

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Análise Química e Biológica de *Hippeastrum psittacinum* e Estudos do alcalóide montanina sobre a memória

**LETÍCIA BALVEDI PAGLIOSA**

Porto Alegre, 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Análise Química e Biológica de *Hippeastrum psittacinum* e Estudos do alcalóide montanina sobre a memória

Tese apresentada por **Letícia Balvedi Pagliosa**  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi

Porto Alegre, 2009

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 06.08.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato  
Universidade de São Paulo

Dr. Jociane de Carvalho Myskiw  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Carmen Regla Vargas  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Miriam Anders Apel  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

P138a Pagliosa, Leticia Balvedi  
Análise química e biológica de hippeastrum psittacinum e estudos do alcalóide montanina sobre a memória / Leticia Balvedi Pagliosa – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xix, 119 p. : il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Hippeastrum psittacinum. 2. Amaryllidaceae. 3. Alcalóides. 4. Montanina. 5. Farmacologia. I. Zuanazzi, José Ângelo Silveira. II. Título.

CDU: 547.94:582.572.4

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido sob orientação do Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi, no laboratório de Fitoquímica e Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os experimentos comportamentais foram realizados com a colaboração do Prof. Dr. Martín Pablo Cammarota, no Centro de Memória da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.



**AGRADECIMENTOS**





Primeiramente agradeço pela fé que carrego. Esta me dá forças para acreditar todos os dias que tudo posso alcançar se, de fato, quero alcançar.

Ao meu orientador pela confiança depositada em meu trabalho e pelos conhecimentos adquiridos.

Ao Prof. Dr. Martín Cammarota por disponibilizar o ambiente necessário para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jaume Bastida pela parceria na realização das análises espectroscópicas.

A todos meus colegas do Laboratório de Farmacognosia que de alguma forma contribuíram para realização do meu trabalho. Em especial agradeço à Raquel e Jean pela amizade e discussões sobre Amaryllidaceae, e a Marina, pela ajuda no início do meu trabalho e pela grande amiga que se tornou.

Aos colegas do Centro de Memória da PUCRS, por me acolher no laboratório. Em especial, meu agradecimento à Siomara, pela ajuda essencial em meu trabalho e, principalmente, por sua amizade sincera, e à Clarice, que desde a minha chegada ao laboratório demonstrou ser uma grande amiga.

Às minhas colegas do Hospital Santa Casa de Porto Alegre, pela amizade e compreensão nos momentos que não pude ajudar como deveria devido aos compromissos assumidos com o Doutorado.

Aos meus pais pelo amor, apoio, confiança, carinho, compreensão. À eles agradeço a pessoa que sou e as atitudes que tenho diante da vida.

Às minhas irmãs amadas, Luciana e Daniele, pelos conselhos verdadeiros, amizade e apoio incondicional.

À Olga, pela dedicação exclusiva à suas três meninas: eu e minhas duas irmãs.

Ao Marco, pelo amor verdadeiro, apoio, compreensão e por despertar em mim a alegria, combustível para minha vida.



## RESUMO

Análise Química e Biológica de *Hippeastrum psittacinum* e Estudos do alcalóide montanina sobre a memória

Este trabalho foi realizado com o objetivo de isolar e identificar os alcalóides majoritários de *Hippeastrum psittacinum* (Amaryllidaceae), avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos e compostos isolados desta espécie, bem como investigar a atividade anticolinesterásica destes compostos e do alcalóide montanina. O efeito da montanina sob a consolidação da memória também foi avaliado. **Método:** *Análise química:* Bulbos e raízes de *H. psittacinum* foram coletados, macerados em etanol e submetidos a extração ácido-base para obtenção das frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e *n*-BuOH. Os alcalóides isolados foram identificados com a utilização de métodos cromatográficos e espectroscópicos. **Análise Biológica:** Os extratos e produtos isolados foram avaliados *in vitro* quanto ao seu perfil antioxidante pelo método de DPPH e quanto ao seu perfil anticolinesterásico utilizando o ensaio bioautográfico por cromatografia em camada delgada (CCD). Os compostos pretazetina e hipeastrina, isolados de *H. psittacinum*, e montanina, isolada de *H. vittatum* por SILVA (2005) foram submetidos a avaliação da atividade anticolinesterásica pelo método de ELLMAN e colaboradores (1961). Através de três paradigmas comportamentais, Reconhecimento de Objeto, Esquiva Inibitória e Labirinto Aquático de Morris avaliou-se o papel da montanina sob a consolidação da memória por injeção intrahipocampal em ratos. **Resultados e Conclusões:** Nas análises dos extratos de *H. psittacinum* por CCD, cromatografia líquida a vácuo (CLAE) e espectrometria de massas acoplado à cromatógrafo gasoso (CG/EM), o perfil cromatográfico de bulbos e raízes apresentou-se semelhança. As frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de ambas as partes dos vegetal apresentaram-se ricas em alcalóides enquanto que as frações *n*-BuOH indicaram a presença de apenas um composto alcaloídico. Os alcalóides: sal de pretazetina (HP1), pretazetina (HP2) e hipeastrina (HP3) foram isolados e identificados da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de bulbos. Não foi possível a identificação do composto HP4, isolado da mesma fração, devido ao seu baixo rendimento. As avaliações das atividades *in vitro* demonstraram que os extratos e produtos isolados de *H. psittacinum* apresentaram potencial antioxidante e anticolinesterásico nas concentrações testadas. Através da avaliação do potencial anticolinesterásico pelo método de ELLMAN e colaboradores (1961), dentre os

compostos isolados apenas a montanina apresentou atividade sob a enzima nas concentrações testadas. Os ensaios comportamentais demonstraram que a montanina, na dose de 3 µg/µl, apresentou melhora na consolidação da memória quando testados 24 h após o treino nos três paradigmas avaliados, sendo que apenas na tarefa de Esquiva Inibitória a montanina apresentou papel na perdurabilidade da memória até 7 dias após o treino.

Palavras chaves: Amaryllidaceae, *Hippeastrum psittacinum*, alcalóide, montanina

## ABSTRACT

Análise Química e Biológica de *Hippeastrum psittacinum* e Estudos do alcalóide montanina sobre a memória

The present work was carried out to isolate and identify the major alkaloids from *H. psittacinum* (Amaryllidaceae), to evaluate the *in vitro* antioxidant activity of extracts and isolated compounds from this species, and to investigate the anticholinesterasic activity of these compounds and the alkaloid montanine. The effect of montanine in the memory consolidation was also evaluated. **Method:** *Chemical analysis:* Bulbs and roots of *H. psittacinum* were collected, macerated in ethanol and submitted to an acid-base extraction in order to obtain the fractions CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and *n*-BuOH. The isolated alkaloids were identified by chromatographic and spectroscopic methods. *Biological Analysis:* The extracts and isolated products were evaluated *in vitro* regarding their antioxidant profile by the DPPH method and their anticholinesterasic profile by bioautographic thin-layer chromatography (TLC) assay. The compounds pretazettine and hippeastrine, isolated from *H. psittacinum*, and montanine, isolated from *H. vittatum* by SILVA (2005) were submitted to the assessment of anticholinesterasic activity by the method of Ellman and colleagues (1961). The role of montanine in memory consolidation of rats was evaluated by intrahippocampal injection through three behavioral paradigms: Object Recognition, Inhibitory Avoidance and the Morris Water Maze. **Results and Conclusions:** In the analysis of the extracts from *H. psittacinum* by TLC, vacuum liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry coupled to gas chromatography (GC/MS), bulbs and roots revealed similar chromatographic profiles. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fractions of both parts of the plant were rich in alkaloids while the *n*-BuOH fractions indicated the presence of one alkaloid only. The alkaloids: salt of pretazettine (HP1), pretazettine (HP2) and hippeastrine (HP3) were isolated and identified from the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of bulbs. Due to its low income, the identification of the compound HP4 isolated from the same fraction was not possible. The evaluations of the *in vitro* activities showed that the extracts and isolated products from *H. psittacinum* presented antioxidant and anticholinesterasic potentials at the tested concentrations. Through the evaluation of the anticholinesterasic potential by the method of Ellman and colleagues (1961) among the isolated compounds, only montanine presented activity under the enzyme at the tested concentrations. The behavioral tests showed that at the dose 3 µl/µl,

montanine presented improvement in memory consolidation 24h after training at the three evaluated paradigms. Furthermore, at the Inhibitory avoidance task montanine presented a role in the memory endurance, which lasted up to 7 days after training.

Keywords: Amaryllidaceae, *H. psittacinum*, alkaloid, montanine

## LISTA DE FIGURAS

Figura I.1	Biossíntese do alcalóide licorina e derivados.....	15
Figura I.2	Biossíntese do alcalóide Haemantadina e seus derivados .....	15
Figura I.3	Biossíntese do alcalóide galantamina .....	16
Figura I.4	Núcleos fundamentais de alcalóides de Amaryllidaceae .....	16
Figura I.5	Estrutura dos alcalóides <b>(A)</b> augustamina, <b>(N)</b> noraugustamina e <b>(D)</b> 4a,N dedihidronoraugustamina .....	17
Figura I.6	Estrutura do alcalóide amarbelisina .....	18
Figura I.7	Estrutura dos alcalóides <b>(C)</b> capnoidina e <b>(B)</b> bulpocapnina .....	19
Figura I.8	Esquema de obtenção dos extratos .....	23
Figura I.9	Esquema de obtenção dos produtos isolados.....	25
Figura I.10	Perfil cromatográfico das frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -B, emulsão-A, emulsão-B	28
Figura I.11	Perfil cromatográfico do extrato <i>n</i> -BuOH .....	29
Figura I.12	Estrutura química sugerida para o alcalóide HP1: Sal de Pretazetina.....	31
Figura I.13	Estrutura química sugerida para o alcalóide HP2: Pretazetina.....	31
Figura I.14	Estrutura química sugerida para o alcalóide HP3: Hipeastrina.....	32
Figura II.1	Estrutura do alcalóide galantamina .....	36
Figura II.2	Reação da enzima acetilcolinesterase com o acetato de 1-naftila e a formação subsequente da coloração púrpura na cromatografia em camada delgada .....	45
Figura II.3	Atividade inibidora da acetilcolinesterase dos alcalóides isolados pelo método de ELLMAN e colaboradores (1961) .....	55
Figura II.4	Curva dose-resposta do alcalóide montanina no Paradigma do Reconhecimento de Objetos.....	56
Figura II.5	Efeito da montanina sob a consolidação de memória de longa duração no paradigma de Reconhecimento de Objeto.....	57
Figura II.6	Efeito da montanina sob a consolidação de memória de longa duração no paradigma de Esquiva Inibitória.....	58
Figura II.7	Curva de aprendizado no Labirinto Aquático de Morris.....	59
Figura II.8	Efeito montanina sob consolidação de memória de longa duração 24h pós treino no paradigma Labirinto Aquático de Morris.....	60
Figura II.9	Efeito montanina sob consolidação de memória de longa duração 7 dias pós treino no paradigma Labirinto Aquático de Morris.....	61





## LISTA DE TABELAS

Tabela I.1	Sistema gradiente CLAE para os extratos e alcalóides isolados ....	20
Tabela I.2	Peso de planta fresca e rendimento dos extratos .....	27
Tabela I.3	Rendimento das frações alcaloídicas extraídas de bulbos .....	27
Tabela I.4	Rendimento das frações alcaloídicas extraídas de raízes .....	27
Tabela I.5	Perfil alcaloídico da espécie <i>H. psittacinum</i> .....	29
Tabela I.6	Rendimento dos compostos isolados .....	30
Tabela II.1	Usos populares de membros representativos de Amaryllidaceae ....	35
Tabela II.2	Medidas utilizadas no teste de reconhecimento de objetos.....	50
Tabela II.3	Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase dos extratos e dos produtos isolados de <i>H. psittacinum</i> .....	54
Tabela II.4	Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e dos produtos isolados de <i>H. psittacinum</i> .....	56
Tabela II.5	Efeito da montanina sob a atividade locomotora, exploratória e no estado de ansiedade. ....	62



## LISTA DE ABREVIATURAS

DA	Doença de Alzheimer
AChE	Acetilcolinesterase
CCD	Materiais para Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
CG/EM	Espectrometria de Massas acoplado à Cromatógrafo Gasoso
CC	Cromatografia em Coluna
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
AT	Alcalóides Totais
SNC	Sistema Nervoso Central
ACh	Acetilcolina
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
MAPKs	Mitogen-activated protein kinase
DTNB	(5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic Acid
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
i.p	Intraperitoneal
LAM	Labirinto Aquático de Morris
Veh	Veículo
Mon	Montanina



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	5
<b>CAPÍTULO I – ANÁLISE QUÍMICA</b>	9
I.1 Aspectos botânicos.....	11
I.1.1 Família Amaryllidaceae .....	11
I.1.2 Gênero <i>Hippeastrum</i> .....	11
I.1.3 <i>Hippeastrum psittacinum</i> .....	12
I.2 Aspectos Químicos .....	13
I.2.1 Alcalóides derivados da fenilalanina.....	13
I.3 Alcalóides em Amaryllidaceae .....	13
I.3.1 Biossíntese dos alcalóides em Amaryllidaceae .....	13
I.3.2 Classificação química dos alcalóides em Amaryllidaceae .....	16
I.3.3 Estudos químicos em Amaryllidaceae.....	17
I.4 Estudos Químicos em <i>Hippeastrum psittacinum</i> .....	19
I.5 Materiais e Métodos.....	19
I.5.1 Materiais.....	19
I.5.2 Equipamentos e condições de análise.....	20
I.5.3 Coleta do vegetal .....	22
I.5.4 Extração dos alcalóides .....	22
I.5.5 Análise cromatográfica das frações por CCD e CLAE .....	23
I.5.6 Análise espectroscópica das frações por CG/EM.....	24
I.5.7 Isolamento de alcalóides .....	24
I.5.7.1 Isolamento do composto HP1 .....	24
I.5.7.2 Isolamento do composto HP2, HP3 e HP4.....	25
I.6 Resultados .....	26
I.6.1 Massa e teor de umidade do material vegetal .....	26
I.6.2 Rendimento das frações alcaloídicas .....	27
I.6.3 Análise cromatográfica das frações por CCD e CLAE .....	28
I.6.4 Análise espectroscópica das frações por CG/EM.....	29

I.6.5 Identificação dos produtos isolados .....	30
I.6.5.1 Composto HP1 .....	30
I.6.5.2 Composto HP2 .....	31
I.6.5.3 Composto HP3.....	32
I.6.5.4 Composto HP4.....	32
<b>CAPÍTULO II – AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS</b> .....	<b>33</b>
II.1 Usos Populares de Amaryllidaceae .....	35
II.2 Estudos Farmacológicos em Amaryllidaceae .....	35
II.3 Doença de Alzheimer.....	36
II.3.1 Doença de Alzheimer e sistema colinérgico.....	39
II.3.2 Estratégias antioxidantes.....	40
II.3.3 Estratégias antioxidantes não esteroidais.....	41
II.3.4 Estratégias glutamatérgicas.....	41
II.4 Memória.....	41
II.4.1 Hipocampo relacionadas e memória.....	42
II.4.2 Atividade dos alcalóides isoquinolínicos no sistema nervoso central e no comportamento.....	43
II.4.3 Estudos farmacológicos com o alcalóide montanina.....	44
II.5 Avaliações biológicas com <i>Hippeastrum psittacinum</i> .....	44
II.6 Materiais e Métodos.....	44
II.6.1 Detecção de inibidores da acetilcolinesterase.....	44
II.6.1.1 Método descrito por MARSTON e colaboradores (2002).....	44
II.6.1.2 Método descrito por ELLMAN e colaboradores (1961).....	46
II.6.2 Determinação da atividade antioxidante.....	46
II.6.3 Efeito do alcalóide montanina na consolidação da memória.....	47
II.6.3.1 Animais de experimentação.....	47
II.6.3.2 Procedimento Cirúrgico.....	47
II.6.3.3 Manipulação dos animais.....	48
II.6.3.4 Fármaco e substância teste.....	48
II.6.3.5 Modelos experimentais utilizados para avaliação de aquisição de memória.....	48
II.6.3.6 Paradigma do reconhecimento de objetos.....	48
II.6.3.7 Esquiva inibitória.....	50
II.6.3.8 Labirinto aquático de Morris (LAM).....	51

II.6.3.9 Avaliações complementares.....	51
II.6.3.10 Controle histológico da localização das cânulas-guia e do local de infusão.....	52
II.6.3.11 Descarte dos resíduos biológicos.....	53
II.6.3.12 Análise estatística.....	53
II.7 Resultados.....	53
II.7.1 Detecção de inibidores da Acetilcolinesterase.....	53
II.7.1.1 Método descrito por MARSTON e colaboradores (2002).....	54
II.7.1.2 Método descrito por ELLMAN e colaboradores (1961).....	55
II.7.2 Determinação da atividade antioxidante.....	55
II.7.3 Efeito do alcalóide montanina na consolidação da memória.....	56
II.7.3.1 Paradigma do reconhecimento de objeto.....	56
II.7.3.2 Tarefa de esquiva inibitória.....	58
II.7.3.3 Labirinto Aquático de Morris.....	59
II.7.4 Tarefas complementares.....	61
II.7.4.1 Teste do campo aberto Elabirinto de cruz elevado.....	61
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	63
<b>CONCLUSÕES</b> .....	69
<b>PERPECTIVAS</b> .....	73
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75
<b>ANEXOS</b> .....	89
<b>ARTIGO SUBMETIDO</b> .....	
<b>PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO</b> .....	
<b>PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	





**INTRODUÇÃO GERAL**



Muitos alcalóides são considerados compostos importantes em função de determinados efeitos farmacológicos, respostas fisiológicas e mecanismos bioquímicos (CORDELL *et al.*, 2001), sendo considerados alvos valiosos para a obtenção de fármacos (KODAMA *et al.*, 2004).

As investigações relacionadas à família Amaryllidaceae apontam para as suas estruturas alcaloídicas o seu maior interesse. Esta família, por sua vez, compreende um grupo de plantas pertencentes à classe das Monocotiledôneas, que, além de estarem presentes de forma significativa na ornamentação, são exploradas na medicina tradicional (ELGORASHI *et al.*, 2003).

A elucidação de novas estruturas, estratégias e metodologias de desenvolvimento para a síntese de alcalóides de Amaryllidaceae tem sido motivada por diversas e importantes propriedades farmacológicas (MAGNUS *et al.*, 1999). Dentre estas propriedades incluem-se atividades antitumoral, antiviral, imunoestimulatória, analgésica, atividade antimalárica e inibidora da acetilcolinesterase (MANPADI e KORNIENKO, 2005). Alguns alcalóides de Amaryllidaceae já possuem suas atividades biológicas relatadas, como a pancratistatina e licorina, por sua atividade antitumoral (PETTIT *et al.*, 1986), amabilina e crinamina, por suas atividades antimalárica e citotóxica e a galantamina (CAMPBELL *et al.*, 1998), por sua atividade anticolinesterásica.

Após a descoberta de que o alcalóide galantamina é um potente inibidor da acetilcolinesterase e, conseqüentemente, muito importante para o tratamento sintomático da Doença de Alzheimer (DA) (LIU *et al.*, 2004), o isolamento e caracterização de alcalóides da Amaryllidaceae tem aumentado exponencialmente com o interesse em descobrir melhores inibidores de fontes naturais.

A DA é uma desordem progressiva, neurodegenerativa que é caracterizada pela deteriorização cognitiva, sintomas neuropsiquiátricos e mudanças de comportamento. Esta doença antige mundialmente 24,3 milhões de pessoas com uma faixa etária de 65 anos, sendo que a cada ano surgem em média 4,3 milhões de novos casos. A expectativa para o ano de 2020 é que a incidência de pessoas com DA dobre para 42,3 milhões (MICROMIDEX, 2009).

Atualmente não existem fármacos que previnam esta doença. Os fármacos hoje existentes no mercado são indicados para estágios leves, moderados e avançados, e agem, de um modo geral, como inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Dentre os mais utilizados atualmente para esta demência pode-se citar: galantamina, donepezil, rivastigmina e memantina.

Diante da diversidade e particularidades relacionadas aos alcalóides de Amaryllidaceae, é de grande interesse nesse trabalho avaliar o perfil químico e as propriedades biológicas desta família botânica.

**OBJETIVOS**



## OBJETIVO GERAL

Tendo em vista a grande variedade de alcalóides isolados de plantas da família Amaryllidaceae, apresentando relevantes propriedades farmacológicas, pretende-se com este estudo investigar a presença de alcalóides na espécie *Hippeastrum psittacinum* através do isolamento e identificação dos alcalóides majoritários. Além disso, é objetivo deste trabalho avaliar a atividade antioxidante e anticolinesterásica dos extratos e produtos e isolados de *Hippeastrum psittacinum* bem como a atividade do alcalóide montanina, isolado de *Hippeastrum vittatum* (2005), sobre a memória em ratos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção dos extratos vegetais e frações enriquecidas de *H. psittacinum*;
- Isolamento dos constituintes majoritários de *H. psittacinum*;
- Caracterização e identificação dos produtos isolados através do emprego de técnicas cromatográficas e espectroscópicas;
- Avaliar *in vitro* a atividade antioxidante dos extratos e compostos isolados de *H. psittacinum*;
- Analisar a atividade anticolinesterásica dos extratos e compostos isolados de *H. psittacinum* e do alcalóide montanina através dos modelos *in vitro*;
- Avaliar *in vivo* o efeito do alcalóide montanina sobre a consolidação de memória em três paradigmas comportamentais: Reconhecimento de Objeto, Esquiva Inibitória e Labirinto Aquático de Morris.

