognição, algumas vezes beneficiando as alterações psíquicas da demência. Acredita-se também que elas possam retardar a evolução natural da doença, possibilitando uma melhoria temporária no estado funcional do paciente (Mount & Downton, 2006; Blennow *et al.*, 2006).

1.6. Colinesterases

Estas enzimas são classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas e especificidade aos substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual. As colinesterases desempenham um papel importante na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de outras funções, como a hidrólise e a destoxificação de xenobióticos (Massoulié *et al.*, 1993).

A acetilcolinesterase (AChE; E.C 3.1.1.7) hidrolisa preferencialmente ésteres com grupo acetilo, e a butirilcolinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8) hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. Ambas as colinesterases são amplamente distribuídas no organismo (Taylor & Brown, 1999).

1.6.1. Acetilcolinesterase (AChE) (E.C. 3.1.1.7)

Esta enzima possui um papel regulatório na neurotransmissão colinérgica, sendo responsável pela hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina. É uma glicoproteína globular encontrada nos neurónios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e, em concentrações elevadas, nas junções neuromusculares (Massoulié *et al.*, 1993).

A AChE está amplamente distribuída no sistema nervoso central e também é encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos (Silva, 1998).

1.6.2. Estrutura da acetilcolinesterase

A AChE existe em duas classes gerais de formas moleculares, como oligómeros homoméricos simples de subunidades catalíticas e como associações heteroméricas de subunidades catalíticas e subunidades estruturais. Os oligómeros homoméricos simples aparecem como monómeros, dímeros e tetrâmeros, dando origem, assim, às formas globulares (G): G₁, G₂ e G₄. As associações heteroméricas de subunidades catalíticas e subunidades estruturais resultam nas formas estruturais assimétricas (A): A₄, A₈ e A₁₂ (Massoulié *et al.*, 1993) (**Figura. 1.20.**).

As formas homoméricas são encontradas como espécies solúveis na célula, provavelmente com o intuito de exportação, ou então apresentam-se associadas à membrana externa da célula por meio de uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos

intrínsecos ou de um glicofosfolípido acoplado. A AChE que se apresenta nas formas heteroméricas encontra-se associada com a lâmina basal externa na sinapse e é particularmente abundante na junção neuromuscular (Taylor & Brown, 1999).

A maior parte da AChE encontrada no tecido nervoso é do tipo globular, predominantemente G₄, ligada à membrana. Os eritrócitos, linfócitos e plaquetas contêm a forma globular dimérica G₂, a tetramérica G₄ e a assimétrica A₁₂, respectivamente (Massoulié *et al.*, 1993)

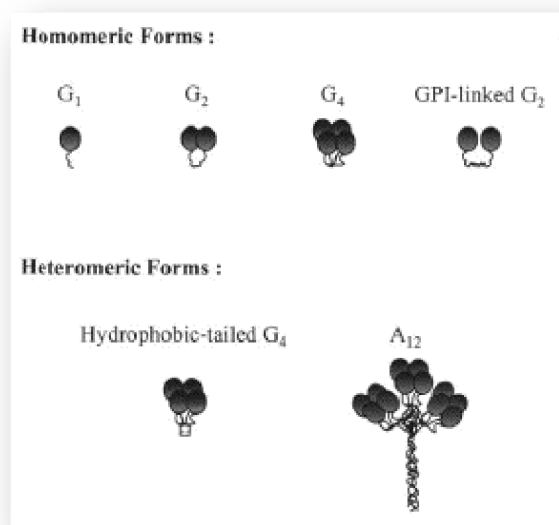


Figura. 1.20. Estruturas quaternárias das formas moleculares de AChE. As formas homoméricas são compostas pelo monómero G₁, dímero G₂, tetrâmero G₄ e um glicofosfolípido (GPI) ligado ao dímero. As formas heterodiméricas consistem numa forma de cauda hidrofóbica G₄ e nas formas assimétricas contendo uma subunidade colagénica estrutural (por exemplo forma assimétrica A₁₂) (Chan & Jasmin, 1999).

1.6.3. Mecanismo de acção

A AChE é uma enzima alostérica da classe das hidrolases, com 537 resíduos de aminoácidos na sua sequência, que se encontra ancorada na membrana pós-sináptica na forma tetramérica. A AChE hidrolisa a ACh, em acetato e colina no sítio catalítico (tríade catalítica), constituído pelos resíduos Ser200-Glu327-His440 (SEH) e situado no fundo do seu sítio activo (Soreq & Seidman, 2001) (**Figura 1.21.**).

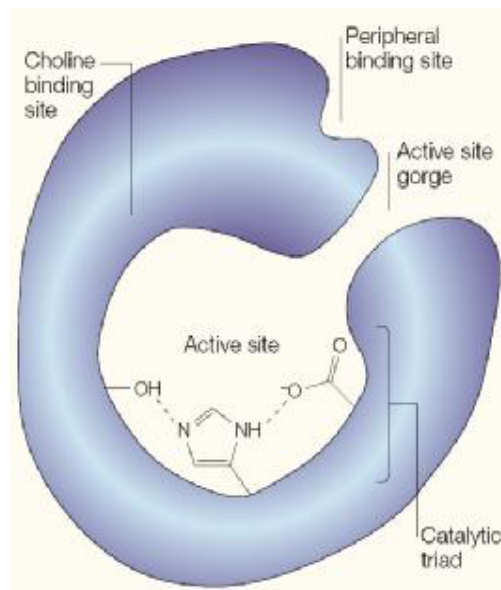


Figura. 1.21. Sítio catalítico da AChE (adaptado de Soreq & Seidman, 2001).

O sítio activo da AChE denominado GORGE (**Figura 1.22.**) é composto por quatro subsítios e tem aproximadamente 20 Å de profundidade. O sítio periférico está localizado na entrada e o sítio ligante de amónio quaternário situa-se na região central do GORGE. Estes dois sub-sítios são constituídos por vários resíduos aromáticos e por isso a totalidade da área que abrangem é denominada sítio aromático da AChE. Os outros dois sub-sítios da AChE, sítios catalítico e aniónico situam-se no fundo no “bolso” de acilação, onde ocorre a desactivação da ACh (Koellner *et al.*, 2000).

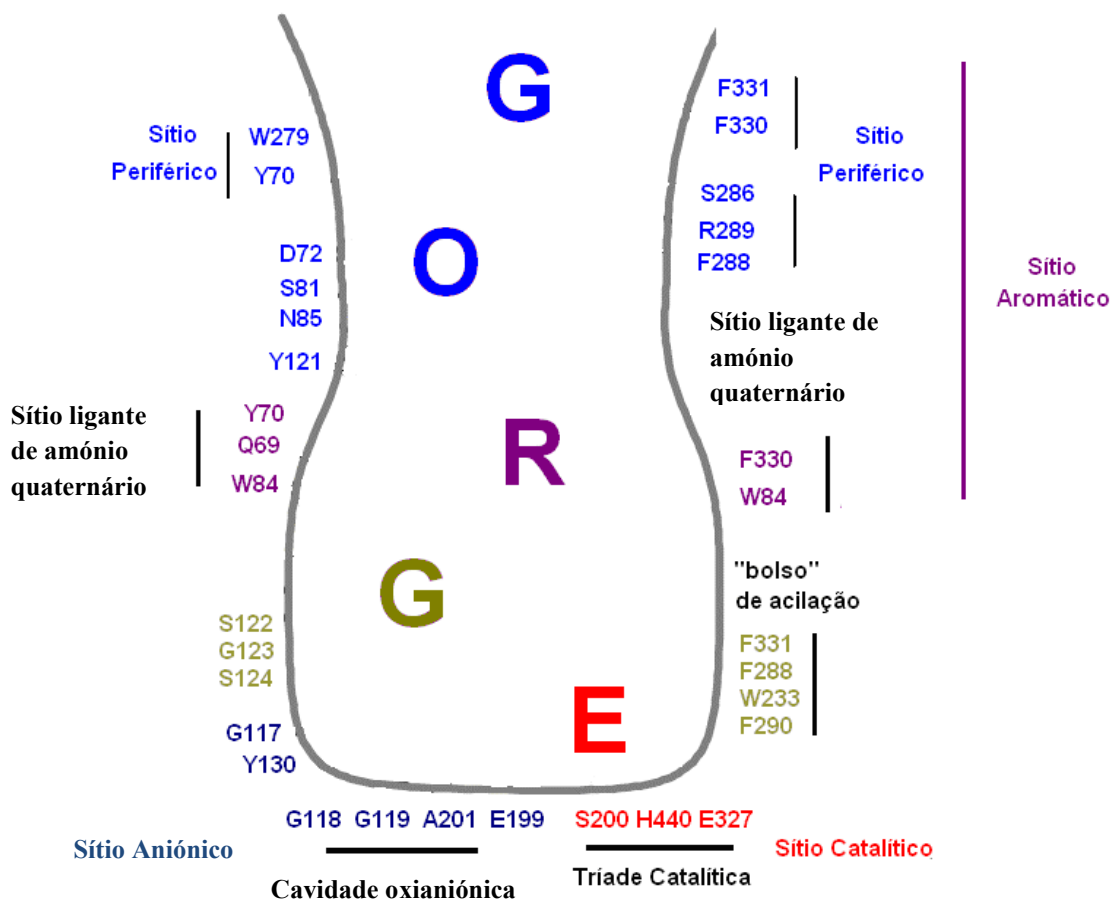


Figura 1.22. Sítio catalítico da AChE (adaptado de Koellner *et al.*, 2000).

O mecanismo proposto para a acção da AChE sobre a ACh (**Figura 1.23**) é dividido em duas etapas: a hidrólise da ACh e a acilação do grupo acetilo. A acetilcolina, depois de ser reconhecida pelos resíduos Asp72 e Tyr70, situados no sítio periférico da AChE, move-se para o fundo do GORGE, ligando-se à tríade catalítica, mais especificamente ao hidroxilo da Ser200 que actua como nucleófilo usando um par de electrões livres do oxigénio do seu hidroxilo para atacar o carbonilo da ACh formando em seguida um intermediário reactivo tetraédrico com a His440, actuando como catalisador básico para aumentar a nucleofilicidade da serina (passos 1 e 2 da **Figura 1.23**). Após a formação do intermediário reactivo, a histidina, agora ácida, protona o grupo 'O-R' que se torna um melhor grupo de saída que os outros, libertando dessa forma a colina da ACh (passos 3, 4 e 5 da **Figura 1.23**). O grupo acilo da ACh encontra-se ligado covalentemente à Ser200. Uma molécula de H₂O interage com a tríade catalítica da AChE, actuando como nucleófilo. O par de electrões livres do oxigénio da água ataca o carbonilo do grupo acilo, formando um novo intermediário

reactivo que é atacado pela His440 (passo 6 da Figura 3). Em seguida a histidina, novamente ácida, sofre ataque de um par de electrões livres do intermediário tetraédrico, que protonado sofre rearranjo libertando o acetato formado (ácido acético) (passos 7, 8, 9 e 10 da **Figura 1.23**). Desta forma, a Ser200 é regenerada e o processo repete-se enquanto houver impulsos nervosos a serem transmitidos (Patrick *et al.*, 2005)

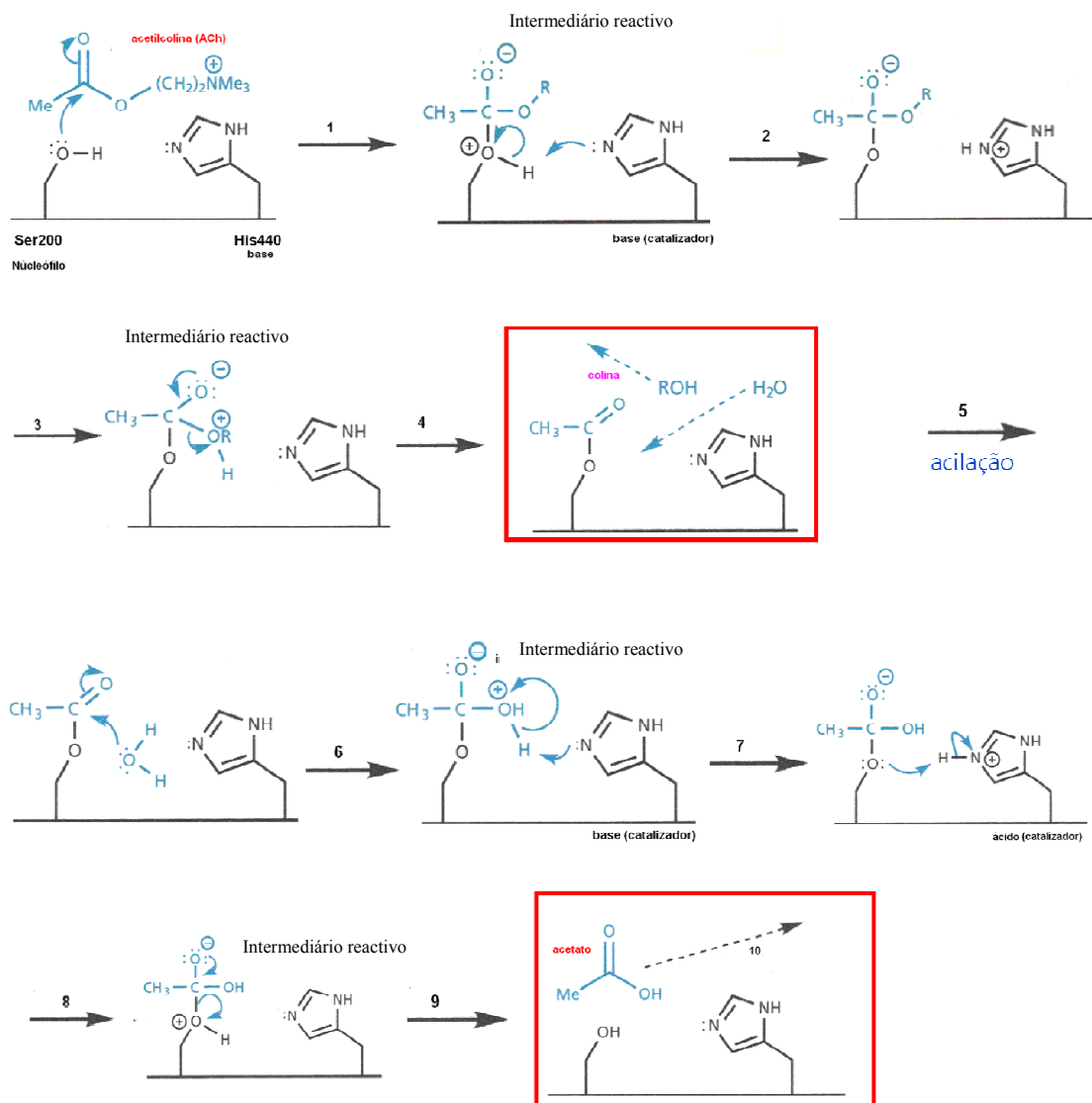


Figura. 1.23. Mecanismo proposto para hidrólise da ACh pela AChE (adaptado de Patrick *et al.*, 2005).

1.6.4. Inibidores de acetilcolinestraxe

Actualmente, existem cinco drogas aprovadas para o tratamento clínico da doença de Alzheimer. (*Tabela. 1.1.*) Entre estas, quatro são classificadas como drogas anticolinesterásicas, ou seja, inibidores da enzima acetilcolinesterase enquanto a outra actua como antagonista do receptor de glutamato aumentando os níveis de acetilcolina na fenda sináptica (FDA, 2007)

No cérebro com DA são observadas várias alterações relacionadas com o sistema colinérgico, entre as quais: perda selectiva e significativa da actividade de ChAT em diferentes partes do cérebro (córtex, hipocampo e amígdalas), degeneração selectiva dos neurónios colinérgicos basais do cérebro, diminuição da actividade da AChE com proporcional ao aumento do número de placas senis, e redução dos níveis de ACh e AChE (Kasa *et al.*, 1997; Gouras, 2001; Garcia-Sanchez *et al.*, 2003).

Tabela. 1.1. Drogas disponíveis comercialmente aprovadas para o tratamento da doença de Alzheimer (FDA, 2007)

Genérico	Marca	Aplicação	Efeitos Adversos	Classe
Donepezil	Aricept®	Todos os estágios	Náuseas; vômitos; perda de apetite e aumento dos movimentos no TGI	Anticolinesterásico
Galantamina	Reminyl®	Leve a moderada	Náuseas; vômitos; perda de apetite e aumento dos movimentos no TGI	Anticolinesterásico
Rivastigmina	Exelon®	Leve a moderada	Náuseas; vômitos; perda de apetite e aumento dos movimentos no TGI	Anticolinesterásico
Tacrina	Cognex®	Leve a moderada	Possível dando no fígado; náuseas e vômito.	Anticolinesterásico
Memantina	Ebix®	Moderada a severa	Dor de cabeça; confusão e tonturas.	Antagonista do receptor de glutamato (N-methyl-D-asparto) NMDA

Os anticolinesterásicos possuem um papel importante no tratamento da DA. Em 1976 foi estabelecida a hipótese colinérgica, que associa os sintomas cognitivos, funcionais e comportamentais presentes na DA com a deficiência na neurotransmissão colinérgica ligada à perda dos neurónios colinérgicos (Kasa *et al.*, 1997).

Inúmeras abordagens vêm sendo exploradas para restaurar a função central colinérgica: o uso de agentes libertadores de ACh, a estimulação da captação de acetilcolina, a activação de receptores colinérgicos por agonistas e a diminuição da degradação metabólica de ACh pela inibição da AChE (Kasa *et al.*, 1997).

Estudos revelaram que um aumento dos níveis de ACh pela inibição da AChE pode melhorar a insuficiência na função cognitiva em estágios prematuros de DA (Mesulam, 2009). A intensa investigação para a descoberta de inibidores de AChE e a resposta positiva do tratamento contribuiu para o surgimento dos anticolinesterásicos no mercado (Orhan *et al.*, 2006).