Com intuito de ordenar os assuntos abordados, o trabalho foi dividido em dois capítulos:

O capítulo I apresenta revisão bibliográfica referente à análise química de *H. psittacinum*, bem como metodologia empregada e os resultados obtidos.

O capítulo II contempla a revisão bibliográfica quanto a avaliação biológica de *H. psittacinum*, a metodologia empregada para ensaios *in vitro* de seus extratos e produtos isolados, bem como a metodologia para os ensaios *in vivo* realizados com o alcalóide montanina, seguidas pelos resultados obtidos.

Ao final estão apresentadas a discussão, conclusões e perspectivas futuras deste trabalho.



**CAPÍTULO I**  
**ANÁLISE QUÍMICA**



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### I.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

#### I.1.1 Família Amaryllidaceae

As plantas pertencentes à família Amaryllidaceae são predominantemente herbáceas, com folhas radicais, nascendo de um bulbo ou rizoma, de disposição alterna e densa. Suas folhas caracterizam-se por serem lanceoladas largas, de base invaginante, podendo às vezes apresentar margem espinhosa. Inflorescência básica em umbela ou em panícula. Em geral, são dotadas de flores vistosas, bissexuais e radiais, em alguns casos, ligeiramente zigomorfas com perianto trímero em duas séries de três pétalas cada. Possuem seis estames, opostos às tépalas, podendo em certos casos apresentar expansão petalóide na base dos filetes que é então concrecida. O ovário é ínfero, tricarpelar, trilocular em geral com muitos ou poucos óvulos. Apresenta fruto capsular loculicida ou baciforme. As sementes são aladas ou com endosperma cartilaginoso. Sua floração ocorre no inverno (JOLY, 1966).

Em relação à sua classificação botânica, a família Amaryllidaceae, juntamente com as famílias Orchidaceae, Hypoxidaceae, Iridaceae, Alliaceae, Hyacinthaceae, Laxmanniaceae, Agavaceae, Asparagaceae, Convallariaceae, Asphodelaceae e Hemerocallidaceae, inclui-se na ordem Aspergillus e classe das Monocotiledôneas (JUDD *et al.*, 2002).

A família apresenta aproximadamente 72 gêneros e 1.450 espécies que estão distribuídas por quase todo o mundo, sendo amplamente encontradas nas regiões tropical e temperada, e de forma muito diversificada na África do Sul, América do Sul ao longo dos Andes e na região Mediterrânea (JUDD *et al.*, 2002).

#### I.1.2 Gênero *Hippeastrum*

*Hippeastrum* é um gênero americano pertencente à tribo Hippeastreae, compreendendo 55-75 espécies, estendendo-se desde o México e as Antilhas até a Argentina. Consiste em ervas volumosas com folhas planas e escapos com duas brácteas livres. Na maioria das vezes são flores púrpuras ou vermelhas, afuniladas e ligeiramente zigomorfas. As tépalas são livres ou presas na base, e os filamentos

são desigualmente longos e mais ou menos curvados para o alto. Muitas espécies deste gênero são utilizadas na ornamentação como *H. advenum*, *H. bifidum*, *H. elegans*, *H. puniceum*, *H. reginae* e *H. striatum* (DAHLGREN *et al.*, 1985).

### **I.1.3 *Hippeastrum psittacinum***

*Hippeastrum psittacinum* Herb. possui características bastante similares ao *Hippeastrum puniceum* e *H. morelianum*, os quais são denominados popularmente como açucena, açucena-laranja, amarílis ou, ainda, cebola-berrante. Estas espécies de Amaryllidaceae são plantas herbáceas bulbosas, decíduas durante o inverno, com 30-40 cm de altura, nativas de quase todo Brasil. Possuem folhas rosuladas basais, lanceoladas e canaliculadas de cerca de 40 cm de comprimento, que desaparecem completamente no inverno. Flores grandes, vermelho-alaranjadas com a garganta branca em forma de estrela, reunidas em grupos de 2-4 na extremidade de uma haste floral oca de cerca de 30-40 cm de comprimento, surgida diretamente do bulbo, geralmente antes do aparecimento das novas folhas no final do inverno. Os bulbos são semelhantes a uma cebola, cujo tamanho varia de menos de 2 cm de diâmetro quando jovens até 10 cm quando velhos (LORENZI e MATOS, 2002).

Esta espécie foi encontrada do extremo sudeste de Minas Gerais, nordeste de São Paulo e norte do Paraná, crescendo sobre rochas de origem magmática, geralmente em meia sombra e com bastante matéria orgânica. Coletada com flores em junho e setembro (DUTILH, 1987).

Seus bulbos são empregados em várias regiões do país para fins medicinais no tratamento de algumas moléstias, embora a segurança e eficácia de seu uso não tenham sido, ainda, comprovadas cientificamente. São atribuídas ao suco dos bulbos propriedades emética, catártica, purgativa, excitante, anti-asmática e peitoral (LORENZI e MATOS, 2002).

## **I.2 ASPECTOS QUÍMICOS**

### **I.2.1 Alcalóides derivados da fenilalanina e tirosina**

Esses compostos resultam da condensação de um derivado de feniletilamina com um derivado de fenilacetaldeído. Estas duas partes, por sua vez, derivam da fenilalanina ou da tirosina (ROBBERS *et al.*, 1996). Os alcalóides provenientes dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e/ou tirosina possuem, na sua maioria, um núcleo tetraidroisoquinoleínico. Um desses aminoácidos é descarboxilado resultando em uma arilalquilamina da qual origina-se a parte essencial do núcleo alcaloídico, sendo que a outra parte provém de um outro aminoácido que poderá ser aromático ou não (BRUNETON, 2001). Os alcalóides isoquinolínicos são classificados conforme a natureza dos aminoácidos envolvidos na biossíntese e a forma como reagem. Para a formação dos alcalóides de Amaryllidaceae ocorre uma união do tipo  $C_6C_2-N-C_1C_6$ , sendo que um dos aminoácidos aromáticos perde um átomo de carbono para que a mesma ocorra (BRUNETON, 2001).

## **I.3 ALCALÓIDES DE AMARYLLIDACEAE**

As plantas da família Amaryllidaceae são conhecidas por várias razões, além de apresentarem significativo valor em ornamentação, produzem alcalóides bastante característicos. Alguns destes alcalóides têm exibido grande interesse farmacológico e/ou propriedades biológicas (LOPEZ *et al.*, 2002).

As investigações dos alcalóides de Amaryllidaceae iniciaram-se com o isolamento da licorina em *Narcissus pseudonarcissus*, em 1877. A partir de então, centenas de diferentes estruturas de alcalóides têm sido isoladas de diversas partes do vegetal em diferentes períodos de vegetação (GHOSAL *et al.*, 1985).

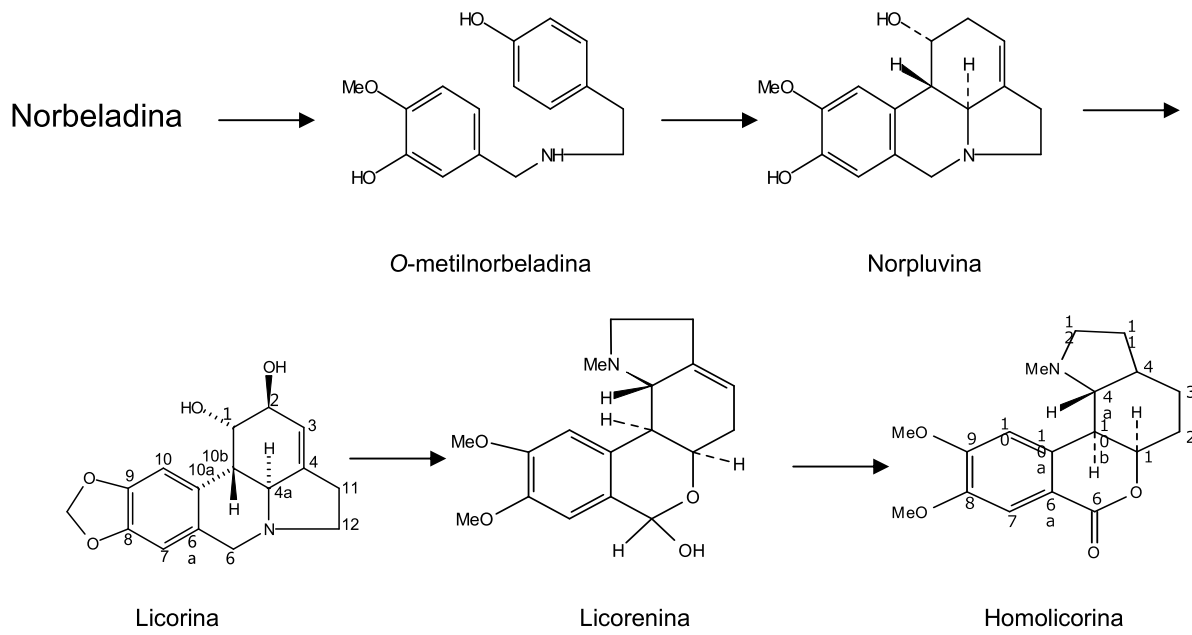
### **I.3.1 Biossíntese dos alcalóides em Amaryllidaceae**

Os alcalóides de Amaryllidaceae representam um grupo muito particular de alcalóides isoquinolínicos (BOTHIA *et al.*, 2005).

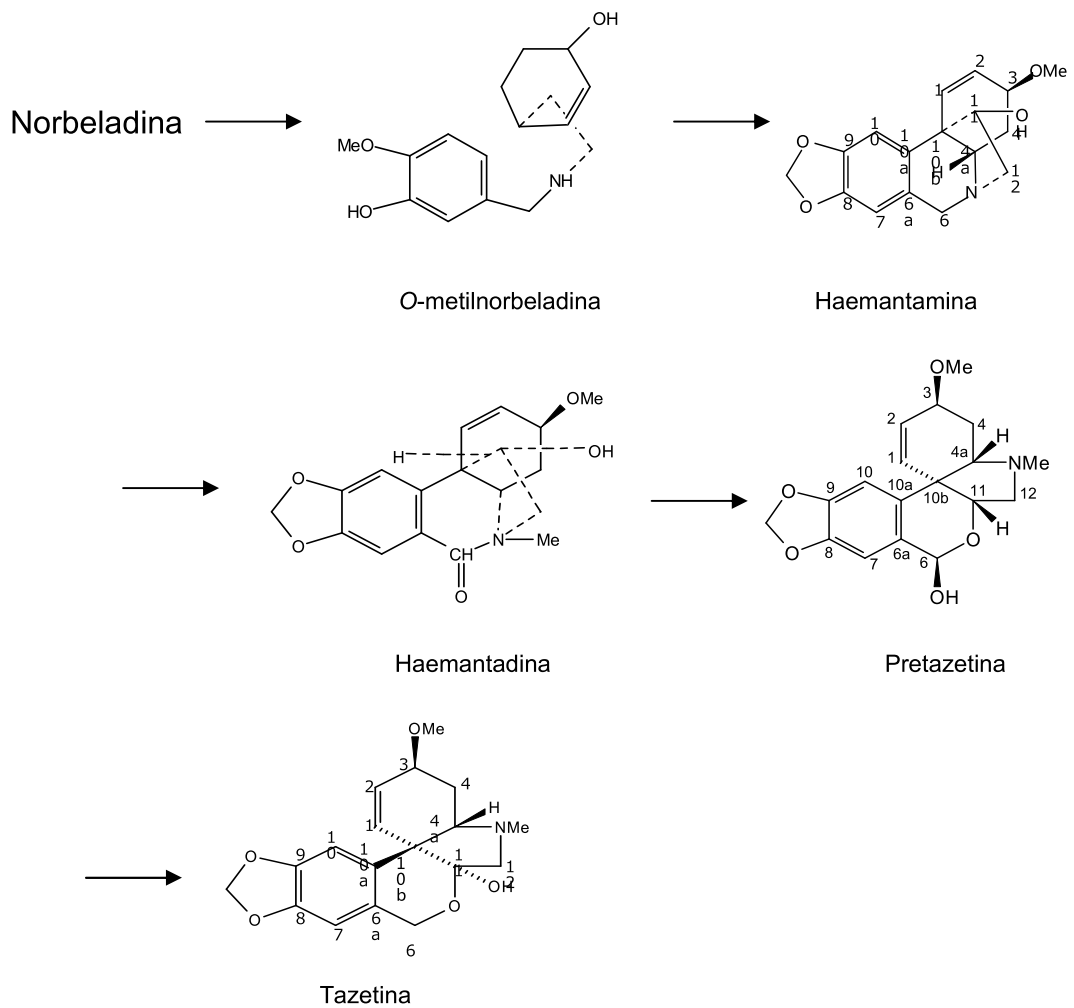
A origem biossintética dos alcalóides de Amaryllidaceae deve-se a um acoplamento oxidativo intramolecular que ocorre através de um precursor do tipo  $C_6C_2-N-C_1C_6$ . A unidade  $C_6C_2$  provém de uma molécula de tirosina, enquanto que a unidade  $C_6C_1$  origina-se de uma molécula de fenilalanina. Esta última é convertida em ácido cinâmico que posteriormente sofre hidroxilação em ácido caféico. Após a eliminação de dois carbonos, o 3,4 - diidroxibenzaldeído formado condensa-se com a tiramina resultando na formação da norbeladina e posteriormente em metilnorbeladina, na qual ocorrerão acoplamentos oxidativos (BRUNETON, 2001).

Os acoplamentos oxidativos poderão se dar por diferentes tipos de ligações fenólicas intramoleculares (KODAMA *et al.*, 2004). Estas diferenças de acoplamentos justificam a existência de diversas estruturas já conhecidas: tipo-galantamina, tipo-licorina, tipo-haemantadina e crinina (BRUNETON, 2001). A formação das estruturas tipo-licorina, tipo-haemantadina e tipo-galantamina estão detalhadas a seguir conforme GEISSMAN (1969).

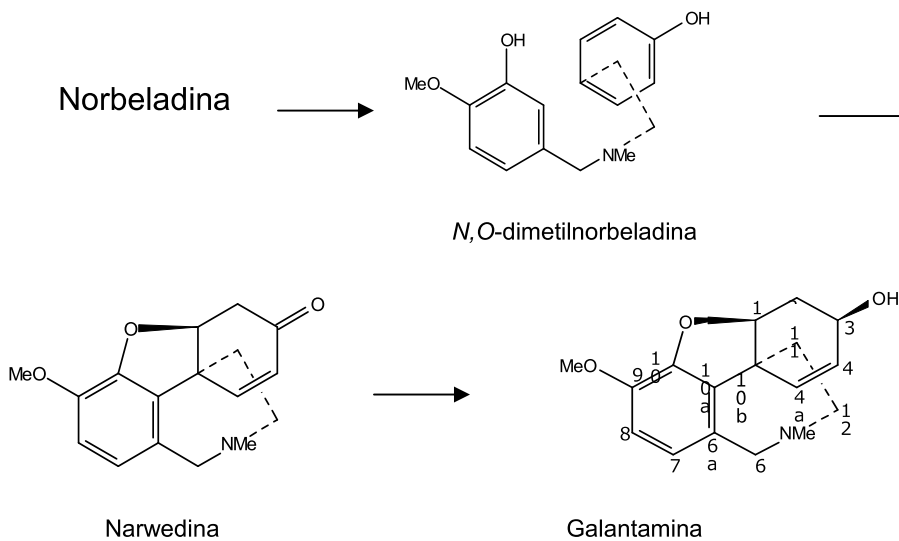
A **Figura I.1** detalha a biossíntese da licorina, bem como a da licorenina. Esta última se dá através da *O*-metilação da norpluvina seguida de hidroxilação, metilação e cisão do anel. A homolicorina é derivada por oxidação da licorenina. Na biossíntese da haemantadina (**Figura I.2**), o que difere da licorina é o modo de acoplamento (de *para-para* passa à *orto-para*). Por um processo análogo ao da conversão de norpluvina em licorenina, a haemantamina pode ser convertida, através do alcalóide haemantidina, em pretazetina. A pretazetina, por sua vez, pode sofrer um rearranjo, originando-se a tazetina, considerado um artefato (GEISSMAN, 1969). Por fim, a biossíntese do alcalóide galantamina se dá pelo acoplamento *para-orto*, em que a norbeladina sofre metilação convertendo-se em *N,O*-dimetilnorbeladina (GEISSMAN, 1969), conforme apresentado na **Figura I.3**.



**Figura I.1 - Biossíntese do alcalóide licorina e derivados (GEISSMAN, 1969)**



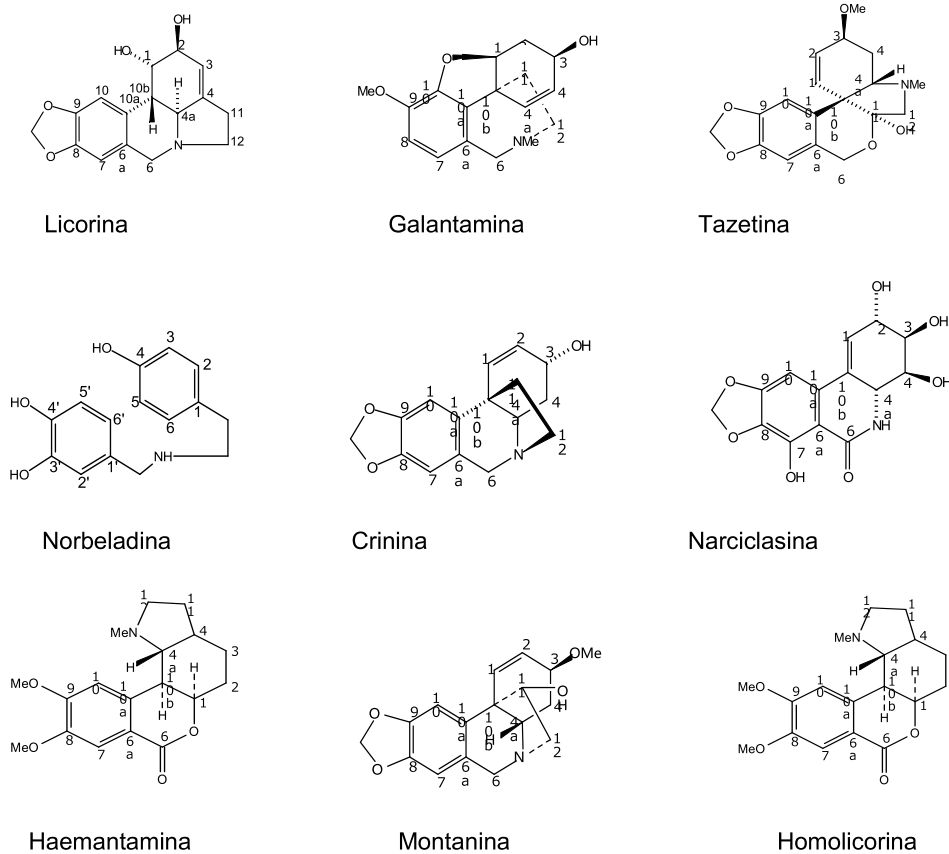
**Figura I.2 - Biossíntese do alcalóide haemantadina e seus derivados (GEISSMAN, 1969)**



**Figura I.3** - Biossíntese do alcalóide galantamina (GEISSMAN, 1969)

### I.3.2 Classificação química dos alcalóides de Amaryllidaceae

A classificação mais recente apresentada para os alcalóides de Amaryllidaceae é citada por BASTIDA *et al.* (2005). (Figura I.4)

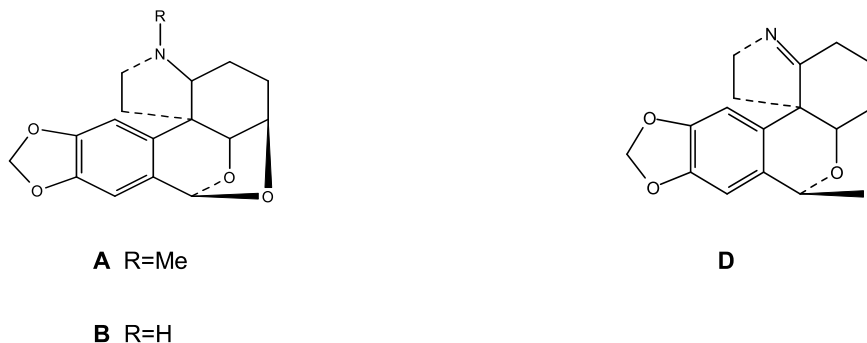


**Figura I.4** – Núcleos fundamentais de alcalóides de Amaryllidaceae (BASTIDA *et al.*, 2005)



### 1.3.3 Estudos químicos em Amaryllidaceae

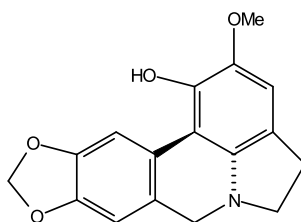
Levando em consideração os núcleos fundamentais mostrados no **item 1.3.2**, estes podem ser melhor compreendidos ao analisarmos um representante significativo da família Amaryllidaceae por exibir as principais peculiaridades químicas da mesma, o gênero *Crinum*. As estruturas dos alcalóides deste gênero derivam de três núcleos fundamentais: *N*-(3,4-dioxibenzil)-4-oxifenetilamina (norbeladina), pirrolo [de]fenentridina (licorina) e 5,10b-etanofenantridina (vitatina/crinina). Estes núcleos sofrem modificações originando os diferentes alcalóides do gênero *Crinum*, destacando-se a augustamina, primeiro alcalóide proposto a ser formado através do intermediário 5,10b-etanofenantridina devido a ausência de um substituinte oxigenado na posição C-3 no anel hidroaromático (GHOSAL *et al.*, 1985). Investigações realizadas por MACHOCHO e colaboradores (2004) reportaram o isolamento na espécie *Crinum kirkii* de duas novas estruturas consideradas alcalóides do tipo augustamina, denominadas noraugustamina e 4a,*N*-dedihidronoraugustamina (**Figura 1.5**).