Vários autores estudaram a relação entre o sistema colinérgico e a sua capacidade de modular o metabolismo da APP (Nitsch *et al.*, 1992; Nitsch *et al.*, 1993;

Wolf *et al.*, 1995; Salvietti *et al.*, 1996). A maioria dos trabalhos relata que os efeitos da estimulação colinérgica são directamente dependentes de interacções do tipo ligante-receptor e que tais interacções são responsáveis por desencadear uma cascata de transdução de sinais que envolve a activação de proteínas cinases. Vários segundos mensageiros intracelulares também contribuem para a regulação do metabolismo da APP e possuem interacções extremamente complexas (Racchi *et al.*, 2004). (**Figura 1.24.**)

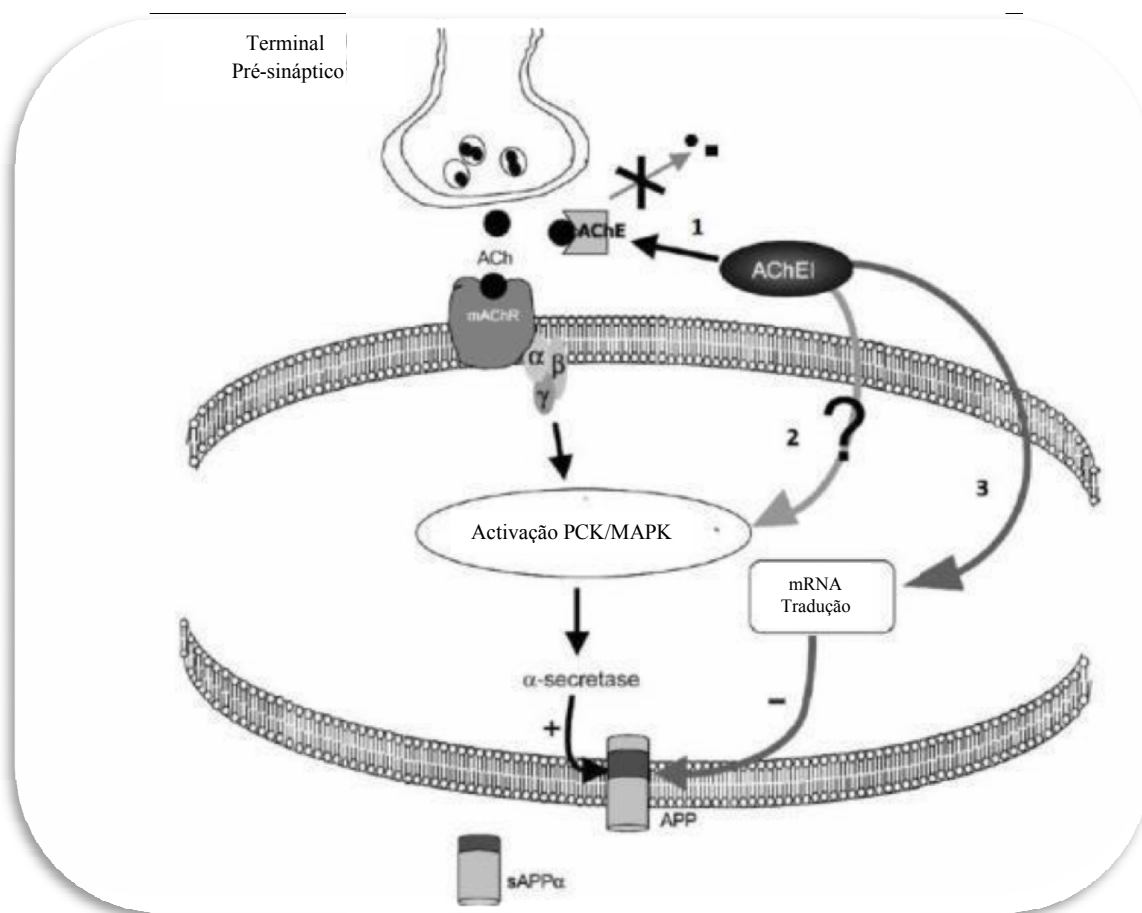


Figura 1.24. Possíveis sítios de interacção farmacológica entre os anticolinesterásicos (AChEI) e o metabolismo da APP. Três possíveis sítios são indicados. Primeiramente, os AChEI podem interagir com o metabolismo da APP através da estimulação colinérgica indirecta da via não-amiloidigénica. A estimulação colinérgica da α -secretase e libertação dos fragmentos solúveis da APP (sAPP α) envolve a activação de vias de transdução de sinais de uma ou ambas as proteínas cinases. Também já foi sugerido que alguns AChEI podem interagir independentemente de receptores colinérgicos com estas vias e activar ou alguns casos modular a metabolização normal da APP. Uma terceira possibilidade sugere a interacção de algumas moléculas directamente na síntese da haloproteína da APP e assim interferir no metabolismo da APP e formação de A β (Adaptado de Racchi *et al.*, 2004).

As drogas descritas como inibidoras da acção da enzima acetilcolinesterase (AChEIs) constituem hoje a principal estratégia para o tratamento de pacientes com DA, a terapia colinérgica. O tratamento consiste na melhoria da transmissão do impulso nervoso na sinapse. A inibição da hidrólise da acetilcolina pela AChE por fármacos que interagem com o enzima permite a manutenção da concentração do neurotransmissor durante os processos de condução de sinal para outros neurónios. O uso de medicamentos correctos, que auxiliem no aumento da concentração de ACh na sinapse, tem efectivamente retardado a evolução da doença (Sigimoto *et al.*, 2002; Sayeg, 2009).

Entre os medicamentos que actuam como inibidores da AChE, destacam-se a tacrina (Proctor & Harvey, 2000; Sugimoto *et al.*, 2002; Patrick *et al.*, 2005), primeiro fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da DA, seguida pelo donepezil (Sugimoto *et al.*, 2002; Racchi *et al.*, 2004), pela rivastigmina (Sugimoto *et al.*, 2002; Racchi *et al.*, 2004) e pela galantamina (Racchi *et al.*, 2004). Outras drogas foram estudadas e testadas clinicamente para serem usadas no tratamento da DA, como a fisostigmina (Camps & Munoz-Torrero, 2002). Outras estão em fase de teste e são candidatas promissoras a aprovação, entre elas a huperzina A (Patrick, 2005; Barak, 2005). Estes fármacos são indicados para o tratamento nas fases leve e moderada, quando o paciente ainda tem actividade cognitiva independente.

A tacrina, aprovada para o tratamento de pacientes com DA em 1993, (Sugimoto *et al.*, 2000; Kaur & Zhang, 2000) é um derivado da acridina, sintetizada em 1945, actuando primeiramente como agente antimicrobiano e bloqueador da monoaminoxidase. (Proctor & Harvey., 2000). É comercializada sob as denominações de Cognex[®] e de Nivalin[®] sendo a detentora da sua patente a indústria farmacêutica *Warner-Lambert*. Essa droga é um inibidor reversível, não-competitivo e não selectivo para a AChE. Tem alta hepatotoxicidade, farmacocinética lenta e alta incidência de efeitos secundários (Kaur & Zhang, 2000). Aumenta moderadamente a função cognitiva em pacientes com boa tolerância a ela. Embora não seja mais usada ainda é tida como droga de referência na busca de outras AChEIs (Proctor & Harvey, 2000), havendo ainda estudos acerca de análogos da tacrina na busca de um AChEI mais potente. Estudos de “*docking*” molecular entre a tacrina e a AChE evidenciaram que a tacrina é reconhecida no sítio activo da AChE pelo sítio aniónico por meio de interações hidrofóbicas; no sítio periférico da enzima por interações fracas do tipo *van der Waals* e transferência de carga via electrões p₂₄ e no sítio catalítico da AChE por ligação

hidrogénio com o resíduo His440 da tríade catalítica, interação eletrostática do tipo “*II-II stacking*” com os resíduos Trp84 e Phe330, mais especificamente forma um complexo de transferência de carga com o resíduo Trp84 (Harel *et al.*, 1993).

Em 1996 a segunda AChEI foi aprovada para o tratamento de DA, o donepezil, comercializado como Aricept[®]. Essa droga foi desenvolvida, sintetizada e avaliada pela indústria farmacêutica japonesa *Eisai Co.*, para os quais foram utilizados estudos de reconhecimento molecular e a partir de estudos de *QSAR*, mesmo antes da determinação da estrutura tridimensional da AChE (Greenblatt *et al.*, 1999). O donepezil é uma droga da família das N-benzilpiperidinas. É um AChEI altamente selectivo ligando-se reversivelmente e de forma não-competitiva à AChE (Greenblatt *et al.*, 1999; Barril *et al.*, 2001; Sugimoto *et al.*, 2002) O uso desse medicamento resulta em melhoras significativas no tratamento da DA leve e moderada quando comparado com a tacrina. É bem tolerada pelo organismo, apesar de causar efeitos colaterais característicos das AChEIs como náuseas, dores de cabeça, tonturas, distúrbios do sono e complicações estomacais (Racchi *et al.*, 2004).

Estudos de reconhecimento molecular realizados a partir da estrutura cristalina do complexo AChE-donepezil mostraram que este AChEI interage com resíduos dos sítios aniónicos e periférico do enzima e não directamente com a tríade catalítica. Similarmente à tacrina, o anel benzénico do donepezil faz uma interacção electrostática do tipo “*II-II stacking*” com o resíduo Trp84. O donepezil opera diversas ligações de hidrogénio dentro do sítio activo da AChE com moléculas de água estruturais presentes durante a sua presença dentro do GORGE (Barril *et al.*, 2001) Os oxigénios dos dois grupos metoxi fazem uma interacção *II-II* clássica com o resíduo Trp279 da AChE. (Barril *et al.*, 2001). Todas as formas enantioméricas deste inibidor mostram o mesmo perfil de selectividade, pois interconvertem-se rapidamente em solução aquosa via intermediário cetoenólico, existindo, portanto como uma mistura racémica (Sugimoto *et al.*, 2000)

A terceira AChEI utilizado no tratamento de DA foi a fisostigmina, um alcalóide natural, pertencente ao grupo dos carbamatos, extraído de uma planta, *Physostigma venenosum*. (Proctor & Harvey, 2000; Sugimoto *et al.*, 2002; Patrick, 2005). A sua estrutura foi determinada em 1925 (Patrick, 2005). Foi a primeira AChEI estudada clinicamente para ser aplicada no tratamento da DA (Camps & Munoz-Torrero, 2002). É selectiva e pseudo-irreversível, por se complexar com o resíduo Ser200 da AChE e formar uma ligação pseudo-covalente com o átomo de oxigénio do seu hidroxilo. A

fisostigmina durante os estudos clínicos apresentou baixo índice terapêutico, baixo tempo médio de vida e biodisponibilidade variável. Apesar de proporcionar uma melhora da cognição dos pacientes, essa droga foi rejeitada pelo FDA devido a sua baixa eficiência em longo prazo nas fases clínicas II e III. Porém, é uma droga usada ainda hoje para tratar glaucoma, comercializada com o nome de Antilirium[®]. A exemplo da tacrina, apesar de não ser mais usada no tratamento para DA a fisostigmina é objecto de referência no desenvolvimento de novos análogos para o tratamento da DA. (Barril *et al.*, 2001; Kaur & Zhang, 2000; Sugimoto *et al.*, 2002).

Em meados de 1998 foi aprovada na Europa a rivastigmina, droga derivada da fisostigmina por modificações moleculares. É um AChEI selectivo e pseudoirreversível como a fisostigmina, porém tem menor selectividade (Sugimoto *et al.*, 2000; Camps & Munoz-Torrero, 2002; Racchi *et al.*, 2004;). A rivastigmina apresentou perfil farmacológico superior à fisostigmina, com boa selectividade e bioactividade considerável *in vivo*, boa tolerância por parte dos pacientes, propriedades neuroprotectoras e melhoria na cognição dos pacientes durante as fases de testes clínicos. Foi aprovada pelo FDA no ano 2000 (Sugimoto *et al.*, 2000; Camps & Munoz-Torrero., 2002; Racchi *et al.*, 2004) e é comercializada com o nome de Exelon[®], um dos fármacos mais indicados hoje no tratamento de pacientes com DA. A rivastigmina é considerada uma AChEI pseudo-irreversível por se complexar à AChE no reconhecimento molecular, carbamilaando a enzima no oxigénio do hidroxilo do resíduo Ser200, formando uma ligação covalente com distância de ligação da ordem de 1,39 Å que é lentamente desfeita (descarbamilação). Além da carbamilação, a rivastigmina interage com os resíduos Trp84 e PheF330 (Bar-On *et al.*, 2002)

O terceiro AChEI aprovado pelo FDA para o tratamento da DA foi a galantamina. É um alcalóide encontrado em várias plantas da família das *Amaryllidaceae*, particularmente numa planta nativa da região do Cáucaso europeu chamada “*snow drop*” (Racchi *et al.*, 2004)

Foi descoberta acidentalmente por um farmacêutico búlgaro em 1950. O extracto dessa planta era utilizado para tratar dores dos nervos, poliomielite e usado como anestésico (Greenblatt *et al.*, 1999). Além de ser um inibidor selectivo, competitivo e reversível da acetilcolinesterase, é modulador alostérico dos receptores nicotínicos cerebrais, musculares e gangliais (Kone *et al.*, 2006). Tendo actividade diferenciada sob o sistema nervoso central, facilidade para penetrar a barreira hematoencefálica, boa biodisponibilidade, boa tolerância do organismo, foi aprovada em 2001 para o

tratamento da DA por promover melhorias significativas na cognição e outros sintomas não-cognitivos nos pacientes. É comercializada com o nome de Reminyl[®] (Kone *et al.*, 2006). A galantamina interage com os resíduos do sítio activo da AChE, principalmente Ser200 e Phe330 por ligações de hidrogénio e com o Trp84 por interacções do tipo *II-II* (Greenblatt *et al.*, 1999)

A (\pm) huperzina A (Figura 10) é um alcalóide natural obtido da *Huperzia serrata*, planta muito utilizada pela medicina chinesa. É um potente inibidor reversível da AChE (Raves *et al.*, 1997) com potencial para o tratamento de DA, considerando-se a sua acção prolongada sobre o Sistema nervoso central, baixa toxicidade, além de acção protectora sobre os neurónios contra o excesso de glutamato que pode causar a morte das células nervosas (Sugimoto *et al.*, 2000; Camps & Munoz-Torrero, 2002) Num de “*docking*” realizado por Raves (1997) e colaboradores demonstrou-se que a (\pm) huperzina A tem reconhecimento molecular com a AChE por meio de interacções do tipo *II-II* com os resíduos Trp84 e Phe330, além da ligação de hidrogénio com o resíduo His440 (Raves *et al.*, 1997).

1.7. Pesquisa de novos candidatos de origem natural para o tratamento da DA

A diversidade estrutural dos anticolinesterásicos já conhecidos e a possibilidade de explorar modos de acção diferentes estimularam estudos fitoquímicos com diversas espécies de plantas e micro-organismos com base no uso popular ou em dados etnobotânicos. A pesquisa de drogas inibidoras de AChE com acção prolongada, com maior potência e com menores riscos de efeitos colaterais, ainda permanece o foco de diversos pesquisadores (Howes & Houghton, 2003; Khalid *et al.*, 2004). Cerca de 50% das drogas introduzidas no mercado durante os últimos 20 anos são derivadas directamente ou indirectamente de moléculas pequenas de origem natural (Newman & Cragg, 2007). A natureza pode ser considerada como uma importante fonte de novos compostos químicos de interesse para o tratamento de várias doenças, inclusive a DA. Além disso, vários compostos promissores já foram sintetizados e testados pelas suas habilidades de inibir AChE (Di Giovanni *et al.*, 2008). Recentemente, extractos de plantas medicinais têm sido objecto de diversos estudos visando a busca de soluções que possam dar maior conforto aos pacientes com a DA (Lopez *et al.*, 2002; Khalid *et al.*, 2004; Viegas Júnior *et al.*, 2004; Anekonda & Reddy, 2005; Facundo & Rios, 2005; Adersen *et al.*, 2006). Desse modo, diversos extractos avaliados mostraram propriedades como pró-colinérgica, antioxidante, anti-amilóide e anti-inflamatória, indicando o uso promissor de substâncias provenientes de fármacos vegetais no tratamento de pacientes com DA (Anekonda & Reddy, 2005). Extractos de plantas contendo vários constituintes activos têm sido usados hoje em dia para tratar desordens associadas com o Sistema Nervoso Central, entre essas, espécies da família Amaryllidaceae (Lopez *et al.*, 2002; Melanie-Jayne *et al.*, 2003; Khalid *et al.*, 2004; Viegas Júnior *et al.*, 2004; Anekonda & Reddy, 2005).

Vários factores mostram que extractos de plantas medicinais podem ser veículos portadores de substâncias importantes e activas, onde se incluem as substâncias inibidoras da AChE (Anekonda & Reddy, 2005). O primeiro factor é a biodisponibilidade (Manach *et al.*, 2005), especialmente quando se trata de plantas que contém flavonóides ou outras substâncias polifenólicas. Essas substâncias são capazes de atravessar a barreira intestinal e penetrar no sistema circulatório. O segundo factor é a capacidade dos extractos passarem pela barreira hemato-encefálica. Esta barreira expressa um grande número de transportadores, como a glicoproteína-P, onde as substâncias naturais actuam. O terceiro factor está relacionado aos aspectos

toxicológicos e de interação droga-droga entre as substâncias naturais. Poucos estudos clínicos foram realizados com plantas medicinais, ou seus extractos, que possam garantir da sua segurança e eficácia. No entanto, estudos clínicos realizados até então mostraram poucos efeitos adversos. Um estudo realizado por Anekonda e Reedy (2005) apresenta uma lista de plantas com actividade no tratamento da DA, bem como efeitos sinérgicos (positivos e negativos) de combinações de diversos compostos dessas plantas (Roman *et al.*, 2002; Alcalá *et al.*, 2005).

Como anteriormente descrito (*Capítulo 1.6.4*), quimicamente as AChEIs têm em comum a acção inibitória da AChE, porém possuem estrutura e natureza química distintas. Sendo que alguns inibidores da AChE agem competindo com a ACh, outros inibem a acilação do grupo OH da Ser200, formando um éster de carbamilo, mais estável que o acetato e menos apto a sair do sítio activo. Tendo isso em conta, há um enorme interesse científico na pesquisa de novos compostos para o tratamento da DA, já que é possível encontrar estruturas muito diferentes das conhecidas até ao momento e que sejam simultaneamente bons inibidores da AChE e não provoquem efeitos secundários adversos.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Numa primeira fase o material vegetal foi colectado na Ilha de São Miguel nos Açores em Janeiro de 2008, no local (3) indicado na **Figura. 2.1.** O material vegetal incluía rizomas, folhas maduras, folhas jovens, caules, sementes e frutos de *H. gardnerianum*, no âmbito do projecto de Licenciatura em Ciências Biológicas e da Saúde do Dr. Rafael Nunes, na Universidade dos Açores.