**Figura 1.5** – Estrutura dos alcalóides **(A)** augustamina, **(B)** noraugustamina e **(D)** 4a,*N*-dedihidronoraugustamina

São reportadas também investigações referentes às possíveis variações de alcalóides nas plantas de Amaryllidaceae, dependendo do estágio em que estas se encontram, e frente a certas condições de isolamento destes alcalóides. GHOSAL e colaboradores (1984), por exemplo, relataram a ausência de um composto comumente encontrado na época de floração nas raízes de algumas espécies de *Crinum*, a licorina-1-*O*-*D*-glicosídeo. A ausência deste glicoalcalóide pode ser atribuída ao fato de que este é sintetizado em quantidades detectáveis por um período limitado de tempo ou devido aos extratos muito polares (*n*-butanol) não

terem sido analisados. Em um estudo realizado por EVIDENTE e colaboradores (2004), nos bulbos de *Amaryllis belladonna* (também conhecido por *Hippeastrum equestre*), foi relatado o isolamento de um novo alcalóide, derivado do sistema pirrolo[de]fenantridina (alcalóide tipo-licorina) denominado amarbelisina (**Figura I.6**). A partir da amarbelisina e os outros alcalóides já conhecidos, estabeleceu-se uma comparação entre o estágio de florescência e pré-florescência, concluindo-se que a presença alcaloidal nos bulbos desta espécie, independente de suas formas estruturais, apresentaram-se em maior número no estágio de pré-florescência. No entanto, ao analisá-los isoladamente, observaram-se variações entre os diferentes alcalóides quanto suas concentrações em relação ao estágio de desenvolvimento da planta, em que a hipeastrina e a (+)-11-hidroxitatina estão presentes em maior na fase de pré-florescência, enquanto que a amarbelisina e vitatina estão presente em maior quantidade durante a florescência.

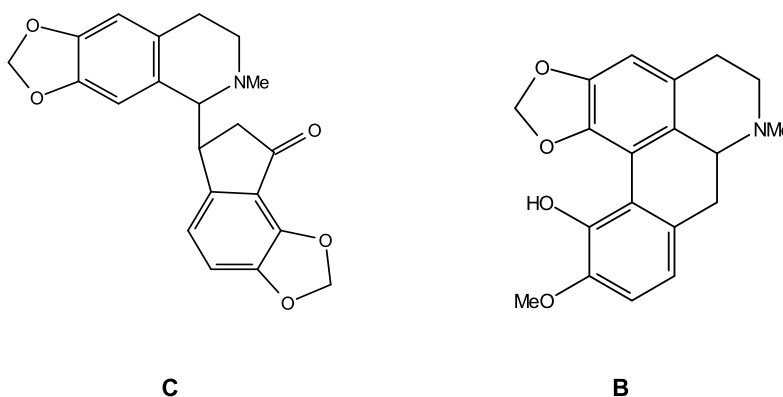


**Figura I.6** - Estrutura do alcalóide amarbelisina

MULHOLLAND e colaboradores (2002) isolaram pela primeira vez o alcalóide crinamina da espécie *Dioscorea dregeana* pertencente à família Dioscoreaceae, contrariando pesquisadores que consideravam que a classe de alcalóides isoquinolínicos baseados em um núcleo aromático de 15 átomos de carbonos era exclusivo de Amaryllidaceae. Em uma pesquisa realizada por KAIA e colaboradores. (2004), a capnoidina e bulbocapnina (**Figura I.7**) foram isoladas da espécie *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae). Esta descoberta foi relevante uma vez que estes esqueletos não estão incluídos naqueles classificados como alcalóides de Amaryllidaceae. A (-)-capnoidina havia sido reportada apenas na família Fumaraceae (MACLEAN, 1985), enquanto que a (+)-bulbocapnina em Papaveraceae, Fumaraceae e Lauraceae (KAMETANI e HONDA, 1985). Neste estudo de KAIA e colaboradores (2004), também foi reportado pela primeira vez, no gênero *Galanthus* (Amaryllidaceae), a ocorrência das furano lignanas, (+)-

epipinoresinol e (+)-pinoresinol. Os autores desta investigação sugeriram a reconsideração da definição de alcalóides de Amaryllidaceae, bem como do perfil alcaloidal da família Amaryllidaceae.

Outras investigações quanto ao isolamento de alcalóides de Amaryllidaceae, pode-se citar três compostos isolados dos bulbos frescos de *Nerine filifolia*, *N*-demetilbeladina, 6 $\alpha$ -metoxibufanidrina e filifolina, em adição a cinco alcalóides já conhecidos, beladina, 11-*O*-acetilambelina, undilatina, ambelina e 6 $\alpha$ -metoxibufanidrina (NAIR *et al.*, 2005).



**Figura I.7-** Estrutura dos alcalóides **(C)** capnoidina e **(B)** bulpocapnina

#### **I.4 ESTUDOS QUÍMICOS EM *HIPPEASTRUM PSITTACINUM***

Até o momento não há relatos na literatura especializada quanto ao perfil químico desta espécie. A pesquisa foi realizada nas bases de dados: SCIENCE DIRECT (1950/2009) e WEB OF SCIENCE/CAPES (1945/2009).

#### **I.5 MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **I.5.1 Materiais**

###### *Solventes*

Os solventes empregados no desenvolvimento deste trabalho foram: acetato de etila (Quimex, Vetec), acetona (quimex), ácido clorídrico (Vetec), ácido trifluoroacético, clorofórmio (Vetec), diclorometano (Vetec), éter de petróleo (Nuclear),

metanol (Nuclear, Quimex), *n*-butanol (Vetec), hidróxido de amônio (Nuclear) e etanol 96%.

#### *Reagentes específicos*

Foram utilizados reativos específicos para a detecção de alcalóides, sendo estes, Mayer (tetraiodomercurato), Bertrand (ácido sílico-túngstico) e Dragendorff (tetraiodobismutato de potássio).

#### *Materiais para Cromatografia em Camada Delgada (CCD)*

Nas CCD analíticas utilizaram-se cromatofolhas de gel de sílica (Merck) ou cromatoplasmas de vidro (10x10 cm e 10x20 cm) com espessura de gel de sílica (Merck) de 0,25 mm, enquanto que para CCD preparativa utilizou-se cromatoplasmas de vidro (20x20 cm) com espessura de gel de sílica de 0,5 mm.

### **I.5.2 Equipamentos e condições de análise**

#### *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

Para a obtenção dos cromatogramas utilizou-se equipamento Alliance 2695 (Waters) gerenciado por software Empower e detector de UV-diódos em série (Waters 996), acumulado entre 200 e 400 nm, cada 4,8 nm e 1 espectro/segundo.

A coluna cromatográfica empregada foi Symmetry de fase reversa C<sub>18</sub> (3,5 µm), de dimensões 4,6 x 75 mm, e a pré-coluna, Lichrospher (10 x 4 mm d.i.) empacotada com fase reversa C<sub>18</sub> Bondapak (Waters) (10 µm). Das soluções preparadas para injeção, foram injetados apenas 10 µL de amostra, em fluxo 0,7 ml/min no sistema detalhado na **Tabela I.1**.

**Tabela I.1** - Sistema CLAE gradiente para os extratos e alcalóides isolados

<b>TEMPO (Min)</b>	<b>FASE A (%)</b>	<b>FASE B (%)</b>
0	100	0
20	80	20
21	0	100
25	0	100
25.5	100	0
32	100	0

Fase A - Água:Acetonitrila:TFA (95:05:0,1)      Fase B - Acetonitrila: TFA (100:0,1)

### *Espectroscopia no Ultravioleta*

O equipamento empregado consiste em um espectrofotômetro Hewlett Packard UV-VIS modelo HP 8454-A com varredura de diodos em série entre 200-400 nm. As amostras foram dissolvidas em metanol em uma cubeta de 1 cm.

### *Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

Os espectros foram desenvolvidos a temperatura ambiente, em solventes deuterados. O aparelho utilizado para RMN de  $^1\text{H}$  foi VARIAN *Inova* 500 MHz e, para RMN de  $^{13}\text{C}$ , VARIAN *Inova* 125 MHz.

### *Balança de Infravermelho*

Para determinação de teor de água nas amostras vegetais, foi utilizada balança de infravermelho (Bel Mark Top Ray Page), com temperatura programada para 105°C. A análise foi realizada em triplicata, com as diferentes partes do vegetal (bulbos e raízes), grosseiramente trituradas.

### *Espectrometria de Massas acoplado à Cromatógrafo Gasoso*

As análises dos produtos isolados foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu QP5000 acoplado a detector de massas (EM), por impacto eletrônico (70 eV). Utilizou-se coluna Durabond-DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ), e metodologia adaptada de KREH e colaboradores (1995), onde a temperatura do injetor foi de 250 °C, split 1:20 e programa de temperatura de 150 a 300 °C, com incremento de 6 °C por minuto. Utilizou-se Hélio como gás de arraste com fluxo de 1 ml/min. Temperatura do detector foi de 250 °C.

As análises das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e BuOH de bulbos e raízes foram realizadas por CG/EM na Universidade de Barcelona, pela equipe do Prof. Jaume Bastida, onde os resultados foram comparados com a biblioteca digital de alcalóides de Amaryllidaceae. O equipamento utilizado foi Hewlett-Packard 6890+MSD 5975 em coluna HP5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). A temperatura do injetor foi de 280 °C, split 1:20, pressão de 10,3 psi e fluxo de 1 ml/min (gás Hélio). A escala de temperatura da coluna utilizada foi de 100 a 180 °C, com aumento de 15 °C e manutenção de 180 °C durante 1 min, e de 180 °C a 300 °C, com aumento de 5

°C/min e manutenção de 300 °C durante 1 min (BERKOV *et al.* 2007). Temperatura do detector foi de 250 °C.

#### *Liofilizador*

O liofilizador da marca Savant MicroModulyo Boc Edwards foi utilizado para a secagem dos extratos aquoso.

#### *Evaporador Speed-vac*

Para secagem de amostras com diferentes solventes não clorados foi empregado o speed-vac (Boc Edwards) com temperatura média de 43°C.

### **I.5.3 Coleta do material vegetal**

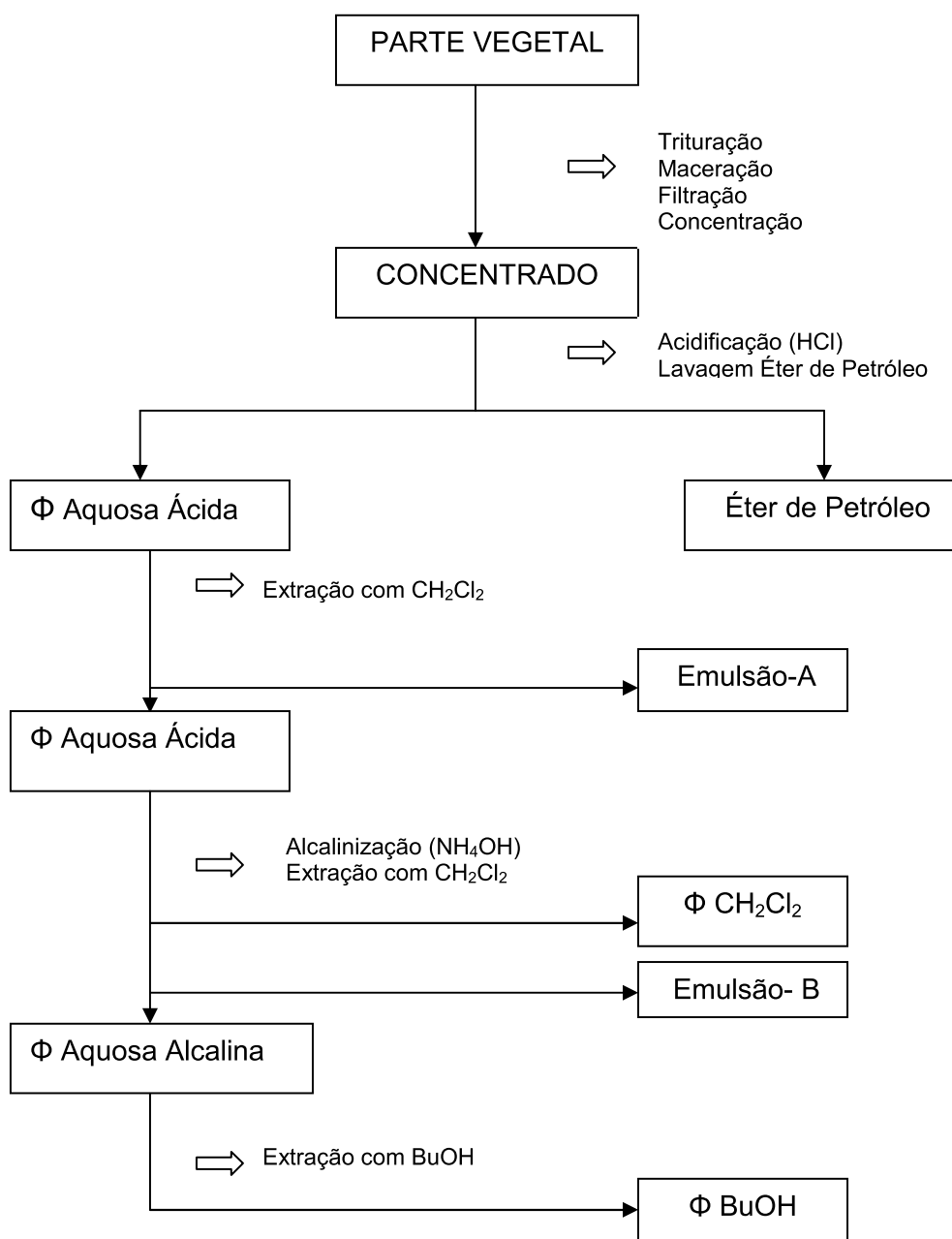
A coleta foi realizada na região de Atibaia, estado de São Paulo, no início do mês de maio de 2005. Nesta época, o vegetal apresentava-se desprovido de folhas e flores, coletando-se assim bulbos e raízes. O material foi identificado pela Dra. Julie Dutilh (Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas/ UNICAMP) e registrado como UEC 143513.

### **I.5.4 Extração dos alcalóides**

O material vegetal fresco foi dividido em bulbos e raízes, triturado e submetido à maceração estática com etanol 96% à temperatura ambiente por um período de 48 horas. Após este período o material foi filtrado e o remanescente submetido novamente a maceração com etanol. Esse processo repetiu-se até a ocorrência de reação negativa frente aos reagentes de precipitação de alcalóides (Mayer, Bertrand e Dragendorff). O material filtrado resultante do processo de maceração foi concentrado em evaporador rotatório para eliminação do solvente.

Para a obtenção das frações enriquecidas em alcalóides, os extratos brutos foram ressuspensos em solução de HCl 10%, lavados com éter de petróleo e, posteriormente, extraídos com diclorometano resultando em uma emulsão (Emulsão-A). O procedimento de extração foi repetido até reação negativa frente aos três reativos de alcalóides (Mayer, Bertrand e Dragendorff). A fase aquosa ácida restante foi alcalinizada com NH<sub>4</sub>OH 25% (pH 9-10) e submetida à extração com

diclorometano até reação negativa frente aos mesmos reagentes de precipitação de alcalóides, resultando na fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e uma nova emulsão (Emulsão-B). A fração aquosa alcalinizada foi submetida ainda à extração com BuOH para a remoção dos alcalóides mais polares, conforme mostra **Figura I.8**.



**Figura I.8** – Esquema de obtenção dos extratos ( $\Phi$  = fase)

### I.5.5 Análise cromatográfica das frações por CCD e CLAE

As frações Emulsão-A, Emulsão-B,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e BuOH de bulbos e raízes foram analisadas por cromatografia em camada delgada utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e MeOH (95:5)

como fase móvel. Após o desenvolvimento, as placas foram secas ao ar livre, observadas sob luz ultravioleta (254 e 366 nm) e nebulizadas com reagente de Dragendorff. Estas frações foram submetidas à análise por CLAE em uma concentração de 1,5 mg/ml, utilizando metanol como solvente para diluição.

#### **1.5.6 Análise espectroscópica das frações por CG/EM**

Por CG/EM elucidou-se o perfil químico das frações de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e BuOH de bulbos e raízes de *H. psittacinum*.

#### **1.5.7 Isolamento de alcalóides**

O isolamento dos alcalóides descritos a seguir, foram obtidos a partir das frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e BuOH de bulbos através de cromatografia em coluna (CC) e cromatografia líquida à vácuo (CLV).

##### **1.5.7.1 Isolamento do composto HP1**

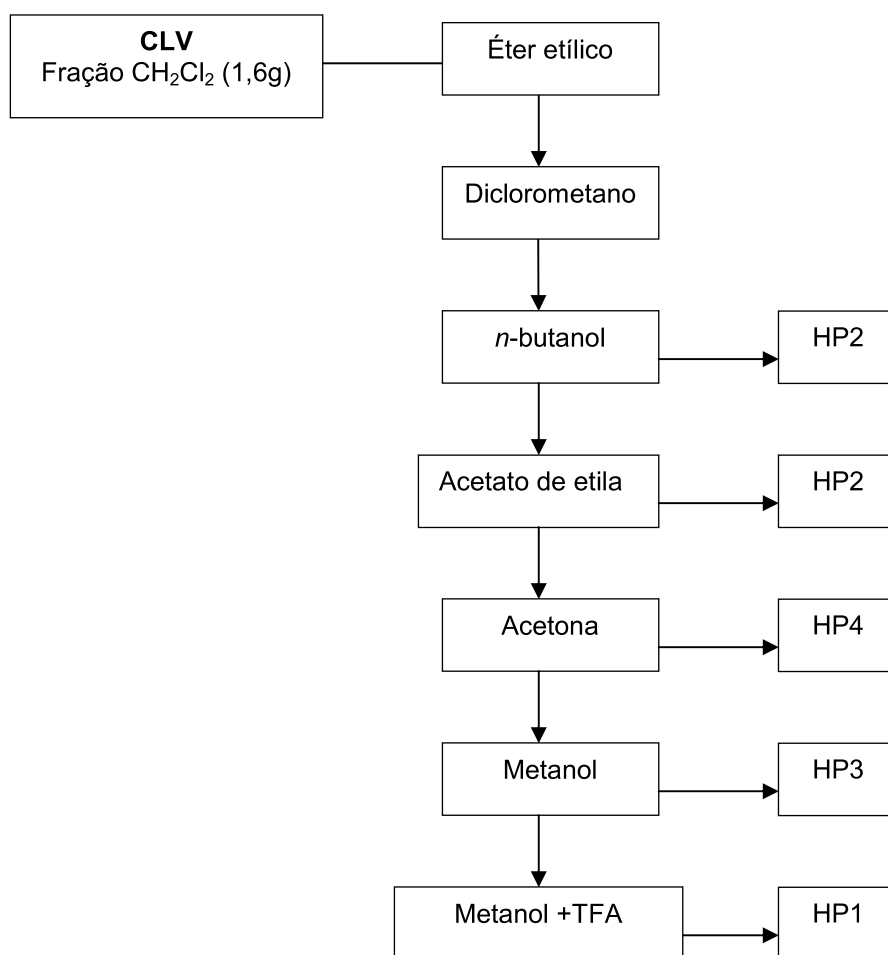
O composto **HP1** foi isolado a partir da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (460 mg). Esta fração foi submetida à CC empregando-se gel de sílica como fase estacionária e sistema eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH em ordem crescente de polaridade. Para esse procedimento utilizou-se uma coluna de dimensões 3,5 x 40 cm e 30 g de gel de sílica. Foram obtidas 129 frações e estas foram analisadas por CCD analítica utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95:5), como fase móvel. O perfil cromatográfico das frações 1 à 58 apresentaram-se muito semelhantes. Sendo assim, estas frações foram reunidas e submetidas posteriormente à CLV juntamente com uma quantidade maior de fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. As frações 59 à 129 com exceção de um intervalo entre as frações 117-124, indicaram perfil cromatográfico semelhante, observando-se uma mancha majoritária que quando revelada com o reagente de Dragendorff apresentou coloração característica de alcalóide (vermelho-tijolo).

As frações 117-124 formaram um precipitado que foi analisado por CCD analítica empregando-se sistema eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95/5). Foi observada apenas uma mancha com o valor de R<sub>f</sub> igual ao da mancha majoritária das frações 59 à 129, indicando a obtenção de um produto isolado denominado **HP1**.



### I.5.7.2 Isolamento dos compostos HP2, HP3 e HP4

Os compostos foram isolados a partir de 1,4 g da fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e de 171,1 mg das frações 1 à 58, resultantes da CC descrita no **item 1.5.7**, totalizando 1,6g. Esta quantidade de amostra foi submetida à CLV, na qual utilizou-se gel de sílica como fase estacionária e sistema eluente com diferentes solventes e ordem crescente de polaridade: éter etílico, diclorometano, *n*-butanol, acetato de etila, acetona, metanol, metanol+TFA, resultando em 7 frações (**Figura I.9**). Foram gastos 400 ml de cada eluente. As frações foram analisadas por CCD analítica utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95/5) como fase móvel.



**Figura I.9** – Esquema de obtenção dos produtos isolados

As frações éter etílico e diclorometano foram reunidas por apresentarem o mesmo perfil cromatográfico.

Na fração *n*-butanol ocorreu um precipitado significativo que foi separado do sobrenadante por centrifugação. Este precipitado, apresentou apenas uma mancha

indicando a obtenção de um produto isolado **HP2**. No sobrenadante, por sua vez foi verificado, além de outros produtos, uma mancha majoritária com o mesmo *Rf* do produto isolado **HP2** que quando revelados com o reagente de Dragendorff apresentaram coloração característica de alcalóide.

Na fração acetato de etila também verificou-se um produto na forma de precipitado isolado com o mesmo *Rf* do produto **HP2**. No sobrenadante, além deste mesmo produto, observou-se a presença de outros compostos que apresentaram coloração característica de alcalóides quando revelados com Dragendorff.

O produto **HP3** foi isolado da fração metanólica. Nesta, ocorreu formação de um precipitado apresentando-se em uma única mancha com coloração característica de alcalóides após revelação com Dragendorff.

Observou-se que na fração acetona houve a ocorrência de precipitado que foi separado do sobrenadante por centrifugação. A análise por CCD analítica deste precipitado indicou uma mancha majoritária que revelada com Dragendorff apresentou coloração característica de alcalóide, este composto foi denominado **HP4**.

Na fração Metanol+TFA também ocorreu precipitação, que, após análise por CCD analítica apresentou apenas uma mancha com o mesmo valor de *Rf* que o produto **HP1**. A CCD analítica do sobrenadante apontou a presença do produto **HP1** juntamente com outros compostos alcaloídicos.

## **I.6 RESULTADOS**

### **I.6.1 Massa e teor de umidade do material vegetal**

A massa da planta fresca relativa aos bulbos e raízes da espécie *H. psittacinum* está descrita na **Tabela I.2**.

**Tabela I.2 - Peso de planta fresca**

Parte utilizada	Peso fresco (kg)
Bulbo	3,370
Raiz	0,210

O teor de umidade médio encontrado para os bulbos e raízes de *H. psittacinum* foi de 90,45% e 85,27%, respectivamente.

### I.6.2 Rendimento das frações alcalóidicas

Para os cálculos de rendimento das frações alcalóidicas de cada parte do vegetal empregaram-se os valores da massa do vegetal fresco. O rendimento dos alcalóides totais (AT) deu-se pela soma das massas das frações que continham alcalóides: emulsão-A, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, emulsão-B, *n*-BuOH. Estes valores constam nas Tabelas I.3 e I.4.

**Tabela I.3 - Rendimento das frações alcalóidicas extraídas de bulbos**

Frações alcalóidicas	Rendimento das frações (g)	Rendimento das frações em relação ao peso fresco (%)
Emulsão-A	1,9759	0,0586
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3,7829	0,1122
Emulsão-B	1,6359	0,0485
<i>n</i> -BuOH	7,4032	0,2196
Alcalóides totais (AT)	14,7979	0,4389

**Tabela I.4 - Rendimento das frações alcalóidicas extraídas de raízes**

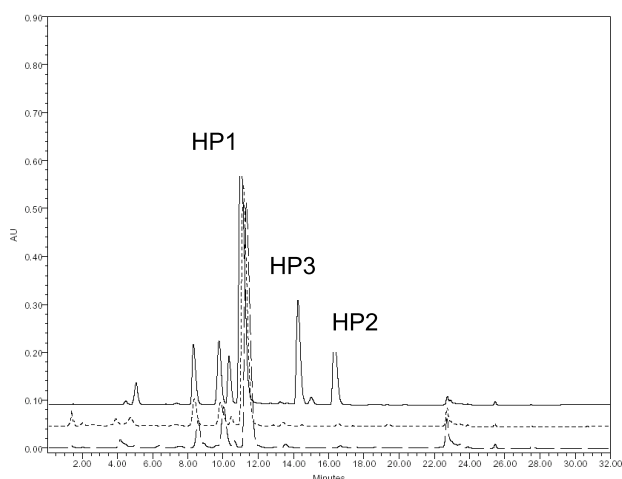
Frações alcalóidicas	Rendimento das frações (g)	Rendimento das frações em relação ao peso fresco (%)
Emulsão-A	0,0152	0,00723
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,067	0,0319
Emulsão-B	0,0113	0,00538
<i>n</i> -BuOH	0,0738	0,0351
Alcalóides totais (AT)	0,1673	0,07961

Diante dos valores apresentados acima, as frações extraídas dos bulbos tiveram um rendimento satisfatório possibilitando técnicas de isolamento, ao contrário das frações extraídas da raiz, que apresentaram baixos teores.

### I.6.3 Análise cromatográfica das frações por CCD e CLAE

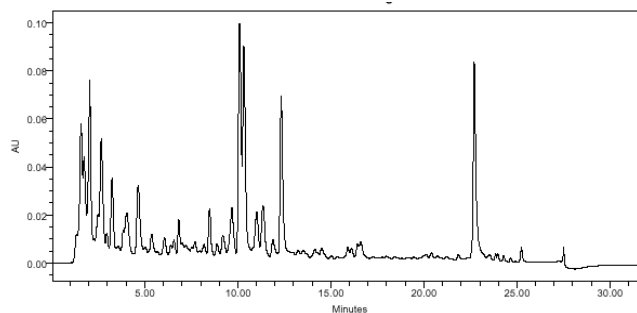
Quando analisado por CCD, o perfil cromatográfico de cada fração de bulbos e raízes apresentou-se igual.

As frações emulsão-A, emulsão-B e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , quando analisadas por CCD analítica e CLAE indicaram perfil cromatográfico semelhante, sendo que a fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  apresentou produtos em maior concentração em relação às emulsões A e B (Figura I.10).



**Figura I.10** - Perfil cromatográfico das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -B (-), emulsão-A (--), emulsão-B (- -) a 290 nm, obtido por CLAE, em equipamento com detector UV-VIS.

As análises por CCD da fração *n*-BuOH revelaram um maior número de manchas quando comparada às frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , emulsão-A e emulsão-B. No entanto, quando revelada com reagente de Dragendorff, a fração *n*-BuOH indicou um menor número de compostos revelados e com anisaldeído indicou também a presença de compostos fenólicos. As análises realizadas por CLAE confirmaram estes dados apresentando cromatograma com muitos picos, sendo que muitos destes não apresentavam cromóforo comum entre os alcalóides de Amaryllidaceae (Figura I.11).



**Figura I.11** - Perfil cromatográfico do extrato *n*-BuOH a 290 nm, obtido por CLAE, em equipamento com detector UV-VIS.

#### I.6.4 Análise espectroscópica das frações por CG/EM

A **Tabela I.5** revela a semelhança entre o perfil alcaloídico da fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de raízes e de bulbos. Nessas duas frações o alcalóide majoritário é a tazetina, sendo que a hipeastrina também se faz presente de forma significativa nas mesmas. A fração butanólica de raízes não indicou a presença de alcalóides em seu perfil químico, sendo que a fração de bulbos indicou apenas a presença do alcalóide trisphaeridina, além de outros compostos não alcaloídicos.

**Tabela I.5** Perfil alcaloídico da espécie *H. psittacinum*, obtido por CG/EM

Compostos	TR	Fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2$		Fração <i>n</i> -BuOH	
		Bulbo	Raiz	Bulbo	Raiz
Ismina	19,08	<b>traços</b>	<b>traços</b>		
Trisphaeridina	19,1		<b>traços</b>	<b>11,92</b>	
Galantamina	21,01		<b>traços</b>		
Galantano	22,5		<b>traços</b>		
6-Deoxitazetina	23,1	<b>0,67</b>	<b>0,62</b>		
Tazetina	24,96	<b>64,96</b>	<b>59,92</b>		
Licorina	26,05	<b>4,19</b>	<b>2,37</b>		
Epimacronina	27,02	<b>traços</b>	<b>3,25</b>		
8-O-demetilhomolicorina	27,09	<b>2</b>	<b>1,21</b>		
Hipeastrina	28,16	<b>15,86</b>	<b>8,66</b>		
2-hidroxiomolicorina	29,08	<b>4,24</b>	<b>0,64</b>		

TR-Tempo de retenção em minutos

### I.6.5 Identificação dos produtos isolados

A partir da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de bulbos isolaram-se 4 produtos, conforme tabela a seguir (**Tabela I.6**).

**Tabela I.6** - Rendimento dos compostos isolados

Composto	Massa (mg)	Rendimento em relação ao peso da parte da planta (bulbo) (%)
HP1	50mg	0,0015
HP2	70mg	0,0020
HP3	115mg	0,0034
HP4	5mg	0,00045

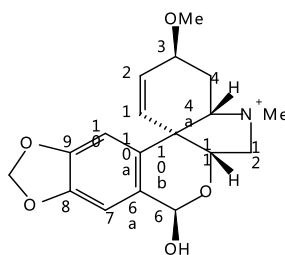
#### I.6.5.1 Composto HP1

Este composto foi isolado na forma de um semi-sólido, apresentando reação positiva frente aos reagentes de precipitação de alcalóides. Essa substância é solúvel a temperatura ambiente em diclorometano e *n*-butanol, sendo pouco solúvel em metanol.

O composto quando analisado à luz na região ultravioleta (UV), demonstrou a existência de bandas em 222 e 286 nm, indicando a presença de um cromóforo comum entre os alcalóides de Amaryllidaceae.

Na análise por CLAE, este composto apresentou o mesmo tempo de retenção que o alcalóide tazetina, isolado por HOFMANN JUNIOR (2002), porém, nas análises por CCD, estes dois compostos não apresentaram mesmo tempo de retenção. As análises por CG/EM não apresentaram um cromatograma elucidativo.

A técnica de RMN de <sup>1</sup>H indicou que o produto HP1 é um sal do alcalóide pretazetina (**Figura I.12**), cujo isolamento já foi descrito por WILDMAN (1968). Sendo assim, a fórmula molecular proposta para **HP1** é C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sup>+</sup>O<sub>5</sub>. O espectro deste composto encontra-se em anexo (**Figura 1**), onde se destaca, na região 3 ppm, a presença do sinal do hidrogênio, correspondente à metila ligada ao nitrogênio, indicando a ocorrência de um sal (BASTIDA *et al.*, 2005).



**Figura I.12** – Estrutura química sugerida para o alcalóide HP1: sal de pretazetina

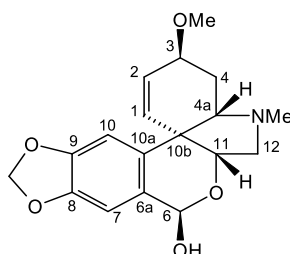
### I.6.5.2 Composto HP2

O composto HP2 foi isolado na forma de cristais incolores, obtendo-se reação positiva quando revelados com reagente de Dragendorff. Apresentou solubilidade em diclorometano, *n*-butanol/metanol, sendo pouco solúvel em metanol.

O espectro de UV realizado em butanol/metanol (3/2) com o produto isolado, demonstrou a existência de bandas em 242 e 294 nm, indicando a existência de um cromóforo comum entre os alcalóides de Amaryllidaceae.

Nas análises por CLAE, CCD e CG/EM, o composto HP2 apresentou perfil idêntico ao alcalóide pretazetina, isolado e identificado previamente por HOFMANN JUNIOR (2002). Os dados do CG/EM encontram-se em anexo (**Figura 2**). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  confirmou este resultado, apresentando sinais referentes ao alcalóide pretazetina, quando comparados com a literatura.

A partir das análises realizadas e da comparação com informações disponíveis na literatura, propõem-se que a fórmula molecular proposta para **HP2** é  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ , sendo identificado como alcalóide pretazetina (**Figura I.13**).



**Figura I.13** – Estrutura química sugerida para o alcalóide HP2: pretazetina

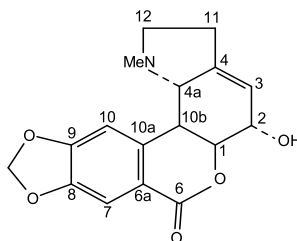
### I.6.5.3 Composto HP3

Este produto foi isolado na forma de cristais incolores, obtendo-se reação positiva quando revelados com Dragendorff. Apresentou solubilidade em metanol/acetona, sendo parcialmente solúvel em metanol.

O espectro de UV realizado em metanol com o produto isolado, demonstrou a existência de bandas em 242 e 294 nm, indicando a existência de um cromóforo comum entre os alcalóides de Amaryllidaceae.

Nas análises por CG/EM e RMN de  $^1\text{H}$ , verificou-se a presença de sinais semelhantes aos referenciados na literatura para o alcalóide hipeastrina. Estes dados apresentam-se em anexo (**Figura 3 e 4, respectivamente**).

Diante disso, propõem-se que a fórmula molecular proposta para **HP3** é  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ , sendo identificado como alcalóide hipeastrina (**Figura I.14**).



**Figura I.14** – Estrutura química sugerida para o alcalóide HP3: hipeastrina

### I.6.5.4 Compostos HP4

Não foi possível a identificação deste composto devido ao rendimento inexpressivo.



**CAPÍTULO II**  
**AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS**



## II.1 USOS POPULARES DE AMARYLLIDACEAE

As plantas usadas na medicina tradicional apresentam produtos naturais farmacologicamente ativos, os quais podem ser usados no tratamento de várias doenças (ELGORASHI e STADEN, 2004). Na **Tabela II.1**, estão apresentados alguns gêneros representativos da família Amaryllidaceae com seus respectivos usos populares.

**Tabela II.1-** Usos populares de membros representativos de Amaryllidaceae

Gêneros	Usos populares
<i>Cyrtantus</i>	Dores de cabeça, cistites, lepra.
<i>Gethyllis</i>	Cólica, flatulência, indigestão.
<i>Ammocharis</i>	Topicamente em torções ou furúnculos.
<i>Crinum</i>	Antimicrobiano, antiinflamatório, analgésico, antitumoral, antimalárico, antiviral, emético, varicoses, resfriados.
<i>Haemanthus</i>	Assepsia de feridas, dores reumáticas, dores de cabeça e abdominal, resfriados.
<i>Galanthus</i>	Propriedades emenagogas, estomacais, maturação de abscessos.
<i>Boophone</i>	Antiinflamatório, queimaduras, artrite, dores abdominais.

Fontes: DURI *et al.* (1994); VILADOMAT *et al.* (1995); SAMUD *et al.* (1999); NAIR *et al.* (2000); HERRERA *et al.* (2001); LOUW *et al.* (2002); ELGORASHI e STADEN (2004); RATNASOORIJA *et al.* (2005).

Muitos membros da família Amaryllidaceae são tóxicos e causam sintomas como dor de cabeça, salivação excessiva, náuseas, disritmia cardíaca, distúrbios visuais e dermatites. Alguns princípios tóxicos incluem os alcalóides licorina e haemantina (LOUW *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2004; RATNASOORIYA *et al.*, 2005).

## II.2 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS EM AMARYLLIDACEAE

Por atribuir-se aos alcalóides isoquinolínicos isolados da família Amaryllidaceae significantes propriedades biológicas, incluindo atividades antitumoral, antiviral, imunoestimulatória, antimalárica, além de promover a inibição da acetilcolinesterase, é crescente o interesse no que se refere à síntese química, propriedades biológicas e farmacológicas destes alcalóides (MANPADI e KORNIENKO, 2005).

Um alcalóide que merece destaque nesta família é a licorina, por atribuir-se a este alcalóide atividades antiviral, antineoplásica e antimitótica, bem como outras propriedades farmacológicas (MARTIN, 1987 e LEWIS, 1994). Consideráveis esforços têm sido direcionados para a síntese de alcalóides do tipo-licorina (ANGLE e BOYCE 1995). Sendo assim, investigações vieram acrescentar estudos sobre a atividade antineoplásica da licorina. LIU e colaboradores (2004), através de células de leucemia aguda da linhagem HL-60 que há muito tempo é utilizada para estudos celulares, demonstraram que a licorina pode suprimir o crescimento de células leucêmicas e reduzir células sobreviventes pela supressão do ciclo celular das células tumorais HL-60 induzindo a apoptose. Os ensaios sugeriram que a licorina tem efeito seletivo antitumoral, sendo que a concentração requerida para inibir o crescimento das células HL-60 em 50% é de aproximadamente 1  $\mu$ M. Este estudo citou a licorina como um alcalóide moderadamente tóxico.

Dos bulbos de *Hymenocallis littoralis* foi isolado um produto biossintético da fenantridona que nomeou-se de pancratistatina. Este alcalóide, em ensaios iniciais *in vivo*, foi efetivo contra leucemia linfocítica em células murinas P-388 e sarcoma ovariano M-5076 (PETTIT *et al.*, 1986).

Embora pancratistatina e narciclasina possuam promissoras atividades antitumorais, muitos estudos ainda são necessários, sobretudo a cerca do preciso modo de ação destes produtos de origem natural. Ensaio incluindo a inibição do ciclo celular em G0/G1 da fase S demonstraram uma significativa atividade antiparasitária da pancratistatina (RINNER *et al.*, 2004).

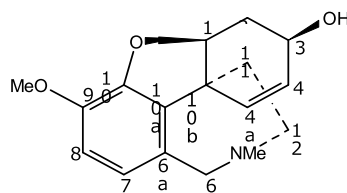
RATNASOORIYA *et al.* (2005), realizaram um estudo no qual examinou-se o potencial antinociceptivo das folhas de *Crinum bulbispermum*. Extratos aquosos destas folhas foram administrados oralmente em ratos machos que haviam sido submetidos a mecanismos induzidos de nocicepção. Demonstrou-se então que o extrato aquoso das folhas, mesmo que em menor grau que a droga de referência (meperidina), exibiu marcante potencial antinociceptivo. Este estudo sugeriu a participação de mecanismos opióides no extrato aquoso para induzir a antinocicepção, possivelmente por apresentarem alcalóides que possuem atividades analgésicas, como a galantamina. O extrato apresentou-se moderadamente tóxico devido a presença de alcalóides tipo-licorina.

Seis espécies de Amaryllidaceae foram avaliadas por ELGORASHI e STADEN (2004) quanto a suas propriedades antiinflamatória, antibacteriana e mutagênica, sendo elas: *Cyrtanthus falcatus*, *Cyrtanthus mackenii*, *Cyrtanthus suaveolens*, *Gethyllis ciliaris*, *Gethyllis multifolia* e *Gethyllis vilosa*. Concluiu-se que todos os extratos das diferentes espécies e partes vegetais exibiram, em maior ou menor grau, propriedades antiinflamatória e antibacteriana. Por outro lado, o efeito mutagênico na *Salmonella* foi expresso apenas pelos extratos de *Cyrtanthus falcatus* e *Cyrtanthus suaveolens*.

Podem-se citar outros alcalóides de Amaryllidaceae com importantes propriedades biológicas: hipadina, reportada por produzir inibição reversível da fertilidade em ratos machos (CHATTOPADHYAY *et al.*, 1983), 1,2-O-diacetillicorina que exhibe propriedade antimalárica e atividade citotóxica (CAMPBELL *et al.*, 1998), crinamina por possuir atividade antibacteriana (VILADOMAT *et al.*, 1996), 6-hidroxicrinamina e undulatina devido a suas propriedades antitumorais (PETTIT *et al.*, 1984; LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1998; NAIR *et al.*, 1998).

Dentre os alcalóides mais representativos da família Amaryllidaceae, destaca-se a galantamina. Este alcalóide possui uma estrutura dibenzofurano e já foi isolado de diferentes espécies em Amaryllidaceae (FUGANTI, 1975). O potencial farmacológico desta substância foi reportado devido sua atividade anticolinesterásica demonstrando efeitos positivos para o tratamento da Doença de Alzheimer, por promover o aumento da concentração de acetilcolina em regiões do cérebro em que apresentava-se reduzida (EICHHORN *et al.*, 1998). A galantamina, comercializada atualmente com o nome de Razadyne (antes comercializada como Remynil), age ligando-se nos receptores nicotínicos que estão presentes nos neurônios pré-sinápticos, promovendo o aumento de acetilcolina (HAKE, 2001).

LOPEZ *et al.* (2002), realizou um estudo para verificar a atividade inibidora de acetilcolinesterase em alcalóides puros e extratos metanólicos de diferentes espécies do gênero *Narcissus* utilizando a galantamina como referência. Verificou-se que os extratos com maior efeito inibitório da acetilcolinesterase continham galantamina e que, *in vitro*, o alcalóide sanguinina (9-O-demetilgalantamina) demonstrou efeito inibitório dez vezes maior que a galantamina.



**Figura II.1** - Estrutura do alcalóide galantamina

LIN e colaboradores (1995) investigaram os extratos de *Hymenocallis littoralis* e verificaram que a pretazetina, além de apresentar atividade antitumoral, indicou certa responsabilidade pela citotoxicidade demonstrada com os extratos da planta. No entanto, devido a rápida conversão de pretazetina em tazetina durante a separação e identificação, não foi possível o isolamento da pretazetina para investigação e confirmação deste dado. Na ocasião, isolou-se um novo alcalóide licorínico tipo-tazetina denominado litoralina, que demonstrou atividade inibitória da HIV transcriptase reversa.