Numa segunda fase, colectaram-se na Ilha de São Miguel, folhas maduras de *H. gardnerianum*, em todos os pontos indicados na **Figura. 2.1.** entre os meses de Fevereiro e Maio de 2010.

Posteriormente às recolhas, o material vegetal foi levado para a Universidade dos Açores, Pólo de Ponta Delgada Universidade dos Açores, onde foi cuidadosamente limpo de impurezas (terra ou areia), eliminando-se o material com algum sinal de deterioração e armazenando-o a -80°C, para posterior utilização.



Figura. 2.1. Mapa da Ilha de São Miguel nos Açores. (Fonte: Google Earth 5.1.3533.1731).

São mostrados os quadro pontos da colecta:

- (1) Sete Cidades ($37^{\circ} 50' 44,69''\text{N}$ and $25^{\circ} 45' 46,12''\text{W}$);
- (2) Fogo ($37^{\circ} 47' 06,62''\text{N}$ and $25^{\circ} 28' 35,62''\text{W}$);
- (3) Furnas ($37^{\circ} 45' 59,02''\text{N}$ and $25^{\circ} 20' 05,75''\text{W}$);
- (4) Achada ($37^{\circ} 49' 39,28''\text{N}$ and $25^{\circ} 15' 28,35''\text{W}$).

2.2. Preparação dos extractos

2.2.1. Extractos metanólico e diclorometânico

Os materiais vegetais recolhidos foram cortados e extraídos segundo uma sequência, numa primeira etapa com diclorometano (CH_2Cl_2), durante 10 horas, numa segunda fase, com metanol (CH_3OH), durante 10 horas (**Figura. 2.2.**), numa proporção de 1g/ 4 mL de solvente.

Os extractos foram posteriormente evaporados à secura, sob vácuo, a uma temperatura de 40°C, num evaporador rotativo, *Büchi Rotavapor R210*, para os extractos metanólicos (**Figura. 2.3.**), e num evaporador rotativo *Büchi Rotavapor RE121*, para os extractos diclorometânicos (**Figura. 2.4.**), sendo por último armazenados, protegidos de luz, a uma temperatura de -20 °C, até ao momento dos ensaios.



Figura. 2.2. Fotografia da extracção da fracção diclorometânica (Foto de: Autor)



Figura. 2.3. Fotografia em pormenor da fracção diclorometânica no evaporador rotativo *Büchi rotavapor RE121* (Foto de: Autor).



Figura. 2.4. Fotografia em pormenor da fracção metanólica no evaporador rotativo *Büchi Rotavapor RE210* (Foto de: Autor)

2.2.2. *Extracção e fraccionamento do extracto diclorometânico*

A repetição da extracção com diclorometano de folhas maduras e os respectivos fraccionamentos foram elaborados pela Doutora Ana Seca do Departamento de Ciências Tecnológicas e do Desenvolvimento da Universidade dos Açores, sendo que a mesma, muito gentilmente, disponibilizou o material para análise para esta dissertação.

A extracção iniciou-se com 0.427 Kg de folhas maduras de *H. gardnerianum*, pertencentes ao mesmo conjunto recolhido pelo Dr. Rafael Nunes e armazenadas a -80°C . Depois de trituradas, estas folhas foram colocadas num balão volumétrico com 2.0L de diclorometano, durante 3 dias, resultando desta extracção 8.28g de extracto seco após evaporação com evaporador rotativo. Este extracto foi fraccionado tendo em conta a sua solubilidade a quente em hexano (fracção designada por 1.1, 4,66 gramas), hexano:diclorometano 50% (fracção designada por 1.2, 2,39 gramas) e o restante designado por resíduo (0,63 gramas). As fracções 1.1 e 1.2 foram armazenadas em *eppendorfs* com massa suficiente para fazer testes biológicos (1.1 115,1 mg; 1.2 46,3 mg).

A fracção 1.2 revelou-se, entretanto, a mais activa em testes preliminares com outras finalidades que não as descritas por este trabalho, pelo que foi fraccionada em Universidade de La Laguna, Canárias, Espanha, por cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com hexano: acetato de etilo em proporções de 0% a 100% de acetato de etilo, de 5 em 5 % (100 mL de cada), tendo resultado a recolha de 84 fracções.

A análise dessas fracções por TLC permitiu reunir as que possuíam perfil idêntico:

- Da 1 à 18 fracção 1.2.1;
- Da 19 à 22 fracção 1.2.2;
- Da 23 à 24 fracção 1.2.3;
- Da 25 à 28 fracção 1.2.4;
- Da 29 à 34 fracção 1.2.5;
- Da 35 à 47 fracção 1.2.6;
- Da 48 à 61 fracção 1.2.7;
- Da 62 à 81 fracção 1.2.8;
- Da 82 à 84 fracção 1.2.9.

2.2.3. Extracção dos óleos essenciais

As extracções de óleo essencial foram realizadas por hidrodestilação através de um aparelho graduado tipo Clevenger. (*Figura. 2.5.*)

Para a obtenção dos óleos essenciais das plantas analisadas, foram utilizados 300g de folhas cortadas em pedaços. Estas foram colocadas em balões de extracção de 2000mL, adicionando-se água destilada até perfazer o seu volume. Estes balões de extracção foram submetidos a uma temperatura de aproximadamente 100°C, durante um período de 90 minutos, após o início da ebulição. Ao fim desse tempo retiraram-se as amostras, recomeçando-se o processo de modo idêntico até se obter uma quantidade de óleo suficiente para as análises e ensaios de actividade anticolinesterásica.

Após cada extracção o óleo essencial foi quantificado com o auxílio de uma micropipeta. As amostras foram armazenadas a -20°C, até ao momento da análise.



Figura. 2.5. Aparelho de Clevenger utilizado na extração dos óleos essenciais. (Foto de: Autor)

2.3. Determinação da actividade da Acetilcolinesterase

Para medir a actividade da AChE, foram modificados os ensaios descritos por Ellman *et al.* (1961) e Ingkaninan *et al.* (2003).

Em 1961, Ellman e colaboradores descreveram um método espectrofotométrico para a determinação da actividade anticolinesterásica (Ellman *et al.*, 1961). O método baseia-se na medição da taxa de produção de tiocolina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase. Isto ocorre pela reacção posterior da tiocolina (1) com reagente de Ellman (2) (DTNB), produzindo o anião amarelo (3) (**Figura. 2.6.**).

A taxa da produção do composto colorido 3 é monitorizada num espectrofotómetro UV/VIS a 412 ou 405 nm.

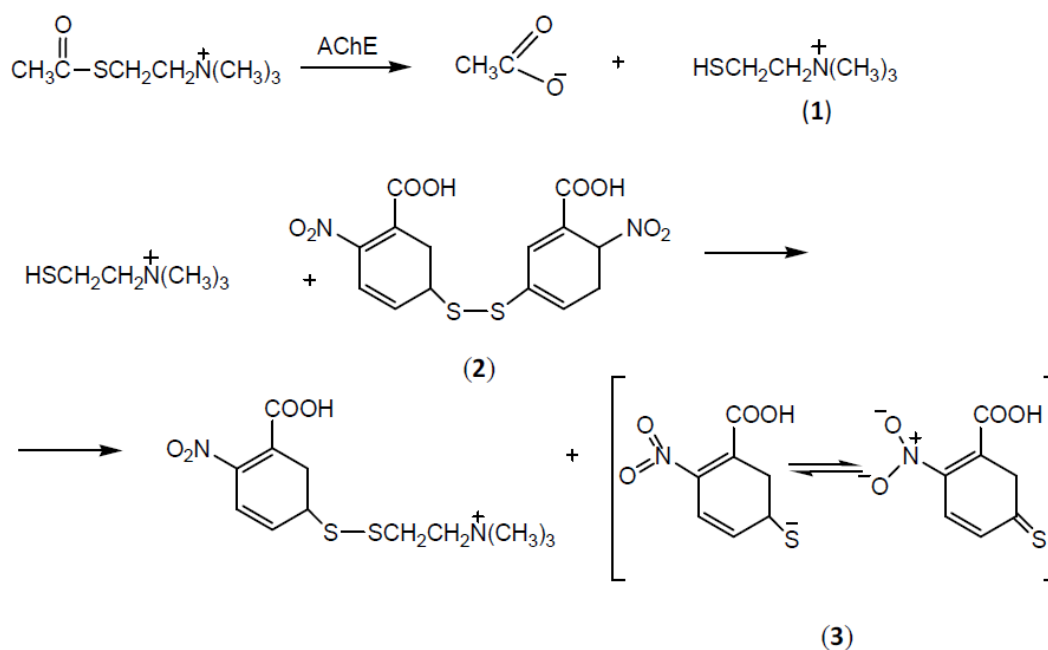


Figura. 2.6. Esquema representativo da série de reacções químicas descritas por Ellman *et al.* (1961).

Este método fotométrico exige uma elevada solubilidade em água de todos os reagentes e principalmente das amostras, uma vez que os tampões e soluções o são em meio aquoso (Ellman *et al.*, 1961).

A triagem de substâncias químicas frente a um enzima (alvo macromolecular) pode ser abordada (i) pela avaliação do efeito em dose única (% inibição) ou (ii) pela determinação da metade da máxima concentração inibitória (IC₅₀). Frequentemente, faz-se uma triagem preliminar com doses únicas, que podem ser concentrações padrões pré-estabelecidas; As substâncias que mostram inibição significativa nesse ensaio são seleccionadas para estudos mais detalhados, visando a determinação do IC₅₀.

O IC₅₀ dos candidatos a inibidores, por sua vez, é estabelecido através de ensaios que levam à criação de gráficos do tipo *concentração X resposta*. A análise por regressão não-linear desses gráficos leva à determinação do factor de potência IC₅₀, que se refere à concentração de inibidor necessária para reduzir em 50% a actividade enzimática, em condições experimentais consideradas padrão. Esse importante parâmetro cinético permite a análise quantitativa e comparativa dentro de uma série de compostos, criando dados úteis para o estabelecimento de relações entre a estrutura e a actividade (SAR, do inglês, *Structure-Activity Relationships*).

Neste estudo utilizou-se acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (Sigma-Aldrich®, ref^oC3389). Para tal, preparou-se uma solução stock de 1000 U/mL em tampão fosfato de sódio 0.1 M pH 7.0, 0.1% de BSA. Esta solução foi diluída no mesmo tampão para obter uma solução de enzima 0.25 U/mL, sendo a concentração utilizada nos ensaios em microplaca. As soluções foram divididas em alíquotas e conservadas a -80°C até ao momento dos ensaios.

Para os ensaios em microplaca foram preparados soluções-mãe de concentração 100mg/mL. As soluções metanólicas e dos óleos essenciais foram preparadas com solvente metanol, enquanto as soluções mãe das fracções diclorometânicas, foram preparadas com dimetilsulfóxido.

Uma diluição subsequente foi efectuada com tampão fosfato de sódio 0.1 M pH 8.0, para uma concentração de 5 mg/mL. A percentagem de solvente nesta última solução nunca excedeu os 2.5% (v/v).

A actividade da acetilcolinesterase foi monitorizada a 415nm num leitor de microplacas Biorad modelo 680, instalado numa sala climatizada a 25°C.

2.3.1. Determinação da percentagem de inibição da Acetilcolinesterase.

Com o auxílio de uma pipeta multicanal, realizou-se em cada microplaca uma diluição seriada dos extractos e óleos a testar de modo a obter concentrações entre zero (controlo) e 2.5 mg/mL, em tampão fosfato de sódio 0.1 M, pH 8.0. Adicionou-se a todos os poços da microplaca 5 µL de DTNB 3mM e 5µL de AChI 75 mM, de modo a obter um volume final de 240 µL. A reacção foi iniciada pela adição, com um dispensador automático, de 10 µL de AChE 0.25U/mL. A microplaca foi colocada imediatamente no leitor de microplacas, e a variação da absorvância monitorizada a

415 nm aos 0, 150, 300 e 450 segundos. O protocolo detalhado pode ser consultado no Anexo II.

As percentagens de inibição foram calculadas comparando-se as taxas de reacção das amostras com a taxa de reacção do controlo através da fórmula (1):

$$(1) \% \text{ Inibição} = 100 - \left(\frac{\text{Taxa da reacção da amostra}}{\text{Taxa de reacção do controlo}} \times 100 \right)$$

As taxas de reacção foram calculadas utilizando o software Microsoft® Excell 2007 e por software apropriado para o efeito, a saber, GraphPad® Prism versão 5.0. Para a determinação do IC₅₀ foi utilizado o software EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM Versão 1.4.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados obtidos apresentados como média ± SEM (*standard error of the mean*, ou seja, erro padrão).

2.3.2. Determinação do tipo de inibição

A variação da velocidade com a concentração de substrato foi determinada em microplaca, em tampão fosfato de sódio 0.1 M pH 8.0, com 10 µL de DTNB 3mM, 240 µL de volume final e concentrações de AChI entre zero e 3 mM, em presença ou ausência de amostras a testar. As amostras ou padrões a testar foram adicionadas em concentrações aproximadamente iguais a ½ IC₅₀. A reacção foi iniciada por adição de 10 µL de AChE 0.25 U/mL. A microplaca foi imediatamente colocada no leitor de microplacas e a variação da absorvância monitorizada aos 0, 150, 300 e 450 segundos. O protocolo detalhado pode ser consultado no Anexo II.

As taxas das reacções foram calculadas utilizando o software Microsoft® Excell 2007 e um software apropriado para o efeito, GraphPad® Prism versão 5.0. Os cálculos de cinética enzimática foram efectuados com o auxilio de gráficos de Lineweaver-Burk realizados utilizando dois softwares apropriados para o efeito, GraphPad® Prism versão 5.0. e Hyper 32 Versão 1.0.0, e pelo software Microsoft® Excell 2007.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados obtidos apresentados como média ± SEM.

2.4. Análise Estatística

Os dados obtidos nos foram sujeitos a uma transformação arco-seno, antes de se proceder a análise de variância (ANOVA). No caso de esta análise ser significativa, as médias eram separadas por um Tukey multiple range test, a $P < 0.05$. Para este tratamento utilizou-se o SPSS Statistics 17.0.

3. Resultados

3.1. Inibição da actividade anticolinesterásica em diversas partes da planta

Antes de qualquer ensaio com as diversas partes da planta, avaliou-se os valores de IC_{50} de três compostos puros referidos na bibliografia como inibidores da AChE, o α -pineno (Orhan *et al.*, 2003), o ácido ursólico (Chung *et al.*, 2001) e a galantamina (Michaelis, 2003). De entre estes o maior inibidor da AChE foi a galantamina ($IC_{50}=0.078\text{mg/mL}$), seguindo-se o ácido ursólico ($IC_{50}=0.185\text{mg/mL}$) e finalmente o α -pineno, com uma capacidade de inibição muito inferior aos outros dois compostos ($IC_{50}=1.43\text{mg/mL}$) (**Tabela 3.1**).

Tabela 3.1. Inibição da actividade de acetilcolinesterase por compostos puros. Os valores. Os valores apresentados são expressos em IC_{50} e são médias \pm erro padrão (SEM) de três ensaios experimentais.

Composto	IC_{50} (mg/mL)	
	Média	SEM
α -pineno	1.43	0.093
Galantamina	0.078	0.002
Ácido ursólico	0.185	0.008

Numa primeira fase, e como foi anteriormente indicado, pretendeu-se avaliar a parte da planta com maior actividade de inibição da acetilcolinesterase. Deste modo, foram analisados os extractos diclorometânicos e metanólicos de rizomas, folhas maduras, folhas jovens, caules, sementes e frutos de *H. gardnerianum*. Uma vez que não era possível determinar valores de IC_{50} para todos os extractos, dado que em alguns casos as percentagens de inibição não chegavam aos 50%, optou-se por apresentar também as percentagens de inibição a 2.5 mg/mL, a concentração de extracto mais elevada utilizada nestes ensaios (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2. Inibição da actividade de acetilcolinesterase por extractos de DCM e de MeOH de diferentes partes da planta. Apresentam-se as percentagens de inibição a 2.5 mg extracto/mL e os valores de IC₅₀, quando possível (ver texto). Os valores apresentados são médias ± erro padrão (SEM), de três ensaios experimentais.

Parte da Planta	Solvente	% Inibição a 2.5 mg/mL		IC ₅₀ (mg/mL)	
		Média	SEM	Média	SEM
Caule	MeOH	34.63	0.98	---	---
	DCM	38.06	0.65	---	---
Frutos	MeOH	70.93	0.98	2.07	0.09
	DCM	55.17	1.15	1.39	0.09
Folhas Maduras	MeOH	78.66	1.07	0.86	0.02
	DCM	80.60	0.66	0.74	0.04
Sementes	MeOH	70.41	0.84	2.54	0.09
	DCM	50.54	0.27	1.46	0.02
Rizomas	MeOH	47.09	0.70	---	---
	DCM	34.46	1.56	---	---
Folhas Jovens	MeOH	34.85	0.29	---	---
	DCM	34.85	1.23	---	---

Como se pode verificar na **Tabela 3.2.** os extractos de Caule, Rizomas e Folhas Jovens foram os que apresentaram uma actividade anticolinesterásica mais baixa, não chegando a 50% de inibição a 2.5 mg/mL. Entre este, os extractos de folhas jovens foram aqueles cuja actividade de inibição foi mais baixa. Quanto aos restantes, os extractos provenientes de folhas maduras foram os que apresentaram os valores mais elevados de inibição daquele enzima. Em segundo lugar de potência inibitória seguiram-se os extractos de fruto, seguindo-se os extractos de semente. Esta tendência verificou-se tanto no caso dos extractos de diclorometano como nos de metanol, e possivelmente deve-se ao facto de, no caso das folhas jovens, ainda não haver acumulação de compostos secundários suficiente para inibir significativamente a AChE. Por outro lado, em termos globais, e os extractos de DCM apresentam uma percentagem de inibição sempre superior, quando comparados aos extractos de MeOH.

A análise do parâmetro IC₅₀ permitiu comparar a actividade anticolinesterásica entre as amostras, e ainda compará-la com os valores da literatura científica. Verifica-se que os extractos provenientes das folhas maduras são aqueles que apresentam valores de IC₅₀, menores, quer no caso do extracto DCM, quer no extracto MeOH, com um valor médio de 0.86 mg/mL para o caso do extracto MeOH, e de 0.74 mg/mL, no caso do

extracto DCM, ou seja, são inibidores mais activos que o α -pineno. Tanto os extractos DCM, como os extractos MeOH dos Frutos e Sementes têm valores de IC_{50} superiores a 1.00 mg/mL. Tendo em linha de conta o descrito em termos bibliográficos, extractos vegetais que apresentam um valor de IC_{50} inferior a 1.00 mg/mL têm o seu potencial anticolinesterásico descrito como alto (Ingkaninan *et al.*, 2003; Khalid *et al.*, 2004; Orhan *et al.*, 2004; Adsersen *et al.*, 2006). Sendo assim, os extractos DCM e MeOH de folhas maduras apresentaram uma excelente inibição de AChE, pelo que foram seleccionados para a continuação deste trabalho.

3.2. Variação da actividade anticolinesterásica com o local de crescimento da planta

Numa segunda fase foram analisados apenas extractos de folhas maduras de *H. gardnerianum*, em diferentes locais da ilha, no sentido de avaliar a variabilidade da actividade anticolinesterásica com o local de recolha.

Optou-se por comparar em primeiro lugar as percentagens de inibição da acetilcolinesterase, quando o mesmo enzima foi submetido a uma concentração de extracto de 2.50 mg/mL, uma vez que nalguns casos a inibição à concentração máxima não chegava a 50%, não sendo portanto possível determinar o IC₅₀ (**Figuras. 3.1 e 3.2**).

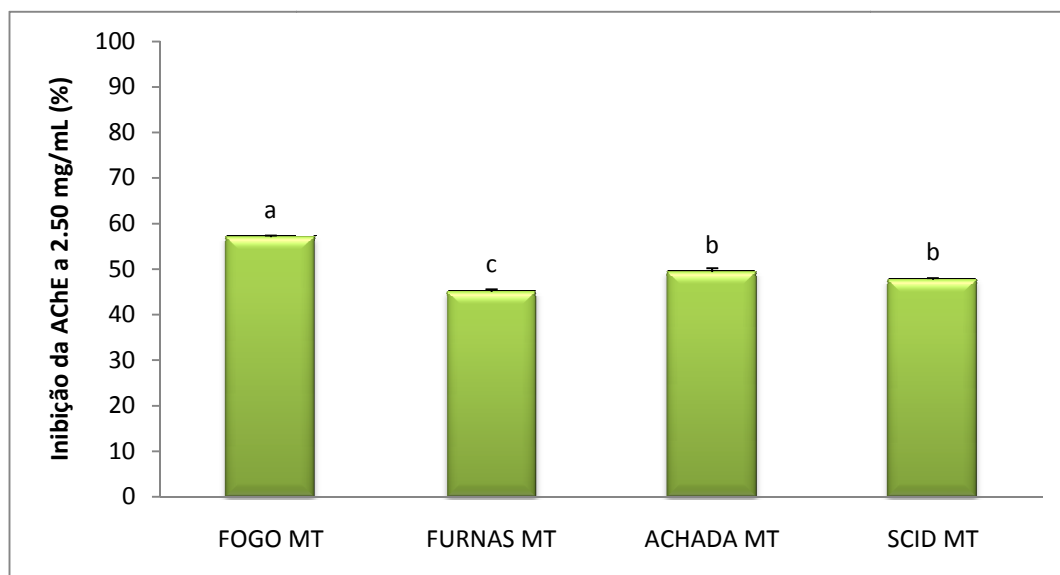


Figura 3.1. Valores da percentagem de inibição dos extractos metanólicos de folhas maduras a uma concentração de 2.50 mg/mL. FOGO, plantas recolhidas junto à Lagoa do Fogo, FURNAS, junto à Lagoa das Furnas, Achada, na Achada do Nordeste e SCID, nas Sete Cidades. Cada coluna corresponde à média de 3 ensaios. As linhas no topo de cada barra indicam o erro padrão. Médias assinaladas pela mesma letra indicam diferenças não significativas entre extractos a $P = 0,05$ (LSD test).

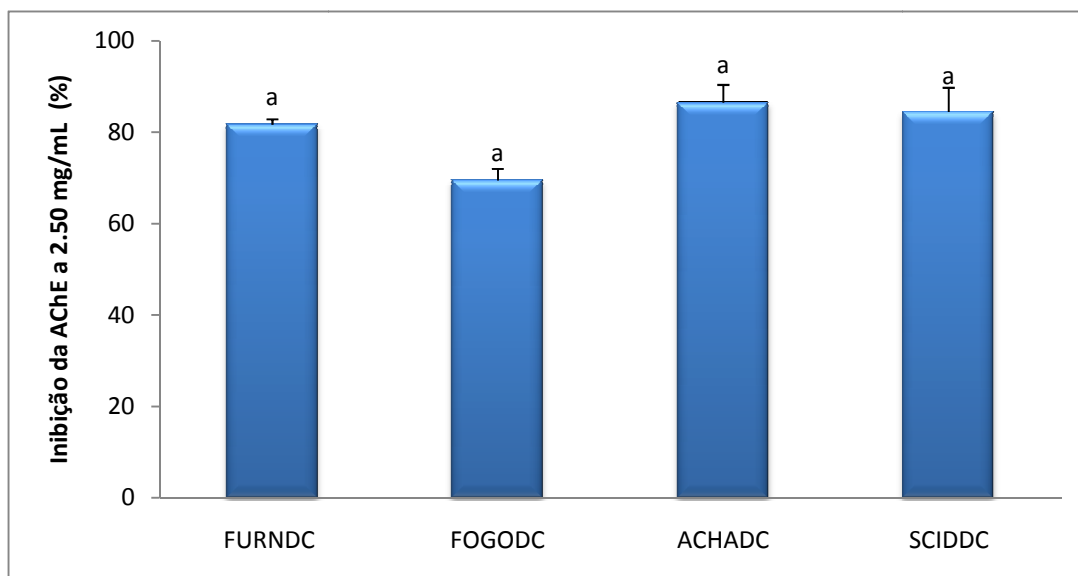


Figura 3.2. Valores da percentagem de inibição dos extractos diclorometânicos de folhas maduras a uma concentração de inibidor de 2.50 mg/mL. FOGO, plantas recolhidas junto à Lagoa do Fogo, FURNAS, junto à Lagoa das Furnas, Achada, na Achada do Nordeste e SCID, nas Sete Cidades. Cada coluna corresponde à média de 3 ensaios. As linhas no topo de cada barra indicam o erro padrão. Médias assinaladas pela mesma letra indicam diferenças não significativas entre extractos a $P = 0,05$ (LSD test).

Como se pode observar na **Figura. 3.1.**, apenas o extracto MeOH recolhido junto à Lagoa do Fogo apresenta supera os 50% de inibição à concentração acima referida, com um valor médio de 57,0%. Tendo isso em conta, não se procedeu ao cálculo dos valores de IC_{50} destes extractos. É de referir ainda que se verificaram diferenças significativas entre os extractos testados ($F=81,592$; $df= 11$; $P= 0,000$).

Os extractos de diclorometano apresentaram percentagens de inibição significativamente mais elevada, com um valor médio de 80,54% (**Figura. 3.2**). Na **Figura. 3.3.** apresentam-se os respectivos valores de IC_{50} .

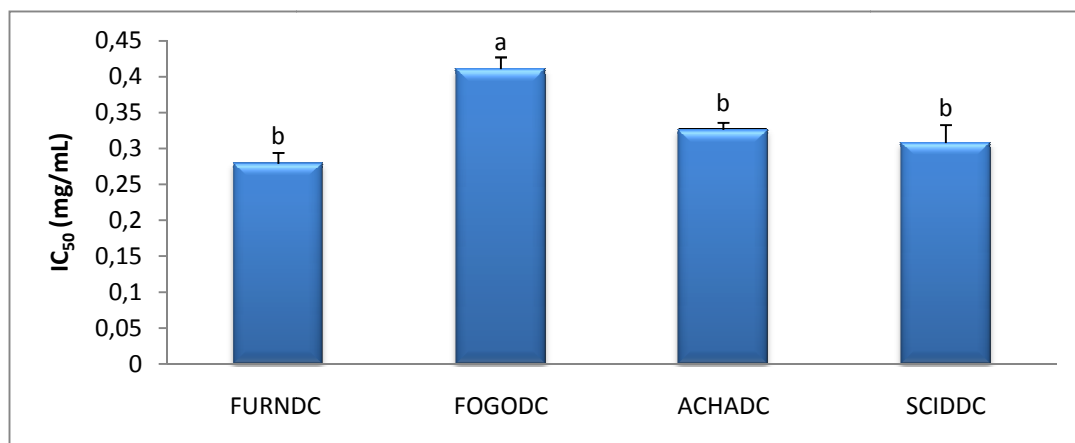


Figura. 3.3. Valores de IC₅₀ de inibição da AChE por extractos DCM de folhas maduras de *H. gardnerianum* de quatro locais de colheita diferentes. FOGO, plantas recolhidas junto à Lagoa do Fogo, FURNAS, junto à Lagoa das Furnas, Achada, na Achada do Nordeste e SCID, nas Sete Cidades. Cada coluna corresponde à média de 3 ensaios. As linhas no topo de cada barra indicam o erro padrão. Médias assinaladas pela mesma letra indicam diferenças não significativas entre os extractos analisados a $P = 0,05$ (LSD test).

Como podemos observar na **Figura. 3.3.**, os extractos DCM de Folhas maduras de *H. gardnerianum* apresentam uma actividade anticolinesterásica extremamente elevada, com valores de IC₅₀ entre 0,28 e 0,41 mg/mL, inferiores ao valor do α -pineno e da mesma ordem de grandeza do ácido ursólico. Tendo em conta o que já foi referido, podemos considerar que estes extractos têm um elevado potencial anticolinesterásico. É de salientar, mais uma vez, que se observaram diferenças significativas entre plantas recolhidas em diferentes zonas. ($F=10,436$; $df= 11$; $P= 0,004$).

No que diz respeito aos óleos essenciais de folhas maduras (**Figura. 3.4**), as percentagens de inibição a 2,5 mg/mL situam-se entre as obtidas para os extractos metanólicos e os extractos diclorometânicos.

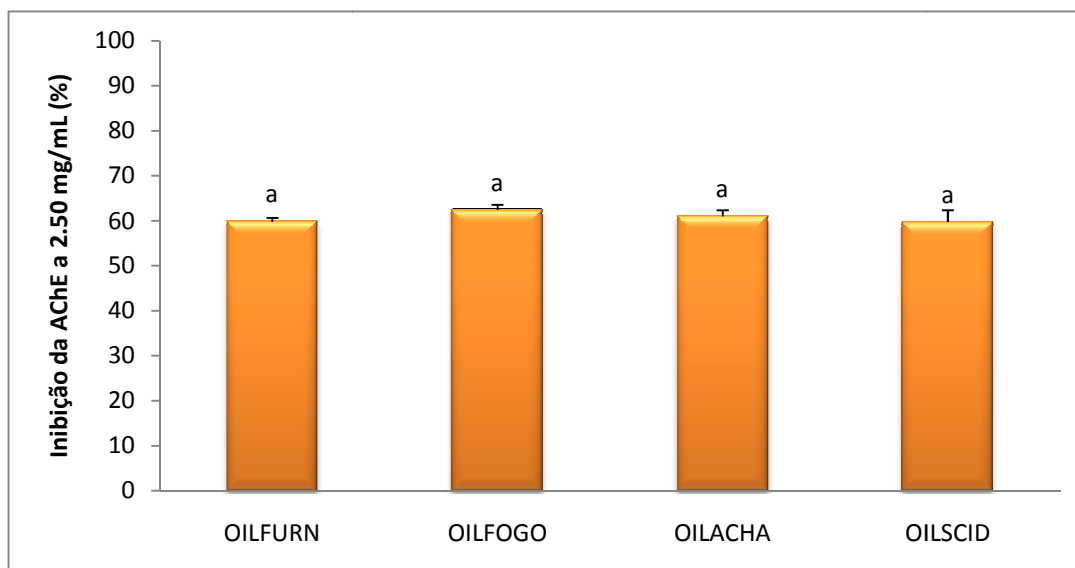


Figura 3.4. Valores da percentagem de inibição por óleos essenciais de folhas maduras a uma concentração de 2.50 mg/mL. OILFURN, junto à Lagoa das Furnas. OILFOGO, junto à Lagoa do Fogo. OILACHA, Achada do Nordeste e OILSCID, Sete-Cidades. Cada coluna corresponde à média de 3 experiências. As linhas no topo de cada barra indicam o erro padrão. Médias assinaladas pela mesma letra indicam diferenças não significativas entre óleos essenciais a $P = 0,05$ (LSD test).

Os valores de IC_{50} dos óleos essenciais (**Figura. 3.5**), embora relativamente baixos, indicam que os óleos são menos activos que os extractos diclorometânicos, apresentando valores 3 a 4 vezes superiores. Deste modo, embora estejam próximos do limite do que se pode considerar uma boa fonte de actividade anticolinesterásica, não são tão promissores se considerarmos apenas o seu potencial de inibição.

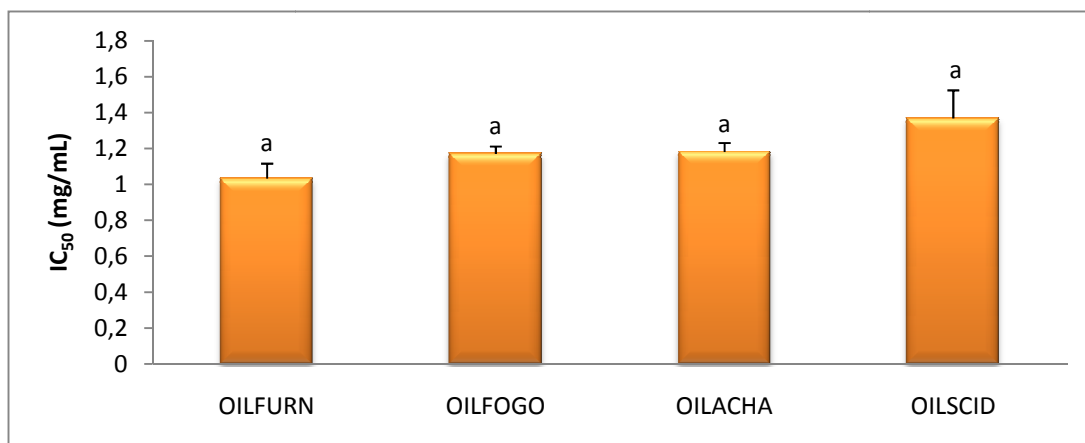


Figura. 3.5. Valores de IC₅₀ de inibição da AChE por óleos essenciais folhas de *H. gardnerianum* de quatro locais de colheita diferentes. OILFURN, junto à Lagoa das Furnas. OILFOGO, junto à Lagoa do Fogo. OILACHA, Achada do Nordeste e OILSCID Sete-Cidades. Cada coluna corresponde à média de 3 ensaio. As linhas no topo de cada barra indicam o erro padrão. Médias assinaladas pela mesma letra indicam diferenças não significativas entre óleos essenciais a $P = 0,05$ (LSD test).

Efectivamente, os óleos essenciais provenientes das folhas maduras apresentam valores de IC₅₀ muito próximos de 1.00 mg/mL. À semelhança do que se verificou nos extractos de DCM, o óleo essencial proveniente das folhas maduras recolhidas nas Furnas foi aquele que possui um valor de IC₅₀ menor, com um valor de 1.03 mg/mL. De qualquer modo, o IC₅₀ dos óleos essenciais testados foi sempre inferior ao obtida para o α -pineno. É de referir ainda que não se verificaram diferenças significativas entre os extractos testados ($F=2,139$; $df= 11$; $P= 0,173$).

3.3. Actividade anticolinesterásica de fracções dos extractos DCM de folhas maduras

Uma vez que se os resultados mais favoráveis foram obtidos com os extractos diclorometânicos de folhas maduras, testou-se a actividade anticolinesterásica de fracções obtidas a partir de um outro extracto de diclorometano das plantas recolhidas nas Furnas, no âmbito do projecto de final de licenciatura do Dr. Rafael Nunes. Na **Figura 3.6.** estão representadas os valores médios de IC_{50} dessas fracções.

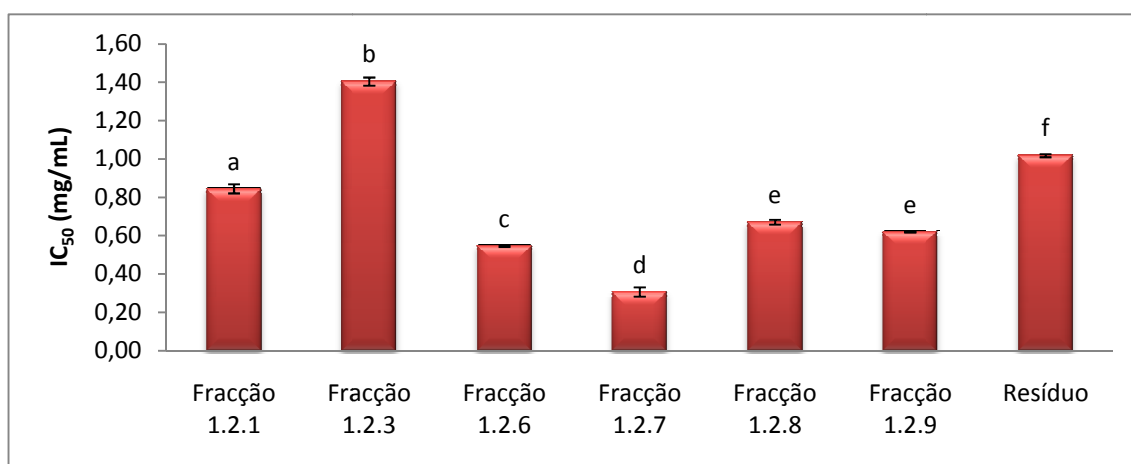


Figura. 3.6. Valores de IC_{50} das fracções obtidas a partir de extractos DCM de folhas maduras de *H. gardnerianum*. Cada coluna corresponde à média de 3 ensaios. As linhas no topo de cada barra indicam o erro padrão. Médias assinaladas pela mesma letra indicam diferenças não significativas entre óleos essenciais a $P = 0,05$ (LSD test).