Os alcalóides tazetina e pretazetina foram avaliados quanto a sua atividade antiviral. Estes não apresentaram atividade frente ao modelo experimental utilizado por HOFMANN JUNIOR e colaboradores (2004), sugerindo-se que outras metodologias sejam avaliadas.

Segundo relato de FENNEL e STADEN (2001), o alcalóide hipeastrina exibiu citotoxicidade em linhagens de células tumorais murinas, juntamente com outros dois alcalóides, haemantadina e tazetina. A hipeastrina também apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* em um estudo realizado por EVIDENTE e colaboradores (2004).

### II.3 DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva que atinge o sistema nervoso central (SNC) levando a uma redução nas habilidades cognitivas e severas anormalidades comportamentais (JIA *et al.*, 2009). É caracterizada pela formação de emaranhados neurofibrilares (SHAH *et al.*, 2008) e por uma série de lesões que envolvem a hipersecreção da proteína  $\beta$ -amilóide pelas células afetadas. Em indivíduos com DA esta proteína é produzida de maneira

exagerada causando vacúolos de tamanho crescente determinando a morte dos neurônios que as rodeiam (IZQUIERDO, 2002).

Levando em consideração que os mecanismos patogênicos propostos para DA geralmente baseiam-se na deficiência colinérgica, estresse oxidativo, cascata amilóide, inflamação e excitotoxicidade (LONGO e MASSA, 2004; PÁKÁSKI e KÁLMAN *et al.*, 2008; SHAH *et al.*, 2008), algumas estratégias terapêuticas para DA têm sido investigadas.

### **II.3.1 Doença de Alzheimer e sistema colinérgico**

Embora as causas da DA não estejam totalmente esclarecidas, tem-se observado que a supressão da acetilcolina (ACh) leva à perda massiva da capacidade do SNC (HENCHMAN *et al.*, 2008). Devido a isso, estratégias envolvendo aplicação de inibidores de acetilcolinesterase e agonistas colinérgicos tem sido amplamente investigados para melhorar os sintomas cognitivos e comportamentais da doença DA (LONGO e MASSA, 2004).

Dentre os medicamentos mais prescritos estão a galantamina, rivastigmina e donepezil. Embora o mecanismo de ação primário destas três drogas seja de inibição da acetilcolinesterase (AChE), seus perfis farmacológicos e mecanismos de ação secundários são diferentes (REID e SABBAGH, 2008). A galantamina é reportada por inibir a AChE pela sua capacidade de modulação alostérica positiva em receptores nicotínicos pré-sinápticos, aumentando a concentração de acetilcolina na fenda (MAELICKE *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2002), a rivastigmina é um inibidor da butirilcolinesterase em adição a acetilcolinesterase (GIACOMINI *et al.*, 2002) e o donepezil é um inibidor altamente seletivo da AChE sendo que sua capacidade de inibição sob essa enzima é maior quando comparada à galantamina (GEETRS *et al.*, 2005).

As drogas citadas acima apresentam efeitos colaterais semelhantes, sendo estes: gastrointestinais (náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, dispepsia, dor abdominal, aumento da secreção ácida), cardiovasculares (oscilação da pressão arterial, síncope, arritmia, bradicardia) e outros sintomas como tontura, cefaléia,

agitação, insônia, câimbras, sudorese e aumento da secreção brônquica (FORLENZA, 2005).

Estudos clínicos mostram que a administração de inibidores de AChE auxilia na diminuição da progressão da DA. Em geral, investigações envolvendo um grupo de pacientes recebendo placebo e outro recebendo um fármaco inibidor da AChE mostram que neste último a diminuição das funções cognitivas ocorrem de forma mais lenta.

Em estudos, a administração da galantamina em doses de 16 ou 24 mg ao dia demonstrou efeitos benéficos sob o comportamento e funções cognitivas dos pacientes com DA quando comparadas ao grupo placebo (COYLE e KERSHAW, 2001; ERKINJUNTTI, 2002). Investigações com a rivastigmina, além de demonstrarem sua eficácia para DA, mostraram sua alta tolerabilidade e baixos efeitos adversos (AGID *et al.*, 1998; WILLIAMS *et al.*, 2003). O fármaco donepezil apresentou benefícios cognitivos em pacientes que sofrem de doença vascular cerebral e DA (PASSMORE *et al.*, 2005), além dos benefícios observados sobre a memória e cognição em pacientes com esclerose múltipla (CHRISTODOULOU *et al.*, 2006)

### **II.3.2 Estratégias antioxidantes**

O estresse oxidativo tem sido indicado como uma das causas de diversas doenças que normalmente estão associadas com o aumento da idade, incluindo diabetes, arterosclerose e desordens neurodegenerativas como a DA (ROTTKAMP *et al.*, 2000). Especificamente na DA, o que ocorre é o acúmulo de produtos oxidativos que levam à diminuição de funções enzimáticas importantes, incluindo as que participam da liberação regulada do glutamato, resultando em excesso de glutamato extracelular e conseqüentemente excitotoxicidade (KOURIE, 2001).

FORLENZA (2005) reporta que a vitamina E em doses altas (1.000 UI duas vezes ao dia) e a selegenina (10 mg ao dia) tem sido empregadas como adjuvantes no tratamento da DA, não proporcionando melhora objetiva da cognição, e sim, retardando a evolução natural da doença. Entretanto, os dados encontrados na



literatura quanto aos efeitos benéficos da vitamina E na DA são, ainda, insuficientes para utilizá-la como terapia para esta doença (ENGELHARDT, 2005).

### **II.3.3 Estratégias com antiinflamatórios não esteroidais**

A deposição da proteína  $\beta$ -amilóide e a formação de placas estão associadas com uma resposta inata que inclui secreção de citocinas pró-inflamatórias e excreção de óxido nítrico que são mediadores de apoptoses (SHAH *et al.*, 2008). O uso de antiinflamatórios não esteroidais podem reduzir os riscos de DA por diminuir a produção da proteína  $\beta$ -amilóide (BREITNER *et al.*, 1994).

### **II.3.4 Estratégia glutamatérgica**

O glutamato é um neurotransmissor excitatório cerebral, principalmente em regiões associadas às funções cognitivas e à memória. O glutamato também age como uma excitotoxina, causando a morte neuronal quando níveis elevados desse neurotransmissor são liberados por períodos prolongados. As regiões corticais e subcorticais que contêm neurônios e receptores glutamatérgicos sofrem perdas estruturais e funcionais durante a evolução da DA (WENK *et al.*, 2000).

A memantina é um fármaco utilizado em estágios moderados a severos da DA. É um antagonista não-competitivo do receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), capaz de manter o bloqueio do canal NMDA na liberação sustentada de glutamato, impedindo o fluxo de cálcio intracelular (LIPTON, 2004; FARLOW e CUMMINGS, 2007).

Investigações mostram que a memantina apresenta eficácia sob a cognição e comportamento em pacientes que sofrem de DA e esquizofrenia (DOODY *et al.*, 2007; KRIVOY *et al.*, 2008).

## **II.4 MEMÓRIA**

“Memória” é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações (IZQUIERDO, 2002). As memórias podem ser classificadas de acordo com o seu conteúdo em memórias explícitas ou declarativas e implícitas ou não-declarativas. As memórias explícitas estão disponíveis para evocação consciente e envolvem o lobo temporal medial e hipocampo. As memórias implícitas não

requerem evocação consciente, e as estruturas que participam destas são a amígdala, gânglio basal e cerebelo (LEES e JONES, 2000; BEAR, *et al.* 2008).

Outra classificação de memórias refere-se ao tempo que duram. As memórias de curta duração podem persistir por poucos minutos ou horas, enquanto que as de longa duração podem persistir por muitas horas, dias e/ou meses. E quando perduram por anos são denominadas remotas (IZQUIERDO, 2002).

O primeiro dos processos mnemônicos é a aquisição, que consiste na entrada de uma informação qualquer nos sistemas neurais ligados à memória. Após a aquisição dos aspectos selecionados a um evento, estes podem ser armazenados por algum tempo (anos, semanas, segundos). Esse é o processo de retenção da memória, durante o qual os aspectos selecionados de cada evento ficam de algum modo disponíveis para serem lembrados. Na maioria das vezes estes aspectos ficam disponíveis temporariamente, de modo que a retenção nem sempre é permanente (LENT, 2005).

As funções do SNC podem ser moduladas. Os primeiros indícios experimentais da existência de sistemas moduladores da memória surgiram da constatação de que a aprendizagem pode ser modificada após o treino de uma tarefa, modulando o processo de consolidação. Essa modulação artificial pode ser exercida por intervenções como estimulação elétrica de certas regiões neurais e a administração local de drogas (LENT, 2005).

#### **II.4.1 Hipocampo e memória**

O lobo temporal medial é formado por um grupo de estruturas interconectadas que possuem um importante papel para a consolidação de memórias declarativas, sendo elas: hipocampo, as áreas corticais próximas e as vias que conectam essas estruturas com outras partes do encéfalo (BEAR *et al.*, 2008). As células piramidais da região CA1 do hipocampo possuem um conjunto de mecanismos que lhes permitem desempenhar funções plásticas (plasticidade hipocampal), alterando a capacidade das células nervosas de mudar suas respostas a determinados estímulos em função da experiência (IZQUIERDO, 2002).

Sendo assim, algumas tarefas podem ser utilizadas para verificar o envolvimento de um determinado composto na formação de memórias quando infundido no hipocampo. A tarefa de Reconhecimento de Objetos, que engloba mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas; o paradigma da Esquiva Inibitória, que envolve também uma memória declarativa porém o animal aprende a emitir a resposta incondicionada ante a apresentação única do estímulo condicionante; a tarefa do Labirinto Aquático de Morris, que envolve a memória espacial, sendo que diversas linhas de evidência sugerem que o hipocampo seja particularmente importante para esta (BEAR *et al.*, 2008).

#### **II.4.2 Atividade dos alcalóides isoquinolínicos no sistema nervoso central e no comportamento**

A atividade de extratos e substâncias isoladas, entre estas os alcalóides, vêm ocupando posição de destaque em algumas estratégias terapêuticas relacionadas ao SNC (CARLINI, 2003).

A galantamina é o alcalóide de Amaryllidaceae mais investigado quanto ao seu papel no SNC por possuir atividades como inibição da enzima acetilcolinesterase, modulação dos receptores nicotínicos, além de modificar paradigmas comportamentais como a memória e comportamento em geral (WOODRUFF-PAK *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2002). HARVEY (1995), descreveu a melhora da memória em modelos de esquiva passiva e ativa em ratos com o envolvimento da galantamina.

Após a descoberta de que o alcalóide galantamina é um potente inibidor da acetilcolinesterase e, conseqüentemente muito importante para o tratamento da doença de Alzheimer (LIU *et al.*, 2004), o interesse no isolamento e caracterização de alcalóides de Amaryllidaceae tem aumentado exponencialmente (ELGORASHI *et al.*, 2004). MARKMEE e colaboradores (2006), utilizando o método desenvolvido por ELLMAN e colaboradores (1961), demonstraram que algumas estruturas derivadas de alcalóides isoquinolínicos apresentam significativo potencial de inibição da AChE quando comparados à galantamina.

Portanto, como o hipocampo desempenha um papel fundamental na memória apresentando estreita relação com a DA torna-se interessante a investigação de compostos que possam modular positivamente a memória.

#### **II.4.3 Estudos farmacológicos com o alcalóide montanina**

SILVA e colaboradores (2006) relataram em seus experimentos que a montanina, alcalóide isolado da espécie *Hippeastrum vittatum* (Amarillidaceae) apresentou atividades sedativa, ansiolítica, anticonvulsivante e antidepressiva em ratos quando administrada intraperitonealmente.

O único estudo envolvendo o alcalóide montanina em processos de formação da memória foi realizado por SILVA (2005), que observou significativa atividade moduladora sob a via de sinalização das MAPKs, através de fatias hipocampais tratadas com este alcalóide. Com base neste estudo, este trabalho pretende contribuir na investigação do papel da montanina sob a consolidação e retenção de memória.

#### **II.5 AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS COM *Hippeastrum psittacinum***

Até o momento não há relato na literatura quanto a investigações biológicas desta espécie *H. psittacinum*. A pesquisa foi realizada nas bases de dados: SCIENCE DIRECT (1950/2006) e WEB OF SCIENCE/CAPES (1945/2009).

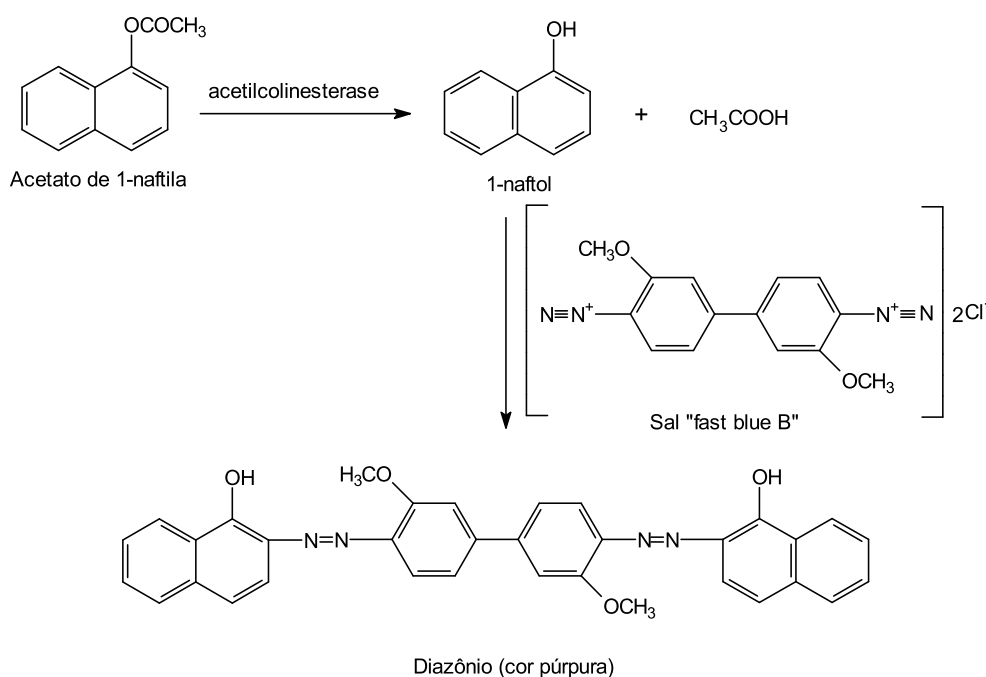
### **II.6 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **II.6.1 Detecção de inibidores da Acetilcolinesterase**

##### **II.6.1.1 Método descrito por MARSTON e colaboradores (2002)**

Este método bioautográfico foi aplicado para os extratos e produtos isolados de *H. psittacinum* e baseia-se na clivagem do acetato de 1-naftila pela acetilcolinesterase para formar 1-naftol que, por sua vez, reage com o sal "fast blue B" resultando na coloração púrpura do diazônio (**Figura II.2**). A placa de CCD permanece coberta por uma coloração púrpura e a inibição da enzima resulta em manchas incolores.

O método consiste em dissolver acetilcolinesterase (1000 U) em 150 ml de tampão Tris-ácido clorídrico 0,05 M a pH 7,8, sendo necessário adicionar albumina de soro bovino (150 mg) na solução para estabilizar a enzima durante o ensaio. A solução de estoque é mantida a 4°C.



**Figura II.2-** Reação da enzima acetilcolinesterase com o acetato de 1-naftila e a formação subsequente da coloração púrpura na cromatografia em camada delgada.

Foram aplicados 10 µl de cada extrato nas concentrações de 0,1 mg/ml, 1 mg/ml e 10 mg/ml e 5 µl, 10 µl ou 20 µl de cada produto isolado na concentração de 1 mg/ml.

O padrão utilizado foi o alcalóide fisostigmina em concentração de 1 mg/ml e volume de aplicação 10 µl.

Após a aplicação dos produtos sobre a cromatofolha e completa secagem do solvente, a placa foi submetida à nebulização com a solução de estoque de acetilcolinesterase e novamente seca. Para a incubação da enzima, a placa foi colocada sob uma tampa suspensa em um tanque contendo água, resultando em uma atmosfera úmida, sem contato direto da placa com a água. A incubação foi realizada em uma temperatura de 37°C por 20 minutos. Para detecção da enzima, foi preparada, imediatamente antes do uso, uma solução de 1-naftil acetato em

etanol e de *Fast Blue B salt* em água destilada e, após, 10 ml da primeira solução foram misturados com 40 ml da segunda, sendo esta mistura nebulizada na placa que sofreu anteriormente o processo de incubação. O desenvolvimento de coloração púrpura após 1-2 minutos indica a presença de acetilcolinesterase.

#### **II.6.1.2 Método descrito por ELLMAN e colaboradores (1961)**

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi verificada para os alcalóides pretazetina e hipeastrina, substâncias teste isoladas de *H. psittacinum* (itens 1.6.7 e 1.6.8 respectivamente) e do alcalóide montanina, isolado de *H. vittatum* por SILVA (2005). Esta atividade é determinada pela hidrólise do substrato sintético iodeto de acetiltiocolina (substrato) a uma concentração de 0,8 mM em 1ml de solução contendo 30 mM de tampão fosfato com Triton X-100 1% (pH 7,5) e 1,0 mM de DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic Acid), a 25°C. O homogeneizado de hipocampo de rato (50 µl) foi adicionado a mistura e pré-incubado por 3 min.

A hidrólise da acetilcolina foi monitorada pela formação do diânion tiolato de DTNB de coloração amarela, em espectrofotômetro a 412 nm por 2 minutos (em intervalos de 30 segundos). A atividade enzimática é expressa como µmol de acetilcolina por hora por grama de proteína. Os alcalóides montanina, hipeastrina e pretazetina foram adicionados nos ensaios experimentais nas concentrações 100 pm, 100 nm, 10 µm, 100 µm, 500 µm ou 1 mM. Os controles não continham alcalóides no meio de incubação.

#### **II.6.2 Determinação da atividade antioxidante**

Através da reação com 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), que resulta na redução do radical DPPH, permite-se a determinação da atividade antioxidante.

De acordo com CAVIN e colaboradores (1998), a determinação da atividade antioxidante consiste em depositar em uma placa de cromatografia em camada delgada (CCD) os extratos, frações ou produtos puros a serem testados na qual os solventes apropriados proporcionarão uma separação adequada. Após a secagem, a CCD é vaporizada com uma solução metanólica de DPPH a 0,2%, sendo analisadas 30 minutos após a revelação. O aparecimento de manchas amareladas sobre fundo violeta é indicativo de atividade anti-radicalar positiva.

Neste ensaio, foram aplicados 10 µl de cada extrato nas concentrações de 10 mg/ml, 1 mg/ml ou 0,1 mg/ml. E 5 µl, 10 µl ou 20 µl de cada produto isolado na concentração de 1 mg/ml.

O padrão utilizado foi rotina em concentração de 1 mg/ml e volume de aplicação 10 µl.

### **II.6.3 Efeitos do alcalóide montanina na consolidação da memória**

#### **II.6.3.1 Animais de experimentação**

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 250-300 g, na quantidade de 10 animais para cada parâmetro experimental. Os animais foram provenientes do biotério da Fundação Estadual para Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). A adaptação dos animais se deu por 72 horas no Biotério do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas - PUCRS. Os animais foram mantidos em caixas plásticas, forradas com maravalha, com capacidade máxima de cinco animais para cada caixa. Os animais tiveram livre acesso a água e alimento e foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 e escuro a partir das 19h), a uma temperatura ambiente mantida em torno de 22 ° C e umidade monitorada.

Após os experimentos, o sacrifício dos animais foi realizado utilizando guilhotina. O máximo de cuidado e precaução foi tomado com intuito de minimizar o sofrimento dos animais. Esta metodologia está de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996), e está aprovada no comitê de ética da UFRGS número 2007894.

#### **II.6.3.2 Procedimento cirúrgico**

Para a administração da substância teste montanina, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia bilateral de 0,2 mm de diâmetro e 0,9 mm de comprimento, posicionadas 1,0 mm acima da região alvo, neste caso, a camada piramidal da região CA1 do hipocampo dorsal. As coordenadas utilizadas para a cirurgia estereotáxica foram as seguintes: Antero Posterior (AP) = -4,2 mm; Médio Lateral (MD) =  $\pm$  3,0 mm; Dorso Ventral (DV) = - 2,0

mm. Estas coordenadas foram adaptadas do Atlas Anatômico PAXINOS e WATSON (1986). Todo o procedimento foi realizado com animais previamente anestesiados com ketamina (“francotar”; Virba, ou “Vetanarcol”; König) juntamente com xilazina (“Coopazine”; Coopers), administrados intraperitonealmente (*i.p.*), nas doses de 75 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. As cânulas-guia foram fixadas com acrílico junto ao osso parietal do crânio dos ratos. A agulha utilizada para infusão do composto possui 0,05 mm de diâmetro e 0,9 mm de comprimento, permitindo que o composto atinja exatamente a região desejada, com o mínimo possível de danos mecânicos.

### **II.6.3.3 Manipulação dos animais**

Três a quatro dias após a cirurgia, os animais passaram por quatro sessões de manipulação. Durante cada sessão os animais eram levados do biotério até a sala onde os experimentos foram conduzidos, retirados de suas caixas e manuseados durante 2 minutos, de um modo parecido com os movimentos realizados durante os experimentos.