Como podemos observar na **Figura. 3.6.**, verificaram-se diferenças significativas entre as fracções ($F = 478,962$; $df = 20$; $P = 0,000$), sendo a fracção 1.2.7 aquela que possui um valor de IC_{50} menor, com um valor de $0,31$ mg/mL. Todas as outras fracções representadas apresentam um IC_{50} inferior a $1,00$ mg/mL, com a excepção da fracção 1.1.3, que apresenta um valor de IC_{50} de $1,40$ mg/mL. Assim, a fracção 1.2.7 representou um enriquecimento da actividade anticolinesterásica, sendo 2.4 vezes mais activa do que a o extracto diclorometânico preparado a partir das mesmas folhas, mais activa que o α -pineno e da mesma ordem de grandeza do ácido ursólico (IC_{50} $0,74$, $1,43$ e $0,185$ mg/mL, respectivamente). Este aumento da actividade por mg de extracto seco corresponde a um enriquecimento na (ou nas) molécula (s) activa (s), sendo um bom indicador do caminho a seguir para a purificação e caracterização do princípio activo.

3.4. Caracterização do tipo de inibição da Acetilcolinesterase

Procurou-se caracterizar o tipo de inibição da acetilcolinesterase para os extractos que apresentavam valores de IC_{50} inferiores ou próximos a 1.00 mg/mL.

A análise do perfil de inibição obtido através da representação gráfica de Lineweaver-Burk permite avaliar o tipo de inibição do composto em estudo. O tipo de inibição classifica-se segundo o efeito que produzam nas constantes cinéticas K_m e V_{max} . No sentido de facilitar a análise dos resultados, a **Tabela 3.3.** apresenta um resumo das alterações sofridas pelos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} em diversos tipos de inibição reversível.

Tabela 3.3. Tipos de inibição reversível e respectivas variações do K_m e V_{max} (Adaptado de Roberts, 1977)

Tipo de inibição	K_m	V_{max}
Competitiva	↑	↔
Não competitiva	↔	↓
Incompetitiva	↓	↓
Mista	↑; ↔ ou ↓	↓

↑, representa um aumento dos valores de K_m ou V_{max} , quando na presença de inibidor em relação à ausência do último; ↓, representa uma diminuição dos valores de K_m ou V_{max} , quando na presença de inibidor em relação à ausência do mesmo; ↔, representa uma manutenção dos valores de K_m ou V_{max} , quando na presença de inibidor em relação à ausência do último.

Numa primeira fase, estudaram-se diversos compostos puros, sendo estes referidos na literatura científica como inibidores da acetilcolinesterase: o α -pineno, referido por Orhan *et al.* (2003) como um inibidor não competitivo da AChE, a galantamina referida por Michaelis, (2003) como um inibidor competitivo e o ácido ursólico, referido por Chung *et al.* (2001), como um inibidor competitivo deste enzima.

Os resultados obtidos apresentam-se sob a forma de gráficos de Lineweaver-Burk (**Figuras. 3.7.-3.9.**), tendo sido determinados os valores de K_m e V_{max} em presença e ausência de inibidor (**Tabela 3.3.**).

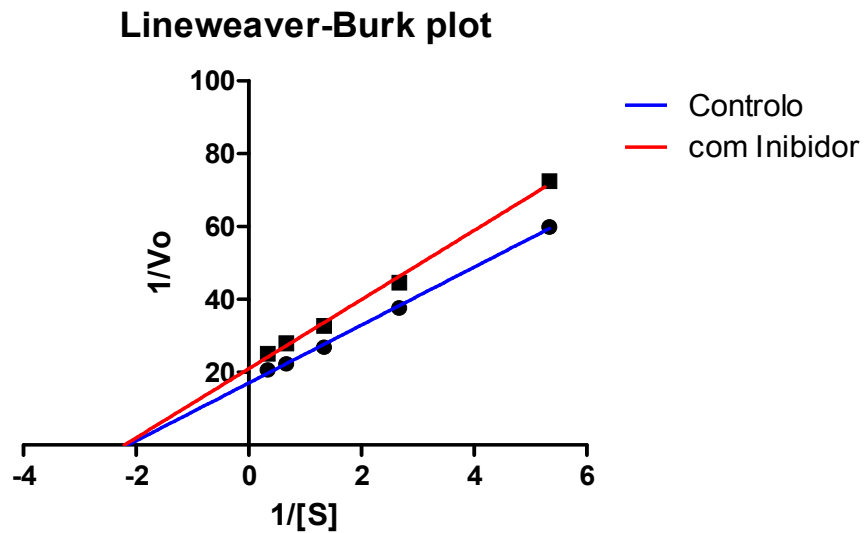


Figura. 3.7. Gráfico de Lineweaver-Burk correspondente à determinação do tipo de inibição para o α -pineno a uma concentração igual a 1.25 mg/mL. [S] é apresentado em mM e V_o em $\Delta\text{Abs}_{415\text{nm}}/\text{min}$.

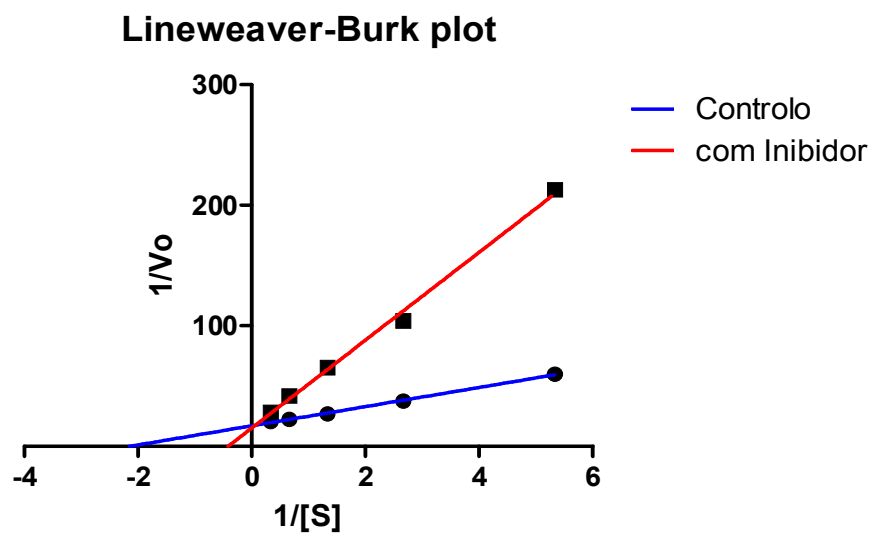


Figura. 3.8. Gráfico de Lineweaver-Burk correspondente à determinação do tipo de inibição para a galantamina a uma concentração igual a 0.078 mg/mL. [S] é apresentado em mM e V_o em $\Delta\text{Abs}_{415\text{nm}}/\text{min}$.

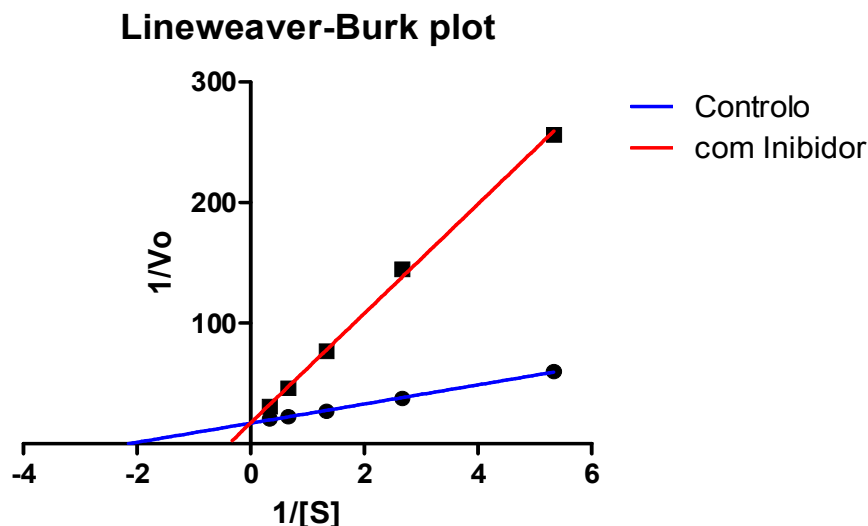


Figura. 3.9. Gráfico de Lineweaver-Burk correspondente à determinação do tipo de inibição para o ácido ursólico a uma concentração igual a 0.185 mg/mL. $[S]$ é apresentado em mM e V_o em $\Delta Abs_{415nm}/min$.

Tabela 3.3. – Parâmetros cinéticos para compostos puros.

	Acetilcolinesterase	
	K_m (mg/mL)	$V_{max}(\Delta Abs_{415nm}/min)$
Controlo (a)	0.4663	0.05867
α -pineno (b)	0.4527	0.04771
Galantamina (c)	2.410	0.06614
Ácido Ursólico (d)	2.627	0.05789

Os valores apresentados foram calculados para a inibição da acetilcolinesterase pelos compostos puros, e pelo padrão, α -pineno: valores de K_m , $V_{m\acute{a}x}$. (a) sem inibidor; (b) 1.25 mg/mL; (c) 0.078 mg/mL; (d) 0.185 mg/mL.

No caso do α -pineno, o valor de K_m é aproximadamente igual ao controlo enquanto o de V_{max} diminui na presença do composto, o que indica uma inibição não competitiva. Este resultado está de acordo com Orhan *et al.* (2003), que também refere este tipo de inibição para o α -pineno, como já foi referido anteriormente. No caso da galantamina, o valor de V_{max} é aproximadamente igual ao controlo enquanto o K_m aumenta na presença do composto, o que indica uma inibição competitiva. Este resultado está de acordo com Michaelis (2003), como já foi referido anteriormente. No caso do ácido ursólico, o valor de V_{max} é aproximadamente igual ao controlo enquanto o K_m aumenta na presença do composto, o que indica uma inibição competitiva. Este resultado está de acordo com Chung *et al.* (2001), como já foi referido anteriormente.

Numa segunda fase, estudaram-se diversos óleos essenciais. Os resultados obtidos apresentam-se sob a forma de gráficos de Lineweaver-Burk (**Figuras. 3.10-3.13**), tendo sido determinados os valores de K_m e V_{max} em presença e ausência de Inibidor (**Tabela 3.4**).

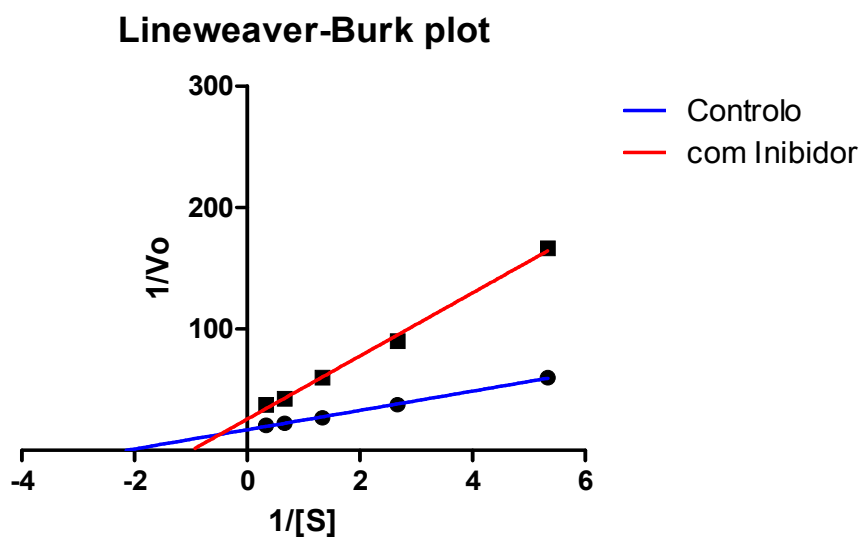


Figura. 3.10. Gráfico de Lineweaver-Burk correspondente à determinação do tipo de inibição para o óleo essencial de *H. gardnerianum*, recolhido no local Sete-Cidades, a uma concentração igual a 1.25 mg/mL. $[S]$ é apresentado em mM e V_o em $\Delta\text{Abs}_{415\text{nm}}/\text{min}$.

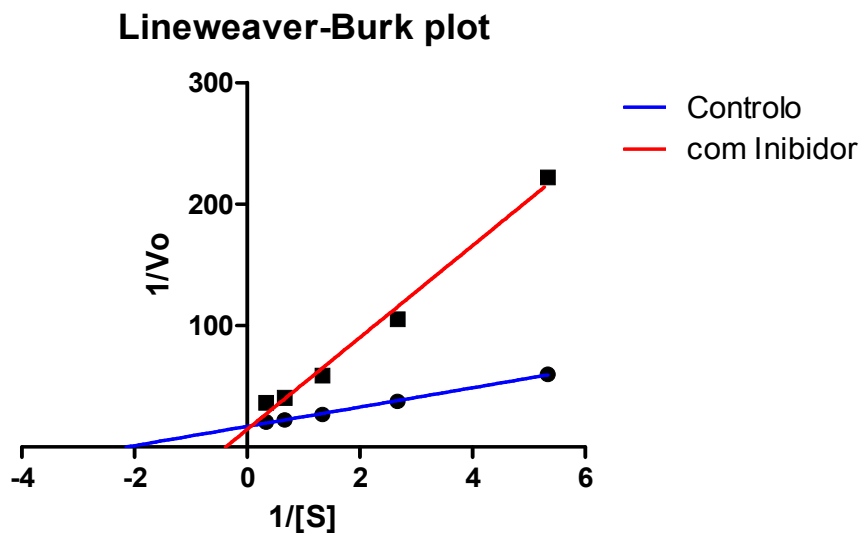


Figura. 3.11. Gráfico de Lineweaver-Burk correspondente à determinação do tipo de inibição para o óleo essencial de *H. gardnerianum*, recolhido no local Achada, a uma concentração igual a 1.25 mg/mL. [S] é apresentado em mM e V_o em $\Delta\text{Abs}_{415\text{nm}}/\text{min}$.

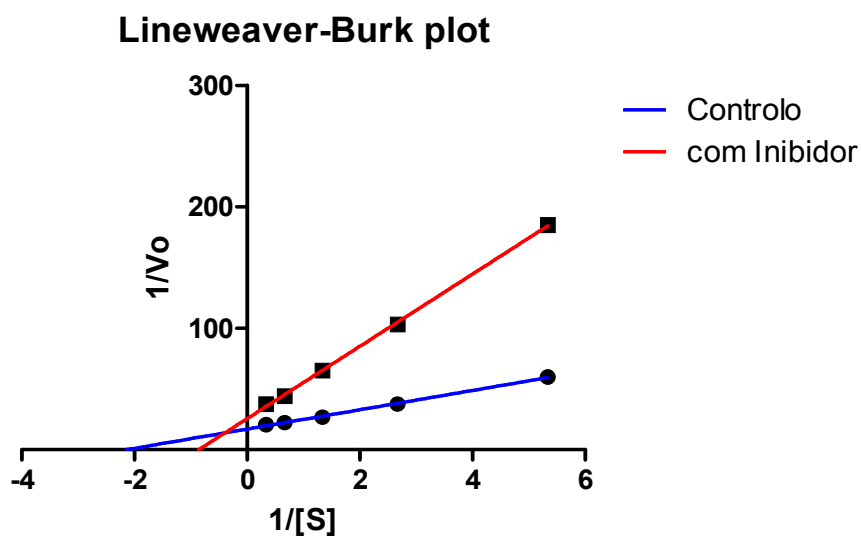


Figura. 3.12. Gráfico de Lineweaver-Burk correspondente à determinação do tipo de inibição para o óleo essencial de *H. gardnerianum*, recolhido no local Fogo, a uma concentração igual a 1.25 mg/mL. [S] é apresentado em mM e V_o em $\Delta\text{Abs}_{415\text{nm}}/\text{min}$.

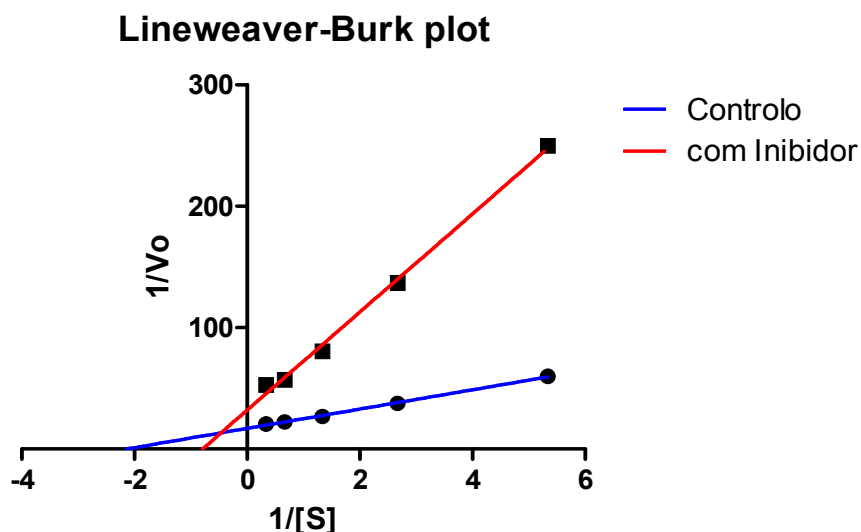


Figura. 3.13. Gráfico de Lineweaver-Burk correspondente à determinação do tipo de inibição para o óleo essencial de *H. gardnerianum*, recolhido no local Furnas, a uma concentração igual a 1.25 mg/mL. [S] é apresentado em mM e V_o em $\Delta Abs_{415nm}/min$.

Tabela 3.4. – Parâmetros cinéticos para os diversos óleos analisados.

	Acetilcolinesterase	
	K_m (mg/mL)	$V_{max}(\Delta Abs_{415nm}/min)$
Controlo (a)	0.4663	0.05867
Achada (b)	2.605	0.06885
Fogo (b)	1.061	0.03902
Furnas (b)	1.261	0.03121
Sete-Cidades (b)	1.01	0.03886

Os valores apresentados foram calculados para a inibição da acetilcolinesterase pelos diversos óleos. Valores de K_m , V_{max} . (a) sem inibidor; (b) 1.25 mg/mL do inibidor representado.

No estudo de cinética enzimática para os diversos óleos essenciais das Folhas maduras da planta em estudo, verificamos que o valor de V_{max} obtido é menor em presença dos óleos essenciais de Fogo, Furnas e Sete-Cidades do que na sua ausência e que o valor de K_m aumenta. Este facto indica que estes óleos exercem uma inibição mista. Quanto ao óleo essencial de Achada, este aproxima-se de uma inibição competitiva, uma vez que apresenta um valor de K_m superior no caso da presença do mesmo óleo, quando comparado com o controlo, sendo que V_{max} exhibe sensivelmente o mesmo valor, quer na presença ou ausência do óleo supracitado.