### **II.6.3.4 Substância teste**

Foi realizada a administração bilateral intrahipocampal do alcalóide montanina, isolado de *H. vittatum* por SILVA, 2005. Foi utilizado cloreto de sódio 0,9% como veículo de dissolução.

### **II.6.3.5 Modelos experimentais utilizados para avaliação de aquisição de memória**

Os modelos descritos a seguir, foram realizados de forma padrão, nos quais a injeção da montanina deu-se imediatamente pós-treino e as sessões testes ocorreram 24h ou 7 dias pós-treino.

### **II.6.3.6 Paradigma do Reconhecimento de Objetos**

Quando roedores são apresentados a objetos familiares e novos, eles dependem um tempo maior para explorar o objeto novo. Este comportamento típico tem sido utilizado no desenho de um paradigma comportamental conhecido como Reconhecimento de Objetos (ENNACEUR e DELACOUR, 1988). Esta tarefa torna-



se uma ferramenta útil para o estudo dos processos cognitivos e comportamentais envolvidos na formação ou evocação de memórias (CLARKE, 2008).

O aparato utilizado para a tarefa de reconhecimento de objetos consiste de uma caixa retangular com 60 cm de comprimento por 40 cm de profundidade e 50 cm de altura o qual se encontra em uma sala com baixa luminosidade e isolada acusticamente. A parte frontal do campo aberto é constituída de vidro. Antes de serem submetidos à tarefa de reconhecimento, os animais passaram por um processo de habituação ao dispositivo experimental (campo aberto sem objetos) durante 4 dias, o qual constituiu de uma sessão comportamental diária de 10 min na qual os animais foram colocados individualmente no campo aberto para que o explorassem livremente. Os objetos utilizados na tarefa de reconhecimento não possuem significância comportamental para os animais experimentais, os quais não demonstram preferência por qualquer um deles, observado por estudo *piloto* realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa. Cada objeto foi preso ao assoalho do campo aberto pela base, estando aproximadamente 20 cm de distância um do outro, e das paredes laterais do campo aberto.

A tarefa consiste na medição do tempo gasto pelo animal explorando cada objeto. Na sessão de treino ( $T1$ ), após os quatro dias de habituação, o animal é colocado na caixa de campo aberto na presença de dois objetos idênticos (objetos A), permitindo-os um tempo máximo de exploração dentro do campo aberto de cinco minutos. Durante este período, foi mensurado o tempo de exploração gasto pelos animais nos dois objetos ( $A1$  e  $A2$ ). Na sessão de teste ( $T2$ ), os animais foram colocados no mesmo campo aberto, porém na presença de um novo objeto (objeto B), no lugar de um dos objetos da sessão de treino, permitindo-lhes que explorassem livremente por 5 minutos, onde foi medido o tempo gasto de exploração em ambos os objetos (A e B) (PRICKARERTS *et al.*, 1997).

A medida básica utilizada na tarefa de Reconhecimento de Objetos foi dada pelo tempo de exploração em cada objeto, em  $T1$  e  $T2$  (**Tabela II.2**). As siglas  $e1$  e  $e2$  foram as medidas do tempo de exploração total em  $T1$  e  $T2$ , respectivamente. O índice  $h1$  foi considerado uma medida de habituação global do comportamento exploratório em  $T1$  e  $T2$ . Índice  $d2$  foi considerado como uma medida da

discriminação entre o objeto familiar (objeto A) e o objeto novo (objeto B) (PRICKARERTS, *et al.*, 1997).

**Tabela II.2-** Medidas utilizadas no teste de reconhecimento de objetos

Exploração	Habituação	Discriminação
$e1 = a1 + a2$ $e2 = a + b$	$H1 = e1 - e2$	$d2 = (b - a)/e2$

Onde:  $e1$  é o tempo gasto na exploração dos objetos idênticos ( $a1$  e  $a2$ ) em  $T1$ ,  $e2$  é o tempo gasto de exploração do objeto familiar ( $a$ ) e do objeto novo ( $b$ ) em  $T2$ ,  $h1$  é a medida de habituação global em  $T1$  e  $T2$ ,  $d2$  é a medida relativa da discriminação entre o objeto novo e familiar, no qual é dada pela discriminação absoluta ( $b - a$ ) dividido pela atividade exploratória ( $e2$ ).

Na tarefa de Reconhecimento de Objetos, foi realizada a administração do alcalóide montanina nas doses 0,1 µg/µl, 1 µg/µl ou 3 µg/µl (1 µl/lado) imediatamente pós-treino, sendo que a sessão de teste foi realizada 24 h pós-treino. Através da curva dose-resposta obteve-se a dose utilizada nos experimentos para verificar os efeitos da montanina na retenção de memória.

Para avaliação de retenção de memória em 7 dias no paradigma do Reconhecimento de Objeto utilizou-se a dose de 3 µg/µl.

### II.6.3.7 Esquiva inibitória

O aparato utilizado para a realização da tarefa de esquiva inibitória consiste de uma caixa acrílica, com vidro na parte frontal, composta por assoalho de barras de bronze de 0,8 mm e espaçadas entre si, com uma plataforma localizada ao lado esquerdo da caixa a 5 cm de altura e 7 cm de largura (revestimento de fórmica). Os ratos foram colocados sobre a plataforma e a latência de descida para a grade foi registrada após as quatro patas estarem localizadas no assoalho de bronze. Quando localizados totalmente no assoalho, os animais receberam um pequeno choque de 0,2 mA por 2 segundos. Imediatamente após o treino, os animais receberam infusão bilateral intra CA1 de montanina na dose de 3 µg/µl ou veículo. As sessões de teste (24h ou 7 dias pós-treino) foram realizadas da mesma forma como foi o treino, mas com a ausência do choque.

### **II.6.3.8 Labirinto Aquático de Morris (LAM)**

O aparato utilizado para o paradigma de LAM consiste em um tanque escuro circular de 2 m de diâmetro e 0,6 m de altura contendo água em temperatura  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  até 0,4 m de altura do tanque. O labirinto localiza-se no centro de uma sala contendo diversas pistas extra labirinto (cartazes ou figuras geométricas nas paredes da sala), estas pistas permanecem constantes por todo o experimento. O labirinto é dividido imaginariamente em quatro quadrantes (nordeste, noroeste, sudeste e sudoeste) e em quatro posições de largada (norte, sul, leste e oeste). Dentro do labirinto é colocada uma plataforma circular (12 cm de diâmetro) localizada no centro de um dos quadrantes imaginários, situada 1,5 cm abaixo da superfície da água, sempre no mesmo quadrante.

Os animais foram treinados no LAM com uma sessão diária durante cinco dias, cada sessão se constituiu de quatro *trials* ou largadas randômicas dos diferentes pontos do labirinto (N, S, L, O) com intervalo de 10 a 15 s entre cada largada. A contagem do tempo inicia quando o animal é colocado no labirinto (com focinho voltado para a parede), cada largada tem duração de até 60 s, e se o animal não encontra a plataforma durante este período de tempo é conduzido até ela pelo experimentador, permanecendo sobre a mesma durante 30 s. Foi avaliado o tempo que o animal leva para encontrar e se posicionar sobre a plataforma. Após cada sessão de treino os animais receberam infusão bilateral intra CA1 de montanina na dose de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ou veículo. Nos testes 24 horas ou 7 dias após a última sessão de treino, o animal foi colocado novamente no LAM (sem a presença da plataforma), por um período de 60 s, avaliando-se o tempo de permanência no quadrante alvo (quadrante em que esteve localizada a plataforma durante o treino), a latência e o número de cruzamentos no local exato onde estava a plataforma.

### **II.6.3.9 Avaliações complementares**

*Avaliação da atividade locomotora espontânea (Teste de Exposição ao Campo Aberto)*

Para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais utilizou-se um paradigma conhecido como campo aberto. O aparelho

empregado para tal fim consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a sua parede frontal de vidro transparente. O assoalho da caixa é dividido em 12 quadrantes com igual área de superfície. Durante o experimento, o animal foi gentilmente colocado na arena do campo aberto, onde foi permitido explorar livremente por 5 min. Durante este tempo registrou-se o número de linhas cruzadas e o número de elevações sobre as patas traseiras (em inglês *rearings*), comportamentos que nos roedores denotam exploração (BONINI *et al.*, 2006; DA SILVA *et al.*, 2006).

#### *Avaliação do estado de ansiedade (Labirinto em Cruz Elevado)*

Para avaliar o estado de ansiedade dos animais, utilizou-se a tarefa do labirinto em cruz elevado. Esta tarefa consiste em uma plataforma em cruz com 40 cm de comprimento em cada braço, posicionada a 1 metro de altura. Dois braços do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados abertos. O animal é colocado no centro do labirinto e deixado livre para explorá-lo por 5 min. Registrou-se, o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Quanto mais ansioso estiver o animal, maior o tempo de permanência nos braços fechados (naturalmente menos aversivos a roedores) e maior também o número de entradas nestes braços (BEVILAQUA *et al.*, 2003; KERR *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2006).

#### **II.6.3.10 Controle histológico da localização das cânulas-guia e do local de infusão**

A verificação anatômica do posicionamento das cânulas-guia e local atingido pela infusão foi realizada *post mortem*. Sendo assim, após os experimentos comportamentais, os animais receberam 1 µl de uma solução de azul de metileno 0,1% através das cânulas como descrito previamente. Aproximadamente quinze minutos após, foram sacrificados, seus cérebros removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de 4 a 7 dias. Após este período, foi realizada a análise histológica, sendo que somente os animais que apresentaram a mancha azul de metileno num raio de 2 mm do local desejado foram considerados na análise estatística de dados.

### **II.6.3.11 Descarte dos resíduos biológicos**

Como procedimento para o descarte dos restos dos animais utilizados nos experimentos, os mesmos foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados em freezer, utilizado exclusivamente para esta finalidade, até o recolhimento semanal realizado pela coleta especial para resíduos biológicos na PUCRS.

O descarte dos materiais perfurocortantes, utilizados nos experimentos com animais, foi feito através do acondicionamento destes em recipientes rígidos que não permitam rupturas, sendo estes armazenados e recolhidos semanalmente pela coleta especial para resíduos biológicos da PUCRS.

### **II.6.3.12 Análise estatística**

A análise foi realizada em um computador Pentium IV 2.8 GHz utilizando os *softwares* Graph-Pad Prisma 4.1 e Microsoft Office Excel. Os ensaios de inibição da acetilcolinesterase pelo Método de ELLMAN e colaboradores (1961) foram realizados em duplicada e seus dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo Dunnett's Multiple Range Test.

Para avaliação estatística da tarefa de reconhecimento de objetos foi utilizado o teste *t* não pareado das doses individuais comparadas ao grupo controle, baseado no trabalho de PRICKARERTS e colaboradores (1997). Na obtenção da curva dose resposta, foi nós utilizado ANOVA de uma via seguida do TuKey's Multiple Comparision test. Os dados obtidos nas tarefas de esquiva inibitória e labirinto aquático de Morris foram analisados por teste *t* não pareado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## **II.7 RESULTADOS**

### **II.7.1 Detecção de inibidores da Acetilcolinesterase**

#### **II.7.1.1 Método descrito por MARSTON e colaboradores (2002)**

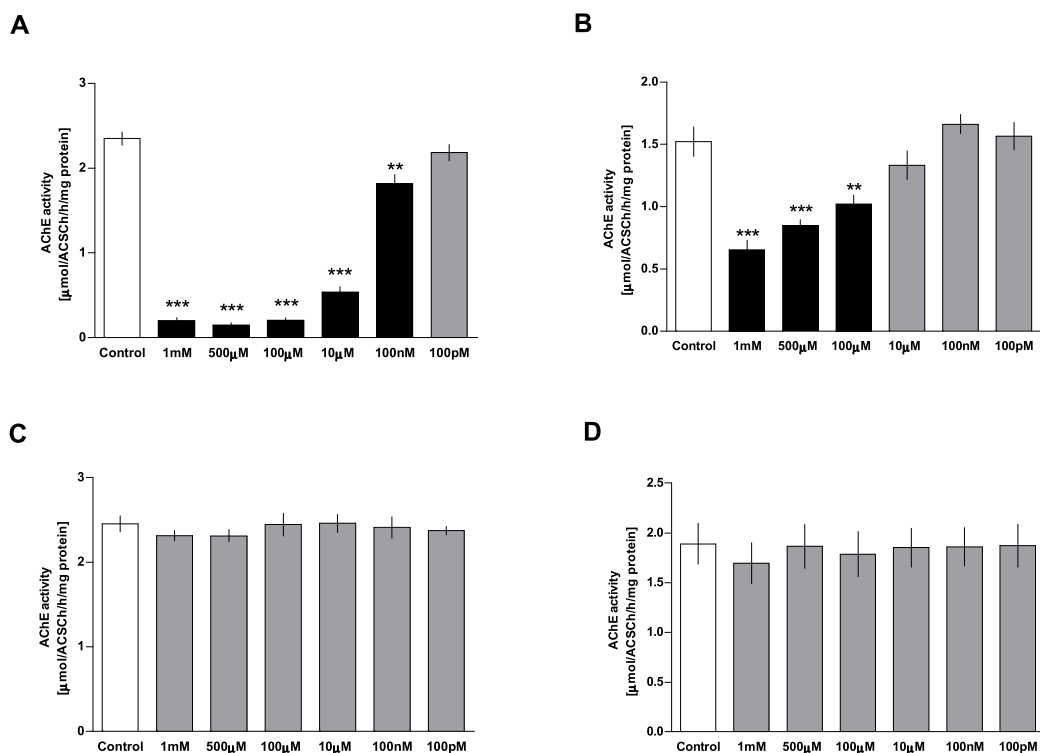
**Tabela II.3-** Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase dos extratos e dos produtos isolados de *H. psittacinum*

<b>Amostras</b>	<b>Ache</b>		
<b>Extratos</b>	<b>Concentrações (mg/ml)</b>		
	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>0,1</b>
Mole	+	+	+
Aquoso	+	-	-
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	+++	+	-
<i>n</i> -BuOH	+++	++	+
<b>Isolados</b>	<b>Concentração (1mg/ml)</b>		
	<b>20µl</b>	<b>10µl</b>	<b>5µl</b>
Sal de pretazetina	+++	+	-
Pretazetina	++	++	++
Hipeasrtina	+	+	+
<b>Padrão</b>	<b>Concentração (1 mg/ml)</b>		
Fisostigmina	+++		

A análise qualitativa da atividade anticolinesterásica revelou que, de acordo com o método empregado, todas as amostras testadas apresentaram resultado positivo ao teste. Os resultados obtidos corroboram a afirmativa de que exemplares da família Amaryllidaceae são fontes potenciais de compostos anticolinesterásicos.

#### **II.7.1.1 Método descrito por ELLMAN e colaboradores (1961)**

A **figura II.3** revela a porcentagem de inibição dos alcalóides galantamina (A), montanina (B), hipeastrina (C) e pretazetina (D) quando comparados com o controle. A galantamina apresentou inibição da AChE maior que 90% nas concentrações 100 µm, 500 µm e 1mM. A montanina inibiu a enzima em dose dependente, tendo seu efeito mais pronunciado na concentração 1 mM (inibindo mais que 50%); nas concentrações de 100 µm e 500 µm, a porcentagem de inibição da enzima foi de 30-45%. Os alcalóides hipeastrina e pretazetina não apresentaram inibição significativa da AChE nas concentrações testadas.



**Figura II.3: Efeito *in vitro* dos alcalóides galantamina (A), montanina (B), hipeastrina (C), pretazetina (D) na atividade da AChE em hipocampus de ratos wistar adultos.** Dados são expressos como  $\pm$  SEM, para 5 experimentos independentes realizados em duplicatas. \*\*\*  $p < 0.001$  e \*\*  $p < 0.01$  comparado com o controle (Dunnett's Multiple Range Test).

### II.7.2 Determinação da atividade antioxidante

A análise qualitativa da atividade antioxidante revelou que, de acordo com o método empregado, todas as amostras testadas apresentaram resultado positivo ao teste, sendo que o extrato mole e o alcalóide hipeastrina foram os que mais apresentaram potencial antioxidante (**Tabela II.4**).

**Tabela II.4-** Avaliação da atividade antioxidantes dos extratos e dos produtos isolados de *H. psittacinum*

<b>Amostras</b>	<b>Atividade antioxidante</b>		
<b>Extratos</b>	<b>Concentrações (mg/ml)</b>		
	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>0,1</b>
Mole	+++	+	+
Aquoso	++	-	-
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	++	-	-
<i>n</i> -BuOH	+	-	-
<b>Isolados</b>	<b>Concentração (1mg/ml)</b>		
	<b>20µl</b>	<b>10µl</b>	<b>5µl</b>
Sal de pretazetina	++	++	-
Pretazetina	++	+	-
Hipeastrina	+++	++	++
<b>Padrão</b>	<b>Concentração (1 mg/ml)</b>		
Rutina		+++	

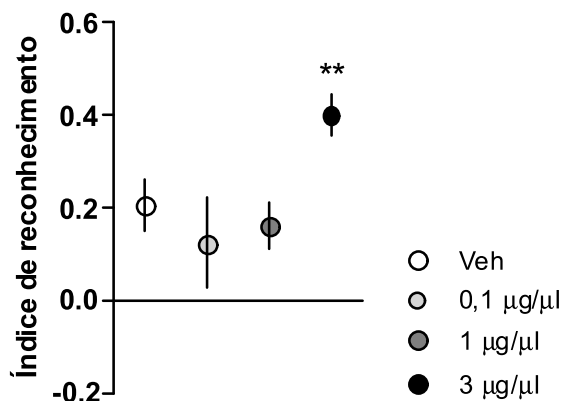
### II.7.3 Efeito do alcalóide montanina na consolidação de memória

#### II.7.3.1 Paradigma do Reconhecimento de Objeto

Imediatamente após o treino na tarefa de Reconhecimento de Objetos, os animais receberam infusão bilateral, na região CA1 do hipocampo dorsal, montanina nas doses 0,1 µg/µl, 1 µg/µl e 3 µg/µl ou veículo. A retenção da memória de longa duração para as três doses foi avaliada em uma sessão teste com 5 min de duração, realizada 24 horas após o treino. Na sessão teste, substituiu-se um dos objetos utilizados durante o treino por um objeto novo, ao qual os animais jamais haviam sido expostos. Como pode se observar na **Figura II.4**, no teste realizado 24 horas após o treino os ratos que receberam infusão de montanina na dose de 3 µg/µl mostraram um índice de reconhecimento maior, indicando que exploraram o objeto novo por tempo significativamente maior que o objeto conhecido quando comparados com o grupo controle. Nas doses de 0,1 µg/µl e 1 µg/µl, o índice de

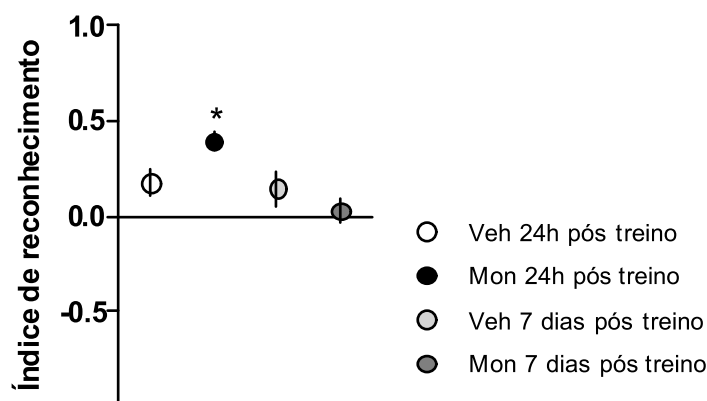


exploração sob o objeto novo não foi significativamente diferente quando comparado com o grupo controle.



**Figura II.4: Curva dose-resposta do alcalóide montanina no paradigma do Reconhecimento de Objetos.** No Treino, os ratos foram expostos a dois objetos iguais (A e A) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral na região CA1 do hipocampo dorsal (1 µl/lado) de veículo (Veh) ou montanina (Mon) nas doses 0,1 µg/µl, 1 µg/µl e 3 µg/µl. Na sessão Teste 24 horas após o treino, os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e a um objeto novo (B) por 5 min. Dados (média ± erro padrão) são representados como índice de reconhecimento. Utilizado teste *t* não pareado na comparação entre doses individuais e controle. Utilizado ANOVA de UMA VIA seguido de Tukey's Multiple Comparison test, para obtenção da curva dose-resposta. \*  $p < 0,01$  ( $n=10-15$ ).

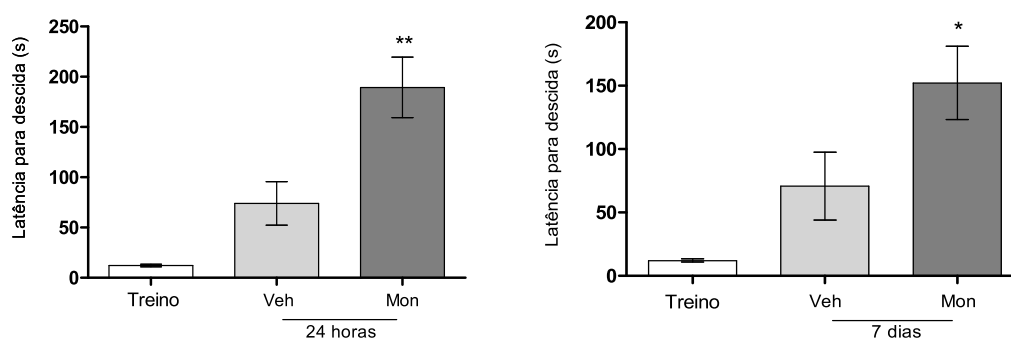
Para investigar se a montanina além de auxiliar no processo de consolidação também melhora a perdurabilidade, a dose de 3 µg/µl, que apresentou índice reconhecimento significativo na tarefa de Reconhecimento de Objeto, foi administrada imediatamente após o treino por injeção intra hipocampal para avaliarmos a capacidade de retenção de memória da montanina 7 dias após o treino. Verificou-se, com isso, que esta dose não faz com que a memória de longa duração perdure por mais tempo (**Figura II.5**).



**Figura II.5: Efeito da montanina sob a consolidação de memória de longa duração no paradigma do Reconhecimento de Objetos.** No Treino os ratos foram expostos a dois objetos iguais (A e A) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (Veh) ou montanina (Mon) na dose de 3 $\mu$ g/ $\mu$ l na região CA1 do hipocampo dorsal. Na sessão Teste 7 dias após o Treino, os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e a um objeto novo (C) por 5 min. Dados (média  $\pm$  erro padrão) são representados como índice de reconhecimento. \* $p < 0,05$  em teste  $t$  não pareado (n=10-15 por grupo).

### II.7.3.2 Tarefa de Esquiva Inibitória

A **Figura II.6** ilustra os resultados obtidos para os ratos expostos no paradigma de esquiva inibitória.

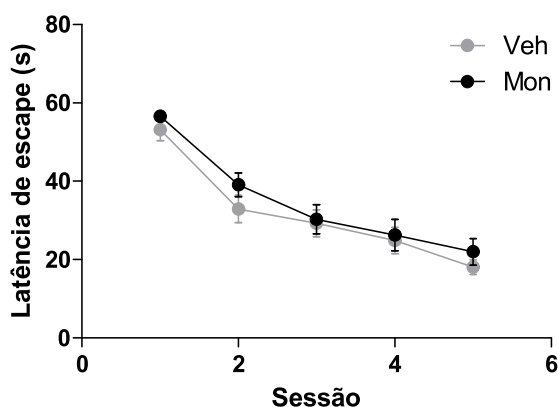


**Figura II.6: Efeito da montanina sob a consolidação e retenção de memória de longa duração no paradigma de Esquiva Inibitória.** Imediatamente após o Treino, os ratos receberam infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (Veh) ou montanina (Mon) na dose de 3 $\mu$ g/ $\mu$ l na região CA1 do hipocampo dorsal. As sessões Testes ocorreram 24 horas (A) e 7 dias após o Treino (B). Dados (média  $\pm$  erro padrão) são representados como latência para descida da plataforma. \*\* $p < 0,01$  \* $p < 0,05$  em teste  $t$  não pareado (n=10-15 por grupo).

Imediatamente após o treino, injetou-se bilateralmente montanina na dose de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ou veículo por via intra hipocampal. As sessões testes realizadas após o treino apresentaram mudança significativa no tempo de latência, sugerindo que a montanina melhora a consolidação da memória de longa duração e que esta perdura até 7 dias.

### II.7.3.3 Labirinto Aquático de Morris

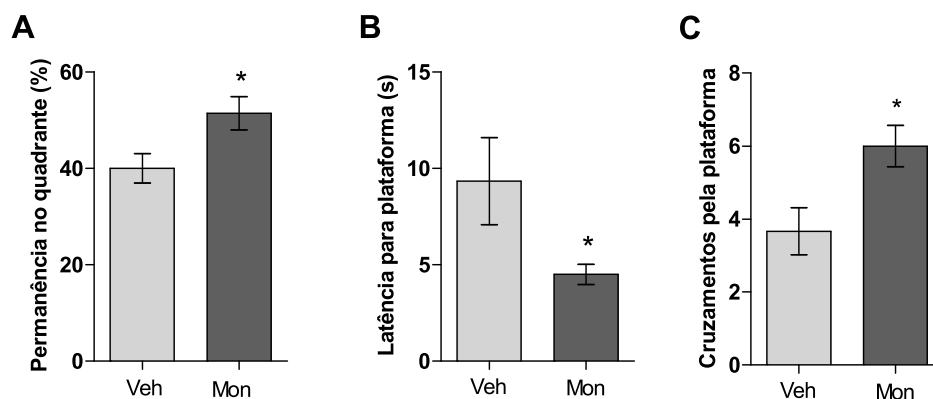
A **Figura II.7** ilustra a curva de aprendizado dos ratos no decorrer dos 5 dias de treino no Labirinto Aquático de Morris. Durante os 5 dias, após cada sessão de treino, injetou-se bilateralmente montanina na dose de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ou veículo, via intra hipocampal. A curva mostra que tanto o grupo que recebeu montanina quanto o grupo controle aprenderam progressivamente a localização da plataforma no decorrer das sessões de Treino.



**Figura II.7: Curva de aprendizado no Labirinto Aquático de Morris.** Imediatamente após cada sessão de treino, os ratos receberam infusão bilateral (1  $\mu\text{l}/\text{lado}$ ) de veículo (Veh) ou montanina (Mon) na dose de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  na região CA1 do hipocampo dorsal. As sessões Treino ocorreram durante 5 dias. Dados (média  $\pm$  erro padrão) são representados como latência para encontrar a plataforma submersa (n=10-15 por grupo).

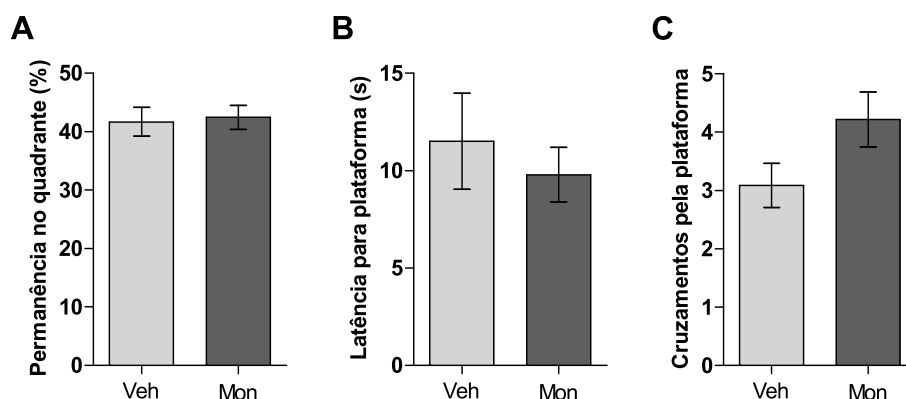
Na sessão Teste (dia 6), os animais foram colocados novamente no LAM (sem a presença da plataforma), por um período de 60 s. Na **Figura II.8** verificamos que os animais que receberam montanina após as sessões Treino apresentaram um percentual de tempo de permanência maior no quadrante alvo (A), menor latência para chegar ao local onde a plataforma esteve localizada (B) e maior número de cruzamentos pelo local onde encontrava-se a mesma (C), quando comparados com

os animais controles. Estes dados sugerem que a montanina, além de atuar sob a memória espacial, apresenta atividade sob o hipocampo na consolidação da memória de longa duração.



**Figura II.8: Efeito da montanina sob a consolidação de memória de longa duração 24h pós treino no paradigma Labirinto Aquático de Morris.** 24h após a última sessão Treino (dia 6), os animais tratados com veículo (Veh) ou montanina (Mon) na dose de 3µg/µl foram expostos às mesmas condições das sessões Treino, porém sem a plataforma, avaliando-se por 60 s o percentual de tempo de permanência no quadrante alvo (A), latência para chegar ao local onde a plataforma esteve localizada (B) e o número de cruzamentos pelo local onde encontrava-se a plataforma (C). \* $p < 0,05$  em teste  $t$  não pareado ( $n=10-15$  por grupo).

Os animais foram submetidos a mais uma sessão de teste 7 dias após o treino, nas mesmas condições do primeiro teste. Na **Figura II.9** verificamos que os animais que receberam montanina, quando comparados com os animais controles, não apresentaram diferença significativa no percentual de tempo de permanência no quadrante alvo (A), latência para chegar ao local onde a plataforma esteve localizada durante as sessões treino (B) e número de cruzamentos pelo local onde encontrava-se a mesma (C). Estes dados sugerem que mesmo a montanina exercendo alguma atividade sob o hipocampo na consolidação da memória espacial de longa duração, não faz com que esta perdure até 7 dias após o treino.



**Figura II.9: Efeito da montanina sob a consolidação da memória de longa duração 7 dias pós treino no paradigma Labirinto Aquático de Morris.** 7 dias após a última sessão Treino, os animais tratados com veículo (Veh) ou montanina (Mon) na dose de 3µg/µl foram expostos às mesmas condições das sessões Treino, porém sem a plataforma, avaliando-se por 60 s o percentual de tempo de permanência no quadrante alvo (A), latência para chegar ao local onde a plataforma esteve localizada (B) e o número de cruzamentos pelo local onde encontrava-se a plataforma (C). Teste *t* não pareado. (n=10-15 por grupo).

## II.7.4 Tarefas complementares

### II.7.4.1 Teste do Campo Aberto e Labirinto de Cruz Elevado

Para eliminar a possibilidade de que os resultados obtidos estivessem relacionados com efeitos da montanina sobre a ansiedade ou a atividade exploratória dos ratos, capazes de impedir a evocação da memória de longa-duração, ratos foram expostos ao Labirinto em Cruz Elevado e ao Campo Aberto, 24 horas após receberem infusão de montanina ou veículo.

A droga testada não causou alterações no número total de entradas, no número de entradas nos braços abertos ou na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos durante sessão de 5 minutos no Labirinto em Cruz Elevado. Da mesma forma, a montanina não afetou o número total de cruzamentos e de elevações sob as patas traseiras em uma sessão de exploração livre com duração de 5 min no Campo Aberto (**Tabela II.5**), indicando mais uma vez que os resultados obtidos se devem a um efeito pró-amnésico e não adverso ao composto, pois este não afetou a ansiedade nem a atividade locomotora e exploratória dos animais.

**Tabela II.5:** Efeito da montanina sob a atividade locomotora, exploratória e no estado de ansiedade.

	<b>Veh</b>	<b>Montanina</b>
Total de Entradas	11,1 ± 1,46	12 ± 1,37
Entradas nos braços Abertos	6,3 ± 0,98	6,4 ± 0,83
% de tempo nos Braços Abertos	57,1 ± 5,61	61,03 ± 5,29
Cruzamentos	47,45 ± 8,32	40,44 ± 5,89
Elevações	18,73 ± 3,45	16 ± 1,89

Os ratos receberam infusão bilateral (1 µl/lado) de veículo (Veh) ou montanina (Mon) na dose de 3µg/µl na região CA1 do hipocampo dorsal 24 h antes de uma sessão de Campo Aberto ou Labirinto em Cruz Elevado. Dados são expressos como média (± erro padrão) do número total de entradas, número de entradas nos braços abertos e porcentagem de tempo nos braços abertos (Labirinto em Cruz; n=10 por grupo) e número de total de cruzamentos e elevações (Campo Aberto; n=10 por grupo). Um grupo distinto de animais foi utilizado para cada paradigma comportamental.



Uma particular característica de Amaryllidaceae consiste na presença de um grupo exclusivo de alcalóides, o qual tem sido isolado de plantas de todos os gêneros desta família. Os alcalóides de Amaryllidaceae representam um largo e crescente grupo de alcalóides isoquinolínicos, sendo que, em sua maioria, a ocorrência é desconhecida em outras famílias de plantas (BASTIDA, 2005). Apesar da literatura apresentar algumas diferenças quanto aos núcleos fundamentais dos alcalóides de Amaryllidaceae, a classificação mais recente é exposta por BASTIDA (2005). Esta, por sua vez, pode servir como uma ferramenta para diferenciar gêneros e espécies desta família.

De prevalência predominantemente na América Latina, o gênero *Hippeastrum* apresenta poucos estudos relatados na literatura, sejam estes de ordem química ou biológica. Devido a isto, nosso grupo de pesquisa vem investigando espécies deste gênero, sendo estas *H. glaucescens*, *H. breviflorum*, *H. vittatum* e *H. striatum* (HOFMAN JUNIOR, 2002; SEBBEN, 2005; SILVA, 2005; ANDRADE, 2007).

O presente trabalho realiza uma investigação da espécie *Hippeastrum psittacinum*, a qual foi motivada pela inexistência de estudos envolvendo sua constituição química e avaliação das atividades biológicas de seus principais constituintes químicos.

A análise por CLAE indicou que apesar do perfil cromatográfico de bulbos e raízes serem semelhantes, os bulbos apresentaram maior teor de alcalóides quando comparados com as raízes, confirmando observações anteriores para o gênero, sendo que os extratos oriundos de bulbos mostraram maior concentração de alcalóides na fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A fração mais polar (*n*-BuOH) apresentou predominância de compostos não alcalóidicos.

As investigações realizadas por CG/EM não apenas confirmaram a semelhança de bulbos e raízes para as frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  quanto a presença de alcalóides, como também vieram corroborar a necessidade de mais estudos químicos relacionados a *H. psittacinum*. Além dos alcalóides majoritários isolados neste trabalho, a técnica por CG/EM expôs uma gama de alcalóides com possibilidade de isolamento e investigações biológicas dos mesmos.



Através do isolamento e identificação pelos métodos cromatográficos e espectroscópicos propostos neste trabalho, a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de bulbos forneceu dois alcalóides majoritários: pretazetina e hipeastrina. Na análise por CLAE a pretazetina, apresentou-se em menor concentração que seu sal, o qual também foi isolado e submetido à identificação por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. A literatura cita que a pretazetina já foi isolada de outros gêneros de Amaryllidaceae, mais particularmente em *Narcissus*, (BASTIDA, 2005) e em espécies de *Hippeastrum* como *H. equestre* (LEWIS, 1997) e *H. glaucescens* (HOFMANN JUNIOR *et al.*, 2003). A hipeastrina, alcalóide que também apresentou-se de forma expressiva na fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, já havia sido reportada em Amaryllidaceae, nos gêneros *Narcissus* (LEWIS, 1996), *Hymenocallis* (LEWIS, 1997) e em espécies de *Hippeastrum* como *H. rutilum* (WILDMAN, 1960), *H. equestre* (LEWIS, 1996) e *H. vittatum* (BOIT, 1954).

Portanto, verificou-se que o perfil químico da espécie *H. psittacinum* apresenta predomínio de dois núcleos fundamentais: tazetina, em que a pretazetina se faz presente e o núcleo homolicorina, no qual inclui-se o alcalóide hipeastrina.

Em práticas tradicionais, numerosas plantas têm sido utilizadas para o tratamento de distúrbios cognitivos. Estudos etnofarmacológicos e isolamento por ensaios bioquímicos têm proporcionado a identificação de potenciais inibidores da AChE em plantas (MUKHERJEE *et al.*, 2007). Diversas espécies de Amaryllidaceae são conhecidas pela capacidade inibitória da AChE, como é o caso de espécies do gênero *Narcissus* (LOPEZ *et al.*, 2002), *Crinum* (HOUGHTON *et al.*, 2004) e *Leucojum* (BERKOV *et al.*, 2008).

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa relacionada com o envelhecimento e que apresenta manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas (HUNG *et al.*, 2008). É caracterizada por uma diminuição dos neurônios colinérgicos e está associada com a redução dos níveis de ACh no cérebro (LANE *et al.*, 2006). Desta forma, a inibição da AChE é considerada uma das estratégias para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos.

O dano causado por espécies reativas ao oxigênio é um fator contribuinte de diversas doenças, incluindo a DA (HOUGHTON e REN, 2006). Por isso, investigar o potencial antioxidante de uma substância pode credenciá-la a ser uma molécula

bioativa mais completa quando se considera o conjunto de suas propriedades (GIORDANI *et al.*, 2008), fazendo com que a associação de ensaios, antioxidante e anticolinesterásico, torne-se interessante para um estudo bioguiado mais eficiente. Portanto, os estudos *in vitro* dos extratos obtidos de *H. psittacinum* e dos alcalóides isolados destes extratos voltaram-se para avaliação antioxidante e anticolinesterásica dos mesmos. Os resultados obtidos por estes dois ensaios *in vitro* confirmaram registros da literatura que trazem a família Amaryllidaceae como uma fonte de estruturas alcaloídicas capazes de inibir a AChE e, além disso, incentivaram investigações mais aprofundadas direcionadas à inibição desta enzima pelos alcalóides isolados de *H. psittacinum*.

Para o método de ELLMAN e colaboradores (1961), além de utilizarmos os alcalóides pretazetina e hipeastrina, isolados de *H. psittacinum*, utilizamos o alcalóide montanina, isolado de *H. vitattum* por SILVA (2005). Os resultados obtidos para montanina através deste ensaio veio ao encontro dos resultados descritos por SILVA (2005) os quais demonstraram que este alcalóide possui significativo potencial de inibição da AChE pelo método de MARSTON e colaboradores (2002). Os alcalóides pretazetina e hipeastrina por sua vez, não apresentaram atividade significativa sob a inibição da AChE em nenhuma das concentrações testadas pelo método de ELLMAN e colaboradores (1961), devendo-se considerar que as concentrações utilizadas neste trabalho foram menores que a testada no modelo *in vitro* desenvolvido por MARSTON e colaboradores (2002), no qual haviam apresentado resultados positivos frente ao potencial de inibição da enzima.

Tendo em vista que o sistema hipocampal é a região mais importante para evocação de memórias declarativas e que as lesões características da DA aparecem inicialmente no córtex entorrinal e, de forma marcante, no hipocampo, propusemos neste trabalho uma investigação do potencial da montanina, alcalóide que apresentou na inibição da AChE, no processo de consolidação da memória através da infusão intrahipocampal.

Devido a plasticidade que as células nervosas, e em geral, as células piramidais da região CA1 do hipocampo apresentam, os estudos que relacionam mecanismos envolvidos com a formação de memória utilizam-se das mais variadas tarefas comportamentais (IZQUIERDO, 2002).

Reconhecimento é o processo pelo qual um sujeito está ciente de que um estímulo tenha sido previamente experimentado. Isto é fortemente dependente da sua memória, pois requer uma série de operações cognitivas que se baseiam de informações prévias, a fim de que a novidade vá ao encontro com a memória de experiências anteriores (QUILLFELDT, 2006).

Diante disso, utilizamos o paradigma de Reconhecimento de Objetos para verificar a influência da montanina sob a memória de reconhecimento. Nesta tarefa, à medida que o animal lembra do objeto antigo, o objeto novo deverá ser explorado por mais tempo.

Os nossos resultados demonstraram que a injeção bilateral intrahipocampal de montanina imediatamente após o treino, na dose de 3 µg/µl /lado, apresenta melhora de memória quando testados 24 horas pós treino quando comparados com os animais que receberam veículo. Todavia, o teste realizado 7 dias após o treino, não demonstrou, na tarefa de reconhecimento de objetos, que a montanina exerce influência na retenção de memória por um período maior, no caso deste estudo, 7 dias.

Nosso interesse principal com este experimento era verificar se o composto testado possui papel na consolidação de memória. Portanto, para nos certificarmos dos resultados obtidos no Reconhecimento de Objetos, optamos por dois paradigmas em que o hipocampo, local onde injetamos a montanina, possui participação no processo de consolidação da memória: Esquiva Inibitória e Labirinto Aquático de Morris.

A Esquiva Inibitória envolve a formação de uma memória declarativa na qual o animal aprende a inibir uma resposta para não receber um estímulo aversivo. Esta tarefa envolve memória episódica e semântica. Na primeira lembramos de um episódio no qual aprendemos e, na segunda, aprendemos a evitar a maioria das circunstâncias perigosas devido à uma determinada experiência anterior (IZQUIERDO, 2002). Na Tarefa de Esquiva Inibitória, o hipocampo é responsável pelo processamento de informações do tipo espacial e contextual, enquanto que a amígdala é importante para o conteúdo emocional (IZQUIERDO, 2002). Nossos resultados neste paradigma demonstraram que a montanina na dose de 3µg/µl,

melhora a consolidação da memória quando os animais são testados 24 horas pós treino e que esta memória perdura por 7 dias quando comparados com os animais que receberam veículo.

Estudos relatam que no paradigma de Labirinto Aquático de Morris o hipocampo é uma estrutura importante para a memória espacial. Estes estudos apontam que ratos normais aprendem rapidamente a localização espacial da plataforma e, em tentativas subseqüentes não perderão tempo e nadarão diretamente a ela. Já os ratos com hipocampo comprometido parecem não lembrar da localização da plataforma (BEAR *et al.*, 2008). Este fato mostra que o hipocampo é uma estrutura fundamental para formação deste tipo de memória. Por este motivo submetemos os animais ao Labirinto aquático de Morris. Os resultados obtidos neste paradigma mostraram que os animais tratados com montanina na dose de 3µg/µl, 24 horas após a última sessão de treino, lembravam mais da localização da plataforma quando comparados ao grupo controle, sugerindo que a montanina ativa mecanismos relacionados com a formação da memória espacial. Nos entanto, os dados obtidos indicam que este alcalóide não apresenta efeitos na perdurabilidade deste tipo de memória pois quando os animais foram testados 7 dias após a última sessão de treino, estes tiveram uma performance parecida com o grupo controle.

Portanto, os resultados deste trabalho quanto aos efeitos da montanina sob a consolidação e retenção da memória nos permitem concluir que este alcalóide, quando injetado via intrahipocampal, imediatamente após o treino, atua de forma positiva na consolidação dos diferentes tipos de memória avaliados.