Numa terceira fase, procedeu-se à caracterização dos tipos de inibição dos diversos extractos diclorometânicos de folhas maduras de *H. gardnerianum*.

Nas *Figuras. 3.14 à 3.17* apresentam-se os gráficos de Lineweaver-Burk correspondentes aos resultados destes ensaios, e os respectivos valores de K_m e V_{max} estão representados na *Tabela 3.5*.

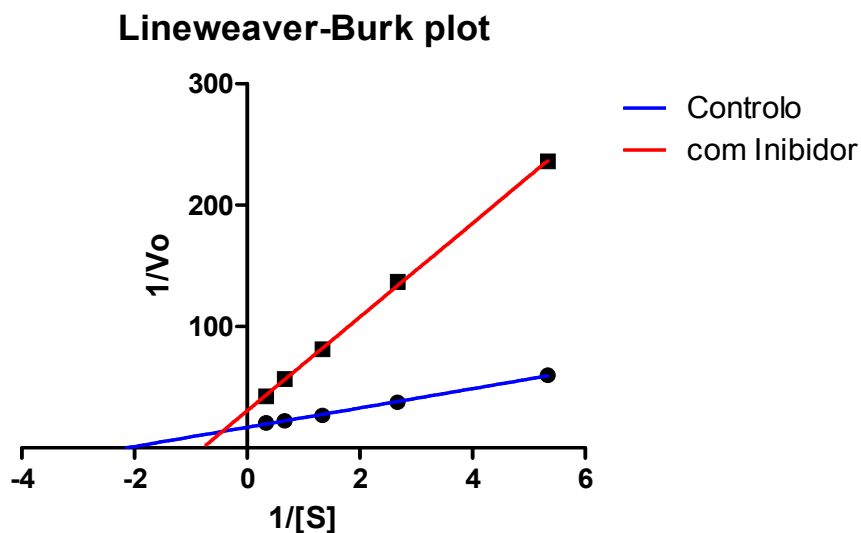


Figura. 3.14. Gráfico de Lineweaver-Burk correspondente à determinação do tipo de inibição para o extracto diclorometânico de folhas maduras de *H. gardnerianum*, recolhido no local Achada, a uma concentração igual a 0.3125 mg/mL. [S] é apresentado em mM e V_o em $\Delta\text{Abs}_{415\text{nm}}/\text{min}$.

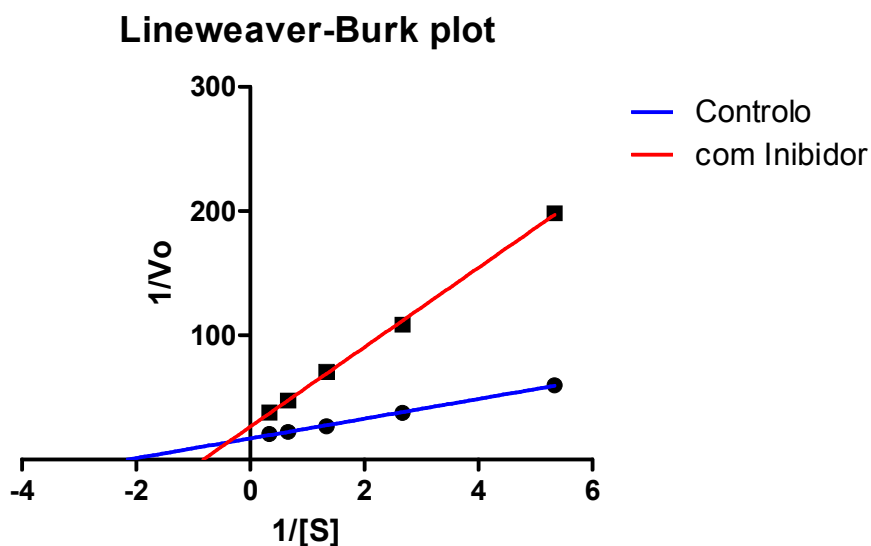


Figura. 3.15. Gráfico de Lineweaver-Burk correspondente à determinação do tipo de inibição para o extracto diclorometânico de folhas maduras de *H. gardnerianum*, recolhido no local Fogo, a uma concentração igual a 0.3125 mg/mL. [S] é apresentado em mM e V_o em $\Delta\text{Abs}_{415\text{nm}}/\text{min}$.

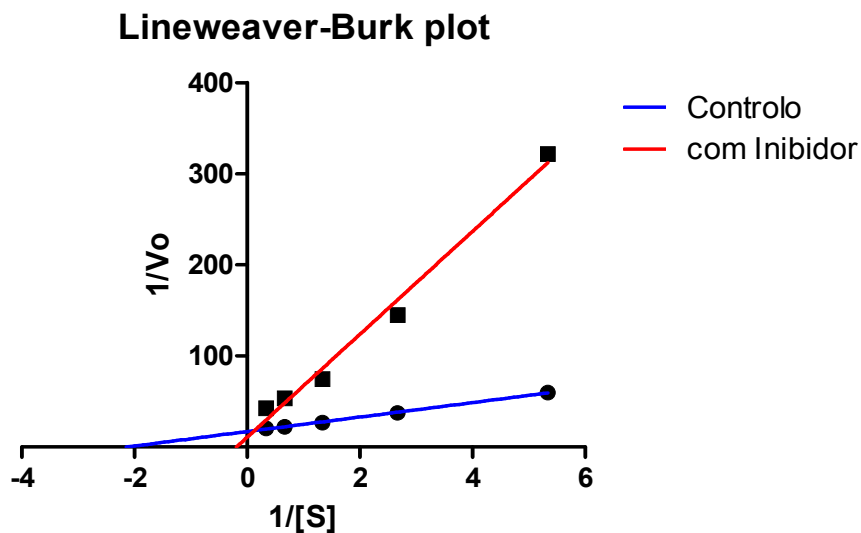


Figura. 3.16. Gráfico de Lineweaver-Burk correspondente à determinação do tipo de inibição para o extracto diclorometânico de folhas maduras de *H. gardnerianum*, recolhido no local Furnas, a uma concentração igual a 0.3125 mg/mL. [S] é apresentado em mM e V_o em $\Delta\text{Abs}_{415\text{nm}}/\text{min}$.

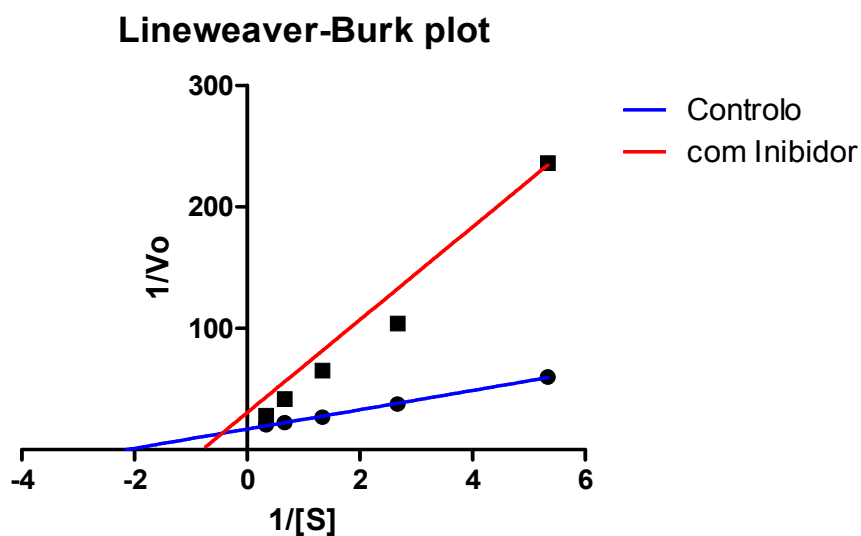


Figura. 3.17. Gráfico de Lineweaver-Burk correspondente à determinação do tipo de inibição para o extracto diclorometânico de folhas maduras de *H. gardnerianum*, recolhido no local Sete Cidades, a uma concentração igual a 0.3125 mg/mL. [S] é apresentado em mM e V_o em $\Delta\text{Abs}_{415\text{nm}}/\text{min}$.

Tabela 3.5. – Parâmetros cinéticos para os diversos extractos diclorometânicos de folhas maduras de *H. gardnerianum*.

	Acetilcolinesterase	
	<i>K_m</i> (mg/mL)	<i>V_{max}</i> ($\Delta Abs_{415nm}/min$)
Controlo (a)	0.466	0.05867
Achada (b)	1.647	0.03265
Fogo (b)	1.209	0.03778
Furnas (b)	5.24	0.09273
Sete-Cidades (b)	1.25	0.03271

Os valores apresentados foram calculados para a inibição da acetilcolinesterase pelos diversos extractos: valores de *K_m*, *V_{max}*. (a) 0 mg/mL de inibidor; (b) 0.3125 mg/mL do inibidor representado.

No estudo de cinética enzimática para os diversos extractos diclorometânicos, verificamos que o valor de *V_{max}* obtido é menor na presença do inibidor do que na sua ausência e que o valor de *K_m* aumenta em todos os casos, indicando que os mesmos exercem uma inibição mista. No entanto destaca-se o efeito do extracto de Furnas, que apesar de ter características mistas se aproxima mais duma inibição competitiva.

O facto de a maioria dos óleos e extractos analisados se terem comportado como inibidores mistos poderá dever-se a diversos factores. O principal é o facto de não se estar em presença de compostos simples e sim de misturas complexas de compostos, de modo que o efeito global detectado corresponde à soma dos efeitos de uma quantidade indeterminada de inibidores, cada um com as suas características. Por outro lado, as características do sítio activo da acetilcolinesterase, situada numa reentrância profunda (“*groove*”) fazem com que alguns inibidores se possam ligar em vários locais, de modo que o seu comportamento se pode aproximar mais de uma inibição competitiva, não competitiva ou incompetitiva. Por outro lado, justifica a razão pela qual moléculas com características estruturais bastante diferentes podem actuar como inibidores deste enzima (Nascimento, 2009).

Considerando que os inibidores competitivos são preferíveis como moléculas terapêuticas, é importante realçar os resultados tanto do extracto DCM do local de colheita Furnas, como do óleo essencial da Achada, pois são aqueles cuja inibição da AChE mais se aproxima do tipo competitivo. Os componentes que nestes óleos mais contribuam para este tipo e inibição são provavelmente mais promissores como anticolinesterásicos de acção terapêutica.

4. Discussão

Os extractos MeOH foram os que apresentaram menor actividade anticolinesterásica. Tal já era expectável, tendo em conta a bibliografia consultada, a qual verificou nas folhas duma planta do mesmo género a presença de saponinas e a ausência de taninos, antraquinonas, alcalóides e flavonóides (Martins *et al.*, 2010). Os alcalóides continuam a ser o principal alvo de pesquisa para novos protótipos de inibidores da acetilcolinesterase sendo o grupo de substâncias mais amplamente estudado. Como a maioria dos inibidores de acetilcolinesterase apresenta azoto nas suas estruturas químicas, a baixa actividade dos extractos MeOH parece estar relacionada com o seu conteúdo pobre em alcalóides (Barbosa-Filho *et al.*, 2006).

Os óleos essenciais apresentaram uma actividade anticolinesterásica promissora, como já foi referido. Em estudos anteriores, foram caracterizados óleos essenciais de folhas desta planta, sendo os maioritários o α -pineno, o β -pineno, o cariofileno, o farneseno, o β -guaieno e o α -cadinol (Medeiros *et al.*, 2003). O α -pineno e, em menor grau, o β -pineno, poderão estar na base de parte da actividade inibitória (Miyazawa & Yamafuji, 2005), bem como diversos outros componentes presentes em cada um dos óleos. No entanto, dada a enorme variabilidade de perfis fitoquímicos dos óleos essenciais dentro duma mesma espécie, é importante caracterizar cada um dos óleos utilizados neste trabalho, no sentido de associar as actividades aos compostos que lhes poderão estar na origem.

O facto de haver uma actividade elevada nos óleos essenciais é vantajoso, uma vez que os seus componentes voláteis atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, tendo em conta as suas pequenas dimensões moleculares e a sua lipofilia. A sua natureza volátil pode também permitir a sua administração como um vapor inalado, evitando o sistema digestivo com a consequente desnaturação dos constituintes moleculares activos (Savelev *et al.*, 2004). Este tipo de administração poderá de igual modo diminuir os efeitos adversos a nível do sistema digestivo, que como já foi referido constituem a maioria dos efeitos secundários que se pretende evitar.

Os extractos DCM foram os que apresentaram uma melhor actividade anticolinesterásica. Nestes extractos estão os compostos mais apolares, o que significa que são compostos de natureza distinta daqueles que estão comercializados e/ou têm

sido alvo da maioria dos estudos. Este facto é positivo, pois pretende-se encontrar novas moléculas com elevada actividade anticolinesterásica e com menos efeitos adversos que as drogas actualmente conhecidas. Estas características serão mais prováveis em estruturas marcadamente diferentes das utilizadas até agora, que são essencialmente alcalóides, como anteriormente referido.

Quanto à caracterização do tipo de inibição da Acetilcolinesterase, concluímos que o extracto DCM do local de colheita Furnas e o óleo essencial do local de colheita Achada apresentam uma inibição competitiva. Tal facto adquire maior ênfase, tendo em conta que grande parte das drogas actualmente conhecidas actua como inibidores competitivos, como foi anteriormente descrito. Tendo isso em conta, os mesmos extractos apresentam uma enorme relevância na pesquisa de novas substâncias para o efeito acima mencionado.

É importante comparar os valores de IC_{50} obtidos a partir de extractos referentes ao projecto do Dr. Rafael Nunes com os obtidos no âmbito desta dissertação. No que diz respeito aos extractos DCM, os do ano de 2008 apresentam, em média, metade da actividade anticolinesterásica dos de 2010. Por outro lado, os extractos MeOH mais recentes apresentam uma actividade anticolinesterásica em média de três vezes inferior aos extractos mais antigos. Tal pode dever-se a diferentes factores, sendo estes provavelmente: 1) o facto de os processos de extracção do Dr. Rafael terem sido ligeiramente diferentes dos dessa dissertação, pois no caso dos primeiros, o material vegetal foi liofilizado antes da extracção; 2) que desde ao momento da extracção até à análise passaram cerca de dois anos, tal poderá ter alterado a composição química dos extractos; 3) o facto de as plantas terem uma enorme plasticidade metabólica, tal facto terá de ser obrigatoriamente tido em conta, visto que os metabolitos que uma planta produz ao longo de um ano, ou em anos distintos, são condicionados por diversos factores externos à própria planta, como exposição solar, humidade e temperatura, entre outros.

5. Conclusão

Tendo em conta os objectivos descritos nesta dissertação. *Hedychium gardneranum* mostrou ser uma excelente fonte de inibidores da acetilcolinesterase. Esta actividade parece ter como princípios activos compostos de natureza apolar, evidenciados quer nos extractos diclorometânicos quer nos óleos essenciais.

Os extractos MeOH foram os que apresentaram menor actividade anticolinesterásica

Os óleos essenciais apresentaram uma actividade anticolinesterásica promissora, mais de duas vezes superior à dos extractos MeOH, sendo de qualquer modo inferior ao verificado com os extractos DCM. Embora a sua actividade anticolinesterásica seja inferior aos referidos extractos, podem ser usados em aromaterapia para a doença de Alzheimer.

No momento da entrega desta dissertação, estão a ser determinados com recurso a tecnologia GM-MS os constituintes e a percentagem de composição desses óleos, não sendo ainda possível a sua inclusão neste documento. Esta caracterização vai contribuir para descobrir qual ou quais as moléculas responsáveis por estas actividades.

Os extractos DCM foram os que apresentaram uma melhor actividade anticolinesterásica. Para além de poderem conter um novo princípio activo diferente dos já utilizados na terapêutica da doença de Alzheimer que não os tradicionais alcalóides, pelo facto de serem apolares e lipofílicos irão mais facilmente atravessar a barreira hematoencefálica, permitindo deste modo uma melhor biodisponibilidade dos compostos na zona alvo para o tratamento da doença de Alzheimer, as fendas sinápticas dos neurónios cerebrais. A caracterização dos constituintes e da sua percentagem nestes extractos é assim da maior relevância.

6. Perspectivas de trabalho futuro

O interesse continua focado, mesmo após a entrega dessa dissertação, na pesquisa e desenvolvimento de novos inibidores reversíveis de alta afinidade da enzima acetilcolinesterase capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. De tratar os sintomas e impedir ou retardar o processo neurodegenerativo associado à doença de Alzheimer (AD). Para tal, após as caracterizações, tanto dos óleos essenciais, como dos extractos DCM, serão testados os compostos maioritários para verificar se vão ao encontro das expectativas. Pretende-se recorrer a ensaios *in vitro*, *in vivo* e *in silico*.

No caso dos ensaios de *in vitro*, a perspectiva será a do isolamento dos compostos maioritários, para posteriormente serem efectuados ensaios em microplaca, com o intuito de verificar o seu potencial anticolinesterásico, à semelhança do efectuado com os compostos puros analisados nesta dissertação e referenciados como anticolinesterásicos pela literatura científica. Será ainda caracterizado o seu tipo de inibição, e eventuais efeitos sinérgicos.

Quanto aos ensaios *in vivo*, no momento da entrega dessa dissertação estão a ser desenvolvidos diversos ensaios com recurso a modelos animais, moluscos do género *Lymnaea*. O objectivo é verificar se as fracções mais activas inibem a actividade do enzima acetilcolinesterase dos animais supracitados.

No que diz respeito a *in silico*, o objectivo é desenvolver esta investigação com o auxílio do reconhecimento molecular utilizando abordagens teóricas e computacionais, como “*Docking*”, Mecânica molecular e estudos estrutura /actividade “SAR” e “*QSAR*” para desenhar os compostos e estudar as suas propriedades químicas e biológicas, tendo sempre em linha de conta a inibição da acetilcolinesterase. O interesse inclui igualmente as propriedades químicas dos compostos mais activos, que lhes permitam ter a especificidade desejada contra um conjunto de alvos moleculares e, dessa forma, solucionar problemas como a toxicidade e a resistência à terapêutica.

7. Referências Bibliográficas

- ADSERSEN A, GAUGUIN B, GUDIENSEN L, JAGER AK (2006) Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol* **104**: 418-422.
- AGUIAR EM (2003) Isolamento, Caracterização de óleos essenciais de piperáceas no Vale de Itajaí, Santa Catarina. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Santa Catarina, Brasil.
- ALCALA MM, MADERUELO A, VIVAS NM, CAMPS P, MUNOZ-TORRERO D, CLOS MV, BADIA A (2005) Effects of (+/-)-huprine Y and (+/-)-huprine Z, two new anticholinesterasic drugs, on muscarinic receptors. *Neurosci Lett* **379**: 106-109.
- ANEKONDA TS, REDDY PH (2005) Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* **50**: 361-376.
- BARBOSA-FILHO JM, MEDEIROS KCP, BATISTA LM, ATHAYDE-FILHO PF, SILVA MS, CUNHA EVLD, ALMEIDA JRGS, QUINTANS-JÚNIOR LJ (2006) Natural Products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev Bras Farmacogn* **16**: 258-285.
- BAR-ON P, MILLARD CB, HAREL M, DVIR H, ENZ A, SUSSMAN JL, SILMAN I. (2002) Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry* **41**(11): 3555-64.
- BARAK D, ORDENTLICH A, STEIN D, YU Q-S, GREIG NH SHAFFERMAN A (2005) Lessons from functional analysis of AChE covalent and noncovalent inhibitors for design of AD therapeutic agents. *Chem Biol Interact* **157-158**: 219-226.
- BARRIL X, OROZCO M, LUQYE FJ (2001) Towards improved acetylcholinesterase inhibitors: a structural and computational approach. *Mini Rev Med Chem* **1**(3): 255-266.

- BLENNOW K & WILLIAN A (1992) Clinical heterogeneity of probable Alzheimer's disease. *Journal Geriatric Psychiatry Neurology* **2**:211-228.
- BLENNOW K, DE LEON MJ, ZETTERBERG H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* **368**:387-403.
- BLOOD K (2001) *Environmental Weeds: a field guide for south-east Australia*, Weeds CRC. University of Adelaide, Austrália.
- BORGES PJA (2003) *Ambientes litorais nos Grupos Central e Oriental do Arquipélago dos Açores - Conteúdos e Dinâmica de Microescala*. Dissertação (Doutoramento) – Universidade dos Açores. Ponta Delgada.
- BRAAK H, BRAAK E (1998) Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* **53**:127–140.
- BUSATTA C (2006) Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona. Dissertação (Mestrado) – EA/URI, Campus Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.
- CAETANO NN, FONTE JR, BORSATO AV (2003) Sistemas de produção de plantas medicinais na região metropolitana de Curitiba. *Rev. Bras. Farmacogn* **13**: 74-77.
- CAMPS P & MUNOZ-TORRERO D (2002) Cholinergic drugs in pharmacotherapy of Alzheimer's disease *Mini Rev Med Chem* **2**(1): 11-25.
- CASTRO LWP (2007) *Desenvolvimento de Mentha aquatica e Mentha x piperita, rendimento e qualidade do óleo essencial em resposta a níveis de radiação e adubação nitrogenada*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná Setor de Ciências Agrárias, Brasil.
- CHAN RYY & JASMIN BJ (1999) What does acetylcholinesterase do in hematopoietic cells? *Gene Ther Mol Biol* **3**: 347-354.
- CHENG S-S, CHANG H-T, CHANG S-T, TSAI K-H CHEN W-J (2003) Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresourse Technology* **89**:99-102

- CHUNG YK, HEO HJ, KIM EK, KIM HK, HUH TL, LIM Y, KIM SK, SHIN DH (2001) Inhibitory effect of Ursolic Acid purified from *Origanum majorana* L. on acetylcholinesterase. *Mol. Cells* **11**(2): 137-143
- CONSTÂNCIA J P, BRAGA TJ, NUNES JC, MACHADO E & SILVA L (1997) *Lagoas e Lagoeiros da Ilha de São Miguel*. Edição dos Amigos dos Açores, Ponta Delgada;
- COTMAN CW & BERCHTOLD NC (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* **25**: 295–301.
- CRONK CB & FULLER JL (1995). *Plant invaders: the threat to natural ecosystems*. Chapman Hall, London. Reino Unido.
- CROWELL PL (1999) Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J Nutr* **129**(3): 775S–778S.
- DAJAS-BAILADOR F. & WONNACOTT S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. *Trends Pharmacol. Sci* **25** (6), 317-324.
- DAVIS P (1996) *Aromaterapia*. Edições Martins Fontes, São Paulo. Brasil.
- DEWICK PM (2009) *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. **3. ed.** J. Wiley, Ottawa. Canadá.
- DI GIOVANNI S, BORLOZ A, URBAIN A, MARSTON A, HOSTETTMANN K, CARRUPT PA, REIST M (2008) *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. *Eur J Pharm Sci* **33**: 109-119.
- DIAS, E. 1996. Vegetação Natural dos Açores – *Ecologia e Sintaxonomia das Florestas Naturais*. Dissertação (Doutoramento) – Universidade dos Açores. Angra do Heroísmo;
- DICKSON DW (1997) Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging* **18**: S21–S26.

- DROUET H (1866) *Catalogue de la flore des Iles Açores procede de l'itineraire d'un voyage dans cet archipel*. J.-B. Bailliere, Paris. França.
- DUETZ WA, FJALLMAN AHM, REN SY, JOURDAT C, WITHOLT B (2001) Biotransformation of D-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells. *Appl. Environ. Microbiol* **67**: 2829–2832.
- EISENREICH W, BACHER A, ARIGONI D, ROHDICH F. (2004) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**: 1401-1426
- ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES V, FEATHERSTONE RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**: 88-95.
- FACUNDO VA & RIOS KA (2005) Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurogenerative disorders: Anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. *J Brazil Chemi Soc* **16**: 1309-1312.
- FDA (2007) Alzheimer's Disease: FDA's Role In New Product Development. U.S. Food and drug administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm110879.htm>> Último acesso a 1 de Novembro de 2010.
- FRANCO JA & AFONSO MLR (2003) *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Vol. 3, Fasc. III, *Juncaceae-Orchidaceae*. Instituto Superior de Agronomia. Escolar Editora, Lisboa.
- FREIRE JM (2008) Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: Caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Brasil.

- FULLER RW, CARDELLINA II JH, JUREK J, SCHEUER PJ, ALVARADO-LINDNER B, MCGUIRE M, GRAY GN, RIOS ALVARADO-LINDNER B, MCGUIRE M, GRAY GN, RIOS STEINER J, CLARDY J, MENEZ E, SHOEMAKER RH, NEWMAN D. J., SNADER K. M., AND BOYD M. R. (1994) Isolation and structure activity features of halomonrelated antitumor monoterpenes from the red alga *Portieria hornemannii*. *J Med Chem* **37**:4407–4411.
- FUJIOKA T, KASHIWADA Y, KILKUSKIE E, COSENTINO LM, BALLAS LM, JIANG JB, JANZEN WP, CHEN IS, LEE KH (1994) Anti AIDS Agents, 11. Betulinic Acid and Platanic Acid as Anti-HIV Principles from *Sysigium clasiflorum*, and the Anti-HIV Activity of Structurally Related Triterpenoids. *J Nat Prod* **57**(2): 243-247.
- GARCIA-SANCHEZ C, ESTEVEZ-GONZALEZ A, BOLTES A, OTERMIN P, LOPEZ-GONGORA M, GIRONELL A, KULISEVSKY J (2003) Cognitive and functional decline in the stage previous to the diagnosis of Alzheimers disease. *Neurologia* **18**: 716-722.
- GARLET TMB, SANTOS OS, MEDEIROS SL, MAFRON PA, GARCIA, DC, BORCIONI E, FLEIG V. (2007) Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. *Ciência Rural* **37**(4): 956-962.
- GEARING M, MIRRA SS, HEDREEN JC, SUMI SM, HANSEN LA, HEYMAN A (1995) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part X. Neuropathology confirmation of the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* **45**: 461-6.
- GOEDERT M & SPILLANTINI MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* **314**: 777-81.
- GOMEZ-ISLA T, HOLLISTER R, WEST H, MUI S, GROWDON JH, PETERSEN RC, PARISI JE, HYMAN BT (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **41**: 17-24.
- GORELICK PB (2004) Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease. *Stroke* **35**:2620-2622.

- GOURAS GK (2001) Current theories for the molecular and cellular pathogenesis of Alzheimers disease. *Expert Rev Mol Med* **2001**: 1-11.
- GREENBLATT HM, KRYGER G, LEWIS T, SILMAN I, SUSSMAN JL (1999) Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *Febs Letters* **463**(3): 321-326.
- GRUBB PJ & TANNER EVJ (1976). The montane forests and soils of Jamaica: a reassessment. *Journal of Arnold Arboretum*. **57**: 313–368;
- HAAG JD & GOULD M N (1994) Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. *Cancer Chemother Pharmacol* **34**(6): 477-483.
- HARDY JA & HIGGINS GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184–185.
- HAREL M, SCHALK I, EHRET-SABATIER L, BOUET F, GOELDNER M, HIRTH C, AXELSEN PH, SILMAN I, SUSSMAN JL. (1993) Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(19): 9031-9035.
- HOWES MJ, HOUGHTON PJ (2003) Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol Biochem Behav* **75**: 513-527.
- IKEDA Y, MURAKAMI A, OHIGASHI H. (2008) Ursolic acid: an anti- and proinflammatory triterpenoid. *Molecular Nutrition & Food Research* **52**: 26-42.
- INGKANINAN KP, TEMKITTHAWON P, CHUENCHOM K, YUYAEM T, THONGNOI W (2003) Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J Ethnopharmacol* **89**(2-3): 261-264.
- ITO J, CHANG FR, WANG HK, PARK YK, IKEGAKI M, KILGORE N & LEE KH (2001) Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. *J Nat Prod* **64**(10): 1278-1281.

- KANG SY, YOON SY, ROH DH, JEON MJ, SEO HS, UH DK, KWON YB, KIM HW, HAN HJ, LEE HJ, LEE JH (2008) The anti-arthritic effect of ursolic acid on zymosan-induced acute inflammation and adjuvant-induced chronic arthritis models. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **60**: 1347-54.
- KASA P, RAKONCZAY Z, GULYA K (1997) The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **52**: 511-535.
- KAUR J & ZHANG MQ (2000) Molecular Modelling and QSAR of Reversible Acetylcholinesterase Inhibitors *Curr Med Chem* **7**: 273-294.
- KELLY EB (2008) *Alzheimer's disease: Genes & Disease*. Chelsea House publishers. Nova Iorque, Estados Unidos da América.
- KHALID A, ZAHEER-UL-HAQ, GHAYUR MN, FEROZ F, ATTA-UR-RAHMAN, GILANI AH, CHOUDHARY MI (2004) Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids. *J Steroid Biochem Mol Bio* **92**(5): 477-484.
- KIM J, LEE HJ, LEE KW (2010) Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **112**: 1415-1430.
- KOELLNER G, KRYGER G, MILLARD CB, SILMAN I, SUSSMAN JL, STEINER T (2000) Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* *JMB* **296**(2): 713-735.
- KONE S, GALLAND N, GRATON J, ILLIEN B, LAURENCE C, GUILLOU C, LE QUESTEL JY (2006) Structural features of neutral and protonated galanthamine: A crystallographic database and computational investigation *Chem. Phys* **328**(1-3): 307-317.
- KUMRIT I, SUKSAMRARN A, MEEPAPWAN P, SONGSRI S, NUNTAWONG N (2010) Labdane-Type Diterpenes from *Hedychium gardnerianum* with Potent Cytotoxicity against Human Small Cell Lung Cancer Cells. *Phytother. Res* **24**: 1009-1013.

- LAVABRE M (1990). *Aromaterapia*. Edição Record. Rio de Janeiro, Brasil.
- LAVOREL S (1999) Ecological diversity and resilience of Mediterranean vegetation to disturbance. *Diversity and Distributions* **5**:3-13.
- LEVY-LAHAD E, WASCO W, POORKAJ P, ROMANO DM, OSHIMA J, PETTINGELL WH, YU CE, JONDRO PD, SCHMIDT SD, WANG K, et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* **269**: 973–977.
- LIMA RK (2006) *Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-do-cartucho do milho*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Brasil.
- LITTLE DB & CROTEAU R (1999) Biochemistry of essential oil plants: a thirty year overview. In: TERANISHI R, WICK EL, HORNSTEIN I (eds), *Flavor Chemistry: Thirty years of Progress*: Kluwer Academic/ Plenum. Nova Iorque, Estados Unidos da América.
- LIU J (2005) Oleanoic acid and ursolic acid: research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology* **100**: 92-94.
- LOIZZO MR, MENICHINI F, TUNDIS R, BONESI M, CONFORTI F, NADJAFI F, STATTI GA, FREGA NG, MENICHINI F (2009) In vitro biological activity of *Salvia leriifolia* benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. *J Oleo Sci* **58**(8): 443-446.
- LOPEZ S, BASTIDA J, VILADOMAT F, CODINA C (2002) Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci* **71**: 2521-2529.
- LOZA TH (1999) Monoterpenes in essential oils-biosynthesis and properties. *Adv Exp Med Biol* **464**: 49-62.
- LUCHSINGER JA & MAYEUX R (2004) Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Current Atherosclerosis Reports* **6**: 261-266.
- MAHATO SB & KUNDU AP (1994) ¹³C NMR Spectral of Pentacyclic Triterpenoids- A Compilation and some Salient Features. *Phytochemistry* **37**: 1517-1575.

- MANACH C, WILLIAMSON G, MORAND C, SCALBERT A, REMESY C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* **81**: 230-242.
- MARTINS MB, CARAVANTE ALC, APPEZZATO-DA-GLÓRIA B, SOARES MKM, MOREIRA RRD, SANTOS LE (2010) Caracterização anatômica e fitoquímica de folhas e rizomas de *Hedychium coronarium* J. König (Zingiberaceae). *Rev. Bras. Pl. Med* **12**(2): 179-187.
- MASSOULIÉ J, PEZZEMENTI L, BON S, KREJCI E, VALLETTE FM (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Progr. Neurobiol* **41**: 31-91.
- MATTSON MP (2003) Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med* **139**: 441-444.
- MATTSON MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**: 631-639.
- MCKHANN G, DRACHMAN D, FOLSTEIN M, KATZMAN R, PRICE D, STADLAN EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under auspices of the department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* **34**:939-944.
- MEDEIROS J, ROSA JS, TAVARES J, SIMÕES N (2000) Susceptibility of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) isolated in the Azores: effect of nematode strain and host age. *J Econ Entomol* **93**(5): 1403-1408.
- MEDEIROS JR, CAMPOS LB, MENDONÇA SC, DAVIN LB, LEWIS NG (2003) Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. *Phytochemistry* **64**(2): 561-565.
- MELANIE-JAYNE RH, NICOLETTE SLP, PETER JH (2003) Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytother Res* **17**: 1-18.

- MESULAM MM & LARRY RS (2009) *Acetylcholine Neurotransmission* in CNS. In: *Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press. Oxford, Reino Unido;
- MICHAELIS ML (2003) Drugs targeting Alzheimer's disease: some things old and some things new. *J Pharmacol Exp Ther* **304**(3): 897-904.
- MILLS JJ, CHARI RS, BOYER IJ, GOULD MN, JIRTLE R (1995) Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Res* **55**: 979-983.
- MIYAZAWA M & YAMAFUJI C (2005). Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *J Agric Food Chem* **53**(5): 1765-8.
- MOLLER HJ & GRAEBER MB (1998) The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **248**: 111–122.
- MORESCHI PE; MICHELIN DC, LIMA GGF, NASCIMENTO MO, PAGANELLI MV, CHAUD MV (2005) Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **15**(4): 316-320.
- MORRIS JC & RUBIN EH (1991) Clinical diagnosis and course of Alzheimer's disease. *Psychiatr Clin North Am* **14**: 223–236.
- MORTIMER JA, EBBITT B, JUN SP, FINCH MD (1992) Predictors of cognitive and functional progression in patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology* **42**: 1689-1696.
- MORTON, B., J. C. BRITTON & A. M. F. MARTINS (1998) *Ecologia Costeira dos Açores*. Sociedade de Estudos Açorianos Afonso de Chaves. Ponta Delgada, Açores.
- MOUNT C & DOWNTON C (2006) Alzheimer disease: progress or profit? *Nat Med*. **12**:780-784.
- NAPPI JA & VASS E (2002) Interaction of iron with reactive intermediate of oxygen and nitrogen. *Int J Dev Neurosci* **24**: 134-142.

- NASCIMENTO EC (2009) *Determinação teórica de propriedades relevantes para a atividade de inibidor da acetilcolinesterase*. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília. Brasília (Brasil).
- NEEDHAM HD & FRANCHETEAU J (1974) Some characteristics of the rift valley in the Atlantic ocean near 36°48' north. *Earth & Planet. Sci. Lett* **22**: 29-43.
- NITSCH RM, SLACK BE, WURTMAN RJ, GROWDON JH (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by 2activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* **258**: 304-307.
- NITSCH RM, FARBER SA, GROWDON JH, WURTMAN RJ (1993) Release of amyloid beta-protein precursor derivatives by electrical depolarization of rat hippocampal slices. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5191–5193.
- NETO, A. I. 1997. *Studies on algal communities of São Miguel, Azores*. Dissertação (Doutoramento) – Universidade dos Açores. Ponta Delgada.
- NEWMAN DJ & CRAGG GM (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **70**: 461-477.
- ORCHARD AE (1977). *Hedychium* in New Zealand—a further name change, *New Zealand Journal of Botany* **16**: 287–289.
- ORHAN B & SENER B (2003) Acetylcholinesterase Inhibitors from Natural Resources: *Review J. Pharm. Sci.* **28**: 51-58.
- ORHAN I, SENER B, CHOUDHARY MI, KHALID A (2004) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* **91**(1): 57-60.
- ORHAN G, ORHAN I, SENER B (2006) Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease. *Lett Drug Design Discov* **3**: 268-274.
- PALHINHA R. T. (1966) *Catálogo das plantas vasculares dos Açores*. Sociedade de estudos açorianos Afonso Chaves, Lisboa.
- PATRICK GL (2005) *Medicinal Chemistry*. Oxford edition. Nova Iorque, Estados Unidos da América.

- PERRY NSL, HOUGHTON PJ, THEOBALD A, JENNER P, PERRY EK (2000) In vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**: 895-902.
- PERRY NSL, BOLLEN C, PERRY EK, BALLARD C (2003). *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. Biochem. Behavior* **75**: 651-659.
- PIER (2004). Pacific island ecosystems at risk database, <www.hear.org/pier/species/hedychium_gardnerianum.htm> (Último acesso a 1 de Novembro de 2010).
- PRADO MAM, REIS RAM, PRADO FV, MELLO MC, GOMEZ MV, MELLO FG, (2002) Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem. Int* **41**: 291-299.
- PROCTOR GR & HARVEY AL (2000) Synthesis of tacrine analogues and their structure-activity relationships. *Curr Med Chem* **7**(3): 295-302.
- RACCHI M, MAZZUCHELLI M, PORRELLO E, LANNI C, GOVONI S (2004) Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol Res* **50**: 441-451.
- RANG HP, DALE MM, RITTER JM, MOORE PK (2004) Dependência e abuso de fármacos. In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K. (Ed.). Farmacologia. Elsevier, São Paulo, Brasil.
- RAVES ML, HAREL M, PANG YP, SILMAN I, KOZIKOWSKI AP, SUSSMAN JL (1997). Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat Struct Biol* **4**(1): 57-63.
- RITCHIE K & LOVESTONE S (2002) The dementias. *Lancet* **360**:1759-1766.
- ROBERTS DV (1977) *Enzyme Kinetics*. University Press of Cambridge. Cambridge, Reino Unido.

- ROMAN S, VIVAS NM, BADIA A, CLOS MV (2002) Interaction of a new potent anticholinesterasic compound (+/-)huprine X with muscarinic receptors in rat brain. *Neurosci Lett* **325**: 103-106.
- ROMANELLI MF, MORRIS JC, ASHKIN K, COBEN LA (1990) Advanced Alzheimer's disease is a risk factor for late-onset seizures. *Arch Neurol* **47**: 847–850.
- SALVIETTI N, CATTANEO E, GOVONI S, RACCHI M (1996) Changes in beta amyloid precursor protein secretion associated with the proliferative status of CNS derived progenitor cells. *Neurosci Lett* **212**: 199-203.
- SAVELEV S, OKELLO E, PERRY NSL, WILKINS RM, PERRY EK (2003) Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **75**: 661–668.
- SAVELEV SU, OKELLO EJ, PERRY EK (2004) Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytother Res* **18**(4): 315-24.
- SAYEG N (2009) AlzheimerMed - Informação e Solidariedade. Disponível em <<http://www.alzheimermed.com.br>> Último acesso 1 de Novembro de 2010.
- SCHÄFER H (2003) *Chorology and Diversity of the Azorean Flora Part II Commented Checklist of the Azorean Flora Distribution Atlas of Flores, Faial and Santa Maria*. Dissertação (Doutoramento) - Universidade de Regensburg, Alemanha.
- SCHÄFER H (2005) *Flora of the Azores, a field guide*. **2. ed.** Margraf Publishers (Ed). Weikersheim, Alemanha.
- SHERRINGTON R, ROGAEV EI, LIANG Y, ROGAEVA EA, LEVESQUE G, IKEDA M, CHI H, LIN C, LI G, HOLMAN K (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**:754–760;
- SEIGLER DS (1998) *Plant Secondary Metabolism*. Ed. Kluwer Academic Publisher. Londres, Reino Unido.

- SELKOE DJ (2002) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**: 487–498.
- SELKOE DJ (2004a) Alzheimer disease: Mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* **140**: 627-638.
- SELKOE DJ (2004b) Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol.* **6**: 1054-1061.
- SEUBERT M & HOCHSTETTER C (1843) Uebersicht der Flora der azorischen Inseln. *Archiv für Naturgeschichte.* **9**: 1-24.
- SEUBERT M (1844) *Flora azorica quam ex collectionibus schedisque Hochstetteri patris et filii elaboravit.* Macus. Bonnae, Alemanha.
- SIANI AC, SAMPAIO ALF, SOUSA MG, HENRIQUES MGMO, RAMOS MFS (2000) Óleos essenciais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* **16**: 38-43.
- SILVA P (1998) *Farmacologia.* Guanabara & Koogan. Rio de Janeiro, Brasil.
- SILVA DD & GILBERTO CHIERICE GO (2003) Quantificação do Linalol no Óleo Essencial da *Aniba duckei* Korstermans Utilizando uma Nova Coluna Capilar de POLYH4-MD em Cromatografia Gasosa. *Quim. Nova* **26**(4): 461-465.
- SILVA L & SMITH CW (2004) A characterization of the non-indigenous flora of the Azores Archipelago. *Biological Invasions* **6**: 193-204;
- SILVA L, OJEDA EL, RODRÍGUEZ JLL (2008) *Invasive terrestrial flora and fauna of Macaronesia. Top 100 in Azores, Madeira and Canaries.* ARENA, Ponta Delgada.
- SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR (2001) *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* **3.ed.** Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, Brasil.

- SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR (2003) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. **5. ed.** Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, Brasil.
- SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR (2007) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. **6. ed.** Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, Brasil.
- SOREQ H. & SEIDMAN S (2001). Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* **2**(4): 294-302.
- SOTOKAWA T, NODA TPIS, HIRAMA M (2000) A three-step synthesis of halomon. *Angew Chem* **39**: 3430–3432.
- SOUZA VC (2005) *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira*. Instituto Plantarum. Nova Odessa, Brasil.
- SUGIMOTO H, YAMANISHI Y, IIMURA Y, KAWAKAMI Y (2000) Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Med Chem* **7**(3): 303-39.
- SUGIMOTO H, OGURA H, ARAI Y, IIMURA Y, YAMANISHI Y (2002). Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *Jpn J Pharmacol* **89**(1): 7-20.
- TAIZ L & ZEIGER E (1991) *Surface protection and secondary defense compounds*. In: *Plant Physiology*. Redwood City: Benjamin Cummings. Estados Unidos da América.
- TAYLOR P & BROWN JH (1999) *Acetylcholine*. In: SIEGEL, G.J., AGRANOF, B.W., ALBERS, R.W. & MOLINOFF, P.B. (Ed.). *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, Estados Unidos da América.

- TOMLINSON BE, BLESED G, ROTH M (1970) Observations on the brains of demented old people. *J Neurol Sci* **77**: 205-242.
- TRELEASE W (1897) Botanical observations on the Azores. *Rep. Mo. Bot. Gdn* **8**: 77-220.
- UYLINGS HB & DE BRABANDER JM (2002) Neuronal changes in normal human aging and Alzheimer's disease. *Brain Cogn* **49**: 268–276.
- VASCONCELOS MAL, FERREIRA DS, SILVA MLA, VENEZIANI RCS, CUNHA WR (2003) Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Bollettino Chimico Farmaceutico* **142**: 333-335.
- VASCONCELOS MAL, ROYO VA, FERREIRA DS, CROTTI AEM, SILVA MLA, CARVALHO JCT, BASTOS JK, CUNHA WR (2006) Evaluation of the *In vivo* analgesic and anti- inflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Zeitschrift für Naturforschung* **61**: 477-482.
- VIEGAS JÚNIOR C (2003) Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova* **26**: 390-400.
- WALSH DM & SELKOE DJ (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*. **44**:181-193.
- WATSON HC (1844) Notes on the Botany of the Azores. *The London Journal of Botany* **3**: 582-617.
- WATSON HC (1847) Supplementary notes on the botany of the Azores. *The London Journal of Botany* **6**: 380-397.
- WATSON, H. C. 1870. Botany of the Azores. 113-288. in: GODMAN, F. du Cane (Ed). *Natural History of the Azores or Western Islands*. John van Voorst. Londres, Reino Unido.
- WATTENBERG LW, SPARNINS VL, BARANI G (1989) Inhibition of N nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res* **49**: 2689–2692.

- WILLIAMSON MH (1996) *Biological invasions*. Chapman & Hall. Londres, Reino Unido.
- WOLF BA, WERTKIN AM, JOLLY YC, YASUDA RP, WOLFE BB, KONRAD RJ (1995) Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid beta-protein production in human neuronal NT2N cells. *J Biol Chem* **270**: 4916-4922.
- WOOD, TH WHITTEN, WM, WILLIAMS, NH (2000) Phylogeny of *Hedychium* and related genera (*Zingiberaceae*) based on ITS sequence data', *Edinburgh Journal of Botany* **57**(2): 261-270.
- WORWOOD, S. (1995) *Aromaterapia: Um guia de A a Z para o uso terapêutico dos óleos essenciais*. São Paulo: Best Seller. São Paulo, Brasil.
- XAVIER CP, LIMA CF, PRETO A, SERUCA R, FERNANDES-FERREIRA M, PEREIRA-WILSON C (2009) Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer Letters* **281**: 162-170.
- ZAMBONI S (1983) Óleos Essenciais. *Revista Brasileira de Química* **575**(11): 106-109.
- ZÁRATE R, JABER-VAZDEKIS NE, CEQUIER-SÁNCHEZ E, GUTIERREZ-NICOLÁS F, RAVELOAG (2008) Biotechnology for the production of plant natural products. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). Bioactive natural products. *Elsevier Science*. **34**: 309-390.
- ZILLER SR (2000). *A Estepe Gramíneo-Lenhosa no segundo planalto do Paraná: diagnóstico ambiental com enfoque à contaminação biológica*. Dissertação (Doutoramento) - Universidade Federal do Paraná. Brasil.

Anexo I

Reagentes e equipamentos

Tampões

Os seguintes tampões foram utilizados. Tampão A: Fosfato de sódio 0.1 M pH 8.0; Tampão B: Fosfato de sódio 0.1 M pH 7.0, contendo 1 g/L de BSA.

Enzima

Acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (Sigma-Aldrich®) foi dissolvido em tampão B para preparar uma solução stock de 1000 U/mL e, posteriormente diluída no mesmo tampão obter uma solução de enzima 0,25 U/mL, sendo esta empregue nos ensaios em microplaca. Sendo que ambos foram conservadas a -80°C até ao momento dos ensaios.

Substrato

Iodeto de acetiltiocolina (AChI) (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado nos ensaios em microplaca com concentração de 75 mM em Tampão A. O mesmo substrato foi conservado a -80°C até ao momento dos ensaios.

Reagentes colorimétricos

Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®) ou reagente de Ellman foi utilizado utilizado nos ensaios em microplaca com concentração de 3 mM em Tampão A. O mesmo substrato foi conservado a -80°C até ao momento dos ensaios.

Microplacas

Microplacas de 96 poços BD Falcon™, sem químicos de tratamento de cultura de tecidos ou de superfície, de fundo plano e sem tampa.

Leitor de microplacas

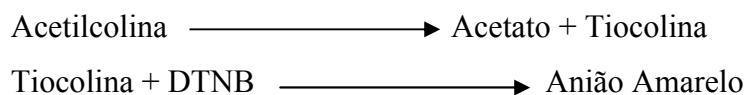
O Leitor de placas da Bio-Rad Laboratories, modelo 680, sendo um leitor de oito canais, com um fotômetro de extensão de caminho vertical que mede a absorvância do conteúdo dos poços de placas de 96 poços de microtitulação.

ANEXO II

DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA ACETIL COLINESTERASE (ACHE) EM MICROPLACA DE 96 POÇOS

1. Introdução

A actividade enzimática da AChE será avaliada pelo método colorimétrico modificado por Arruda *et al* (2010) de Ellman (1961). Baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina. A tiocolina reage com o chamado Reagente de Ellman (DTNB ou Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico), formando uma mistura de dissulfetos e um anião amarelo (nitrobenzoato) com intensa absorção em 415 nm. (Esquema. 01.)



Esquema. 01. Reacções envolvidas no método empregue para monitorizar a actividade da AChE.

2. Determinação do IC₅₀ (*The half maximal inhibitory concentration*)

Soluções

- ✚ **Tampão fosfato de sódio** 100 mM pH 8.0;
- ✚ **Mistura de substratos: DTNB** 3 mM (Tampão fosfato 100 mM pH 8.0 + *Iodeto de acetiltiocolina* (AChI) 75 mM [preparar juntando partes iguais de cada uma das soluções];
- ✚ **AChE** 0.25U/mL (em tampão fosfato 100 mM pH 7.0 com BSA 0.1%);
- ✚ **Solução-mãe de extracto.**

Metodologia

1. Colocar a solução-mãe de extracto (*a uma concentração de 5 mg/mL*), a cada poço da coluna 2 da microplaca, **240 µL** da mesma solução
2. Aos poços das colunas 1 e 3-12, juntar **120 µL** de Tampão fosfato;
3. Regular a pipeta multicanal para **120 µL** e fazer a diluição seriada da coluna 2 até à **coluna 11**, deitando fora os últimos **120 µL**; (*Figura. 01.*);
4. Adicionar **110 µL** de Tampão fosfato, a todos os poços da microplaca;
5. Adicionar **10 µL** de AChE 0.25 U/mL a todos os poços desde a coluna **2 à 12**;
6. Colocar no leitor de microplacas e programar para ler a 415 nm;
7. Deixar incubar **5 minutos** em presença da solução-mãe de extracto.
8. Adicionar **10 µL da mistura de substratos** a cada micropoço – **tempo zero a partir da 1ª adição** – agitar e ler.
9. Voltar a ler a Abs 415 nm nos tempos:
 - a. 0 segundos;
 - b. 150 segundos;
 - c. 300 segundos;
 - d. 450 segundos.

10. Cálculos:

As percentagens de inibição são calculadas comparando-se as taxas das reacções de cada concentração das amostras com a taxa de reacção do controlo através da fórmula (com o auxílio da folha de cálculo: DetIC50.xls):

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \left(\frac{\text{Taxa da reacção da amostra}}{\text{Taxa de reacção do controlo}} \times 100 \right)$$

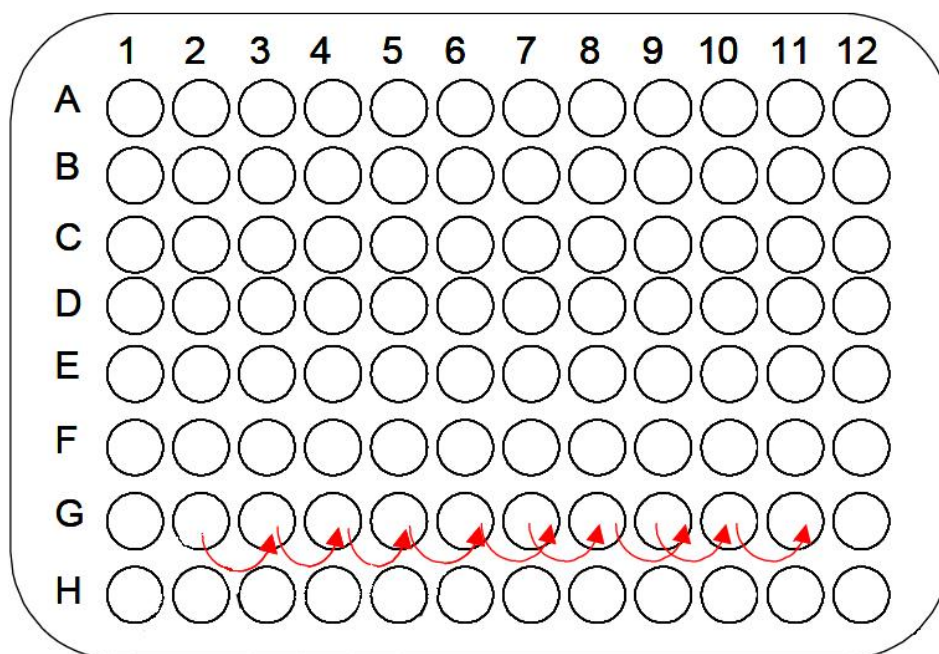


Figura. 01. O esquema de diluição está indicado na figura para a fila G, embora obviamente ocorra também para as outras. Pipetam-se 120µl da coluna 2 e transferem-se para a coluna 3. Homogeniza-se muito bem nessa coluna, misturando com o meio que já estava nesses poços, aspirando repetidas vezes com a pipeta. Finalmente, transfere-se para a coluna seguinte. O processo repete-se do mesmo modo, até que se chega à penúltima coluna da série (na figura, a coluna 11). Nesta coluna, mistura-se bem, como anteriormente, e elimina-se 120 µl.

3. Determinação da cinética enzimática

Soluções

- ✚ Tampão fosfato 100 mM pH 8.0
- ✚ DTNB 3 mM (Tampão fosfato 100 mM pH 8.0)
- ✚ Iodeto de acetiltiocolina (AChI) 75 mM
- ✚ AChE 0.25U/mL (em tampão fosfato 100 mM pH 7.0 com BSA 0.1%)
- ✚ **Solução-mãe** de extracto, 1.25 mg/mL

Método

1. Preparar, num eppendorf, a solução de substrato **S1**: juntar 240 μL de **Iodeto de acetiltiocolina (AChI)** 75 mM a tampão fosfato 100 mM pH 8.0, para um **volume final de 3 mL**;
2. Juntar, a cada poço da coluna 2 da microplaca, **240 μL de solução S1**;
3. Aos poços das colunas 1 e 3-12, juntar **120 μL** de Tampão fosfato 100 mM pH 8.0 (pode ser com a pipeta multicanal);
4. Regular a pipeta multicanal para **120 μL** e fazer a diluição seriada da coluna 2 até à **coluna 12**, deitando fora os últimos **120 μL** ;
5. Adicionar **110 μL** de Solução-mãe de extracto a todos os pontos da microplaca, da coluna 2 à coluna 12;
6. Adicionar **10 μL** de DTNB 3 mM a todos os poços desde a coluna **2 à 12**;
7. **Iniciar a reacção pela adição de 10 μL** de AChE 0.25 U/mL a cada micropoço das colunas 2 a 12 - **tempo zero a partir da 1ª adição** – agitar e ler Abs 415 nm.
11. Voltar a ler a Abs 415 nm no tempo **7.5 min** Voltar a ler a Abs 415 nm nos tempos:
 - a. 150 segundos;
 - b. 300 segundos;
 - c. 450 segundos.

12. Cálculos:

Para cada micropoço, calcular $\Delta\text{Abs } 415 \text{ nm /tempo}$. (com o auxílio da folha de cálculo: LBurkCalc.xls).

Referências:

- ✚ Ellman, G.L., Lourtney, D.K., Andres, V., Gmelin, G., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95.
- ✚ Arruda, M., Nunes, R., Medeiros, J.P., Viana, H., Barreto M.C. 2010. Inhibition of acetylcholinestraxe by *Hedychium gardnerianum* from S. Miguel (Azores). *Planta Med.* 76: 1211.