O papel da montanina na consolidação da memória, pode ser justificada pela ação inibitória deste alcalóide sob a atividade da AChE, mesmo que em menores concentrações que a galantamina. A inibição da AChE faz com que aumente a concentração da ACh na fenda sináptica, promovendo maior afinidade deste neurotransmissor com seus os receptores.

Por fim, este trabalho traz a montanina como um composto com significativo potencial de inibição AChE, possuindo relação com processos mnemônicos e, dessa forma, contribuindo para pesquisas de novos fármacos relacionados ao tratamento de desordens neurológicas como a DA.

**CONCLUSÕES**

- Nas análises realizadas por CCD e CLAE dos extratos obtidos de *H. psittacinum* o perfil cromatográfico de bulbos e raízes apresentou-se semelhante.
- As frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de bulbos e raízes de *H. psittacinum* além de indicarem perfil semelhante às emulsões A e B, quando analisadas por CCD e CLAE, apresentaram produtos em maior concentração. A fração BuOH de bulbos indicou a presença de apenas um alcalóide, trisphaeridina. Estes dados foram comprovados com CG/EM.
- Da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de bulbos foram isolados os alcalóides: Hipeastrina, Pretazetina e seu sal. Estas estruturas foram identificadas através de métodos cromatográficos e espectroscópicos.
- As avaliações das atividades *in vitro* demonstraram que os extratos e produtos isolados de *H. psittacinum* apresentaram potencial antioxidante, pelo método de redução do radical DPPH, e anticolinesterásico, pelo método de MARSTON e colaboradores (2002)
- Dos compostos isolados, apenas a montanina e a galantamina apresentaram inibição significativa da AChE pelo método de ELLMAN e colaboradores (1961). As concentrações que a montanina apresentou inibição foram 100 µm, 500 µm e 1 mM. Os alcalóides pretazetina e hipeastrina não apresentaram inibição da enzima.
- No paradigma de Reconhecimento de Objeto, a montanina, na dose 3 µg/µl, quando injetada via intrahipocampal imediatamente após o treino, melhora a consolidação da memória em um teste 24 horas após o treino. Sendo que, 7 dias após o treino, a sessão de teste revelou que montanina não causou efeito sobre retenção de memória.
- No paradigma da Esquina Inibitória, a montanina (3 µg/µl /lado), administrada imediatamente após o treino, melhora a retenção de memória 24 horas e 7 dias pós treino, mostrando que este alcalóide atua no hipocampo auxiliando na consolidação da memória.

- No paradigma do Labirinto Aquático de Morris, a montanina, administrada intrahipocampal na dose de 3 µg/µl/lado, demonstra melhora na consolidação da memória 24 horas após último treino, porém não auxilia na sua perdurabilidade até 7 dias após o treino.
- As tarefas Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto, indicam que a montanina não altera o estado de ansiedade e capacidade exploratória e locomotora dos ratos. Assim, os resultados obtidos nos paradigmas de Reconhecimento de Objeto, Esquiva Inibitória e Labirinto Aquático de Morris não foram prejudicados por um possível efeito adverso do composto testado.

Este trabalho contribui para a formação de um acervo de informações químicas e biológicas da espécie *Hippeastrum*, uma vez que muitas investigações ainda devem ser realizadas com este gênero. Os resultados obtidos com a montanina, isolada de *H. vitatum*, direcionam este alcalóide para estudos mais específicos quanto ao seu papel sobre a memória.







Os resultados obtidos levam às seguintes perspectivas de continuação deste trabalho:

- Coletar maior quantidade de *H. psittacinum* para o isolamento e identificação de compostos minoritários e investigação o perfil químico das partes aéreas;
- Realizar o ensaio anticolinesterásico proposto por ELLMAN e colaboradores (1961) com concentrações mais altas dos alcalóides pretazetina e hipeastrina;
- Realizar estudos quanto a estrutura e atividade da montanina para a obtenção de um composto mais ativo em menores concentrações;
- Investigar a relação entre a atividade da AChE e cognição em estudos *in vivo*.

**REFERÊNCIAS**

AGID, Y.; DUBOIS, B.; ANAND, R.; GHARABAW, G. Efficacy and tolerability of rivastigmine in patients with dementia of the Alzheimer type. **Current Therapeutic Research**, v. 59, 1998.

ANDRADE, J. P. **Análise química e biológica em alcalóides do gênero *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS, Porto Alegre, 2007.

ANGLE, S. R.; BOYCE, J. P. A stereoselective formal synthesis of (±)-(γ)-lycorane. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 35, p. 6185-6188, 1995.

BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. 2005, v.63. p.1099-4831.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. Artmed, 3 ed. Porto Alegre, p. 726, 2008.

BERKOV, S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Galanthus nivalis*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1791-1798, 2007.

BERKOV, S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. N-alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 2263-2266, 2008.

BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. **Behavioral Pharmacology**, v. 14, p. 649-52, 2003.

BOIT, H. G. Alkaloids of the Amaryllidaceae. VI. The alkaloids of *Nerine sarniensis*, *Crinum moorei*, *Hippeastrum vittatum* and *Clivia miniata*. **Chemical Beriche**, v. 87, p.1704-1707, 1954.

BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; ZINN, C.G.; KERR, D.S.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. **Hormones and Behavior**, v. 50, p. 308-13, 2006.

BOTHA, E.W.; KAHLER, C. P.; PLOOY, W. J.; PLOOY, S. H.; MATHIBE, L. Effect of *Boophone disticha* on human neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 385-388, 2005.

BREITNER, J. C.; GAU, B. A.; WELSH, K. A, PLASSMAN, B. L.; MCDONALD, W. M.; HELMS, M. J. Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initials results of a co-twin control study. *Neurology*, v. 44, p. 2073-2080, 1994.

BRUNETON, J. **Farmacognosia: Fitoquímica e Plantas Medicinales**. 2.ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001. p. 773-968.

CAMPBELL, W. E.; NAIR, J. J.; GAMMON, D. W.; BATISDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; SMITH, P. J.; ALBRECHT, C. F. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. **Planta Medica**, v. 64, p. 91-93, 1998.

CARLINI, E. A. Plants and the central nerbous system. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 75, p. 501-512, 2003.

CAVIN, A.; POTTERAT, O.; WOLFENDER, J.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W. Use of on-flow LC/1H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans and a tocopherol derivative. **Journal of Natural Product**, v. 61, p. 1497-1501, 1998.

CHATTOPADHYAY, S.; CHATTOPADHYAY, U.; MATHUR, P. P.; SAINI, K. S.; GHOSAL, S. Effects of hippadine, an Amaryllidaceae alkaloid on testicular function in rats. **Planta Médica**, v. 49, p. 252-254, 1983.

CHRISTODOULOU, C.; MELVILLE, P.; SCHERL, W. F.; MACALLISTER, W. S.; ELKINS, L. E.; KRUPP, L. B. Effects of donepezil on memory and cognition in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 245, p. 127-136, 2006.

CLARKE, J. R. Estudo sobre a participação dos receptores canabinóides hipocampais na retenção da memória de reconhecimento. 2008. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul/PUCRS, Porto Alegre, 2008.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

COYLE, J.; KERSHAW, P. Galanthamine, a cholinesterase inhibitor that allosterically modulates nicotinic receptors: effects on the course of Alzheimer's disease. **Society of Biological Psychiatry**, v. 49, p. 289-299, 2001.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFORD, H. T.; YEO, P. F. **The Families of the Monocotyledons: Structure, evolution and taxonomy**. Berlin: Springer-Verlag, 1985, p. 107-485.

DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 86, p. 100-106, 2006.

DOODY, R. S.; TARIOT, P. N.; PFEIFFER, E.; OLIND, J. T.; GRAHAM, S.; M. Meta-analysis of six-month memantine trials in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 3, p. 7-17, 2007.

DURI, Z.; SCOVILL, J. P.; HUGGINS, J. W. Activity of a methanolic Extract of Zimbabwean *Crinum macowanii* against exotic RNA Viruses *in vitro*. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 121-122, 1994.

DUTILH, J. H. A. **Investigações citotaxonômicas em populações brasileiras de *Hippeastrum* Herb.** 1987. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Campinas, 1987.

EICHHORN, J.; TAKATA, T.; KITA, Y.; ZENK, M. H. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1037-1047, 1998.

ELGORASHI, E. E.; DREWES, S. E.; MORRIS, C.; STADEN, J. Variation among three *Crinum* species in alkaloid content. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 601-615, 2003.

ELGORASHI, E.E.; STADEN, J. Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 27-32, 2004.

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

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. S.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.; VALE, F. A. C. Treatment of Alzheimer's disease. **Arquivo de Neuropsiquiatria**, v. 63, p. 1104-1112, 2005.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behavior Brain Research**, v. 31, p. 47-59, 1988.

ERKINJUNTTI, T. Treatment options: The latest evidence with galanthamine (Reminyl®). **Journal of Neurological Sciences**, p. 125-130, 2002.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; ABOU-DONIA, A. H.; TOUEMA, S. M.; HAMMODA, H. M.; SHAWKY, E.; MOTTA, A. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. **Phytochemistry**, v. 64, p. 2113-2118, 2004.

FARLOW, M. R.; CUMMINGS, J. L. Effective pharmacology management of Alzheimer's disease. **The American Journal of Medicine**, v. 120, p.388-397, 2007.

FENNELL, C. W.; STADEN, J. Crinum species in tradicional and modern medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 78, p. 15-26, 2001.

FORLENZA, O. V. Pharmacological treatment of Alzheimer's disease. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, p. 137-148, 2005.

FUNGATI, C. The Amaryllidaceae alkaloids. In: MANSKE, R. H. F. **The Alkaloids**. New York: Academic Press, 1975, p. 83-164.

GEETRS, H.; GUILLAUMAT, P. O.; GRANTHAM, C.; BODE, W.; ANCIAUX, K.; SACHAK, S. Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galanthamine and donepezil in rats, mice and rabbits. **Brain research**, v. 1033, p. 186-193, 2005.

GEISSMAN, T. A. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. São Francisco: Freeman, Cooper & Company, 1969.

GHOSAL, S.; KUMAR, Y.; SINGH, S. P. Glucosyloxy alkaloids from *Pancratium biflorum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1167-1171, 1984.

GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; RAZDAN, S. *Crinum* alkaloids: their chemistry and biology. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2141-2156, (review article number 10), 1985.

GIACOMINI, E.; SPIEGEL, R.; ENZ, A.; VEROFF, A.E.; CUTLER, N. R. Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebro-spinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. **Journal of Neural Transmission**, v.109, p. 1053-1065, 2002.

GIORDANI, R.B., PAGLIOSA, L.B., HENRIQUES, A.T., ZUANAZZI, J.A.S. Investigação do Potencial Antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Quimica Nova**, v. 31, 2042-2046, 2008.

HAKE, A. M. H. Use of cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer disease. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 68, n. 7, p. 608-616, 2001.

HARVEY, A. L. The pharmacology of galanthamine and its analogues. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 68, n. 1, p. 113-128, 1995.

HEINRICH, M.; TEOH, H. L. Galanthamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnofarmacology**, v. 92, p. 147-162, 2004.

HENCHMAN, R. H.; KAIHSU, T.; TONGUE, S.; MCCAMMAN, A. Properties of water molecules in the active site gorge of acetylcholinesterase from Compyter simulation. **Biophysical Journal**, v.82, p. 2671-2682, 2008.

HERRERA, M. R.; MACHOCHO, A. K.; NAIR, J. J.; CAMPBELL, B. R.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Cyrtanthus elatus*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 444-448, 2001.

HOFMANN JUNIOR, A. E.; SEBEN, C.; MONTANHA, J. A.; DUTILH, J.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Avaliação da atividade antiviral e determinação do perfil cromatográfico de *Hippeastrum glaucescens* (martius) Herbert (Amaryllidaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 7-14, 2004.



HOFMANN JUNIOR, A. E.; SEBEN C.; SOBRAL, M.; DUTILH, J. H. A.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Alkaloids of *Hippeastrum glaucescens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1455-1456, 2003.

HOFMANN JUNIOR, A. E. Análise química e biológica de alcalóides em *Hippeastrum glaucescens* (Martius) Herbert. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS, Porto Alegre, 2002.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y. In **Research in Amaryllidaceae**; Govil, S. Ed.; Studium Press: Houston, cap. 2, 2006.

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

HUNG, T.M., NA, M., DAT, N.T., NGOC, T.M., YOUN, U., KIM, H.J., MIN, B., LEE, J., BAE, K. Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschanimovii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 74-80, 2008.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JIA, P.; SHENG, R.; ZHANG, J.; FANG, L.; HE, Q.; YANG, B.; HU, Y. Design, synthesis and evaluation of galanthamine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. **European journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 772-784, 2009

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: São Paulo Editora, 1966. p. 211-590.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p.217-510.

KAIA, G. I.; UNVER, N.; GÖZLER, B.; BATISDA, J. (-)-Capnoidine and (+)-bulbocapnine from an Amaryllidaceae species, *Galanthus nivalis* subsp. *Cilicus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 1059-1062, 2004.

KAMETAMI, T.; HONDA, T. Aporphine alkaloids. In: BROSSI, A. **The Alkaloids**. Orlando: Academic Press, 1985, p. 153-251.

KERR, D.S.; BEVILAQUA, L.R.; BONINI, J.S.; ROSSATO, J.I.; KÖHLER, C.A.; MEDINA, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. **Psychopharmacology**, v. 179, p. 529-35, 2005.

KODAMA, S.; TAKITA, H.; KAJIMOTO, T.; NISHIDE, K.; NODE, M. Synthesis de Amaryllidaceae alkaloids, siculine, oxocrine, epicrine, and bufavine. **Tetrahedron Letters**, v.60, p. 4901-4907, 2004.

KOURIE, J. I. Mechanisms of amyloid  $\beta$  protein-induced modification of ion transport systems implications of neurodegenerative diseases. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 21, p. 972-976, 2001.

KREH, M.; MATUSCH, R.; WITTE, L. Capillary gas chromatography-massspectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. **Phytochemistry**, v.38, p. 773-776, 1995.

KRIVOY, A., WEIZMAN, A., LAOR, L.; HELLINGER, N.; ZEMISHLANY, Z.; FISCHER, T. Addition of memantine to antipsychotic treatment in schizophrenia in patients with residual symptoms: a preliminary study. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, p. 117-121, 2008.

LANE, R.M., POTKIN, S.G., ENZ, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. **International Journal Neuropsychopharmacology**, v. 9, p. 101-124, 2006.

LEES, G. V.; JONES, E. G. Expressive genes record memories. **Neurobiology of Disease**, v. 7, p. 533-536, 2000.

LENT, R.; **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. Atheneu. São Paulo, p. 589, 2005.

LEWIS, J. R. Amaryllidaceae and *Scelletium Alkaloids*. **Natural Product Reports**, v. 14, p. 107-110, 1997.

LEWIS, J. R. Amaryllidaceae alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 13, p. 303-308, 1996.

LEWIS, J. R. Amaryllidaceae and *Sceletium Alkaloids*. **Natural Product Reports**, v. 12, p. 171-176, 1994.

LIKHITWITAYAWUID, K. L.; ANGERHOFER, C. K.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.;CORDELL, G. A. Cytotoxic and antimalarial alkaloid from the bulbs of *Crinum amabile*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 8, p. 1331-1338, 1998.

LIN, L.; HU, S.; CHAI, H.; PENGSUPARP, T.; PEZUTO, J. M.; CORDELL, G. A.; RUANGRUNGSI, N. Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1295-1298, 1995.

LIPTON, S. A. Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurological disorders. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 6, p. 61-74, 2004.

LIU, J.; HU, W.; HE, L.; YE, M.; LI, Y. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. **FEBS Letters**, v. 578, p. 245-250, 2004.

LONGO, F. M.; MASSA, S. Neuroprotective strategies in Alzheimer's disease. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 1, p. 117-127, 2004.

LOPEZ, S.; BATISDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Sciences**, v. 71, p. 2521-2529, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa, 2002, p. 47-48.

LOUW, C. A. M.; REGNIER, T. J. C.; KORSTEN, L. Medicinal Bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in the control of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 147-154, 2002.

MACHOCHO, A. K.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BRUN, R.; CHHABRA, S.C. Augustamine type alkaloids from *Crinum Kirkii*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3146-3149, 2004.

MACLEAN, B. B. Phthalideisoquinoline alkaloids and related compounds. In: BROSSI, A. **The Alkaloids**. Orlando: Academic Press, 1985, p. 253-286.

MAELIKE, A.; SAMOCHOCKI, M.; JOSTOCK, R.; FEHRENBACHER, A.; LUDWING, J.; ALBUQUERQUE, E. X.; ZERLIN, M. Allosteric sensitization of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. **Biological Psychiatric**, v. 49, p.279-288, 2001.

MAGNUS, P.; BAILEY, J. M.; PORTER, M. Application of the  $\beta$ -azidation reaction to the enantioselective synthesis of the lycorane Amaryllidaceae alkaloids. **Tetrahedron**, v. 55, p. 13927-13936, 1999.

MANPADI, M.; KORNIENKO, A. Highly anti-selective conjugate addition of arylcuprates to a  $\gamma$ -alkoxy- $\alpha$ ,  $\beta$ -enoate. A new method to address stereochemical challenges presented by Amaryllidaceae alkaloids. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 4433-4437, 2005.

MARKMEE, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHYAWARAKORN, V.; INGKANINAN, K.; KHORANA, N. Isoquinoline derivatives as potential acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2170-2172, 2006.

MARTIN, S. F. The Amaryllidaceae alkaloids. In: BROSSI, A. **The Alkaloids**. San Diego: Academic Press, 1987. p. 251-376.

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

MICROMEDEX. Micromedex® Healthcare Series, 2009. Disponível em <http://www.thomsonhc.com>, acessado em 24/05/2009.

MULHOLLAND, D. A.; CROUCH, N.; DECKER, B.; SMITH, M.T. The isolation of the Amaryllidaceae alkaloid crinamine from *Dioscorea dregeana* (Dioscoreaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 183-185, 2002.

MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; MAL, M.; HOUGHTON, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**. v. 14, p. 289-300, 2007

NAIR, J. J.; CAMPBELL, W. E.; GAMMON, D. W.; ALBRECHT, C. F.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BATISDA, J. Alkaloids from *Crinum delagoenses*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2539-2543, 1998.

NAIR, J. J.; MACHOCHO, A. K.; CAMPBELL, W. E.; BRUN, R.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BATISDA, J. Alkaloids from *Crinum macowanii*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 945-950, 2000.

NAIR, J. J.; CAMPBELL, W. E.; BRUN, R.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BATISDA, J. Alkaloids from *Nerine filifolia*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 373-382, 2005.

PASSMORE, A. P.; BAYER, A.; THIESSEN-STEINHAGEN, E. A. Cognitive, global, and functional benefits of donepezil in Alzheimer's disease and vascular dementia: results from large-scale clinical trials. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 229-230, p. 141-146, 2005.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2<sup>a</sup> ed., Academic Press, San Diego, 1986.

PETTIT, G. R.; GADDAMIDI, V.; GOSWAMI, A.; CRAGG, G. Antineoplastic agents, 99. *Amaryllis belladonna*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 5, p. 796-801, 1984.

PETTIT, G. R.; GADDAMIDI, V.; HERALD, D. L.; SINGH, S. B.; CRAGG, G. M.; SCHIMIDT, J. M. Antineoplastic agents, 120. *Pancratium Littorale*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 6, p. 995-1002, 1986.

PÁKÁSKI, M.; KÁLMAN, J. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 53, p. 103-111, 2008.

PRICKARERTS, J.; STEINBUSCH, H. W. M.; SMITS, J. F. M.; DE VENTE, J. Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effects of 7-nitroindazole and zaprinast. **European Journal of Pharmacology**, v.337, p.125-136, 1997.

QUILLFELDT, J. A. **Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats**. In: Monica Levy Andersen. (Org.). Ethical and Practical Principles of Experimental Animal Use. 1a. ed.: v. 21, 2006.

RATNASOORIYA, W.D.; DERANIYALA, S. A.; BATHIGE, S. D. N. K.; HETTIARACHCHI, H. D. I. Leaf extract of *Crinum bulbispermum* has antinociceptive activity in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, p. 123-128, 2005.

REID, R. T.; SABBAGH, M. Effects of cholinesterase inhibitors on rat nicotinic receptor levels in vivo and in vitro. **Journal of Neural Transmission**, v. 115, p. 1437-1444, 2008.

RINNER, U.; HILLEBRENNER, H. L.; ADAMS, D. R.; HUDLICKY, T.; PETTIT, G. R. Synthesis and biological activity of some structural modifications of pancratistetin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 2911-2915, 2004.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 144-185.

RODRIGUES A. L. S.; ROCHA, J. B. T.; MELLO, C. F.; SOUZA, D. O. Effect of perinatal lead exposure on rat behavior in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacology Toxicology**, v. 79, p. 150-156, 1996.

ROTTKAMP, C. A.; NUNOMURA, A.; HIRAI, K.; SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Will antioxidants fulfill their expectations for the treatment of Alzheimer disease?. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 116, p. 169-179, 2000.

SAMUD, A. M.; ASMAWI, M. Z.; SHARMA, J. N.; YUSOF, A. P. M. Anti-inflammatory activity of *Crinum asiaticum* plant and its effect on bradykinin-induced contractions on isolated uterus. **Immunopharmacology**, v. 43, p. 311-316, 1999.

SANTOS, M. D.; ALKONDON, M.; PEREIRA, E. F. R.; ARACAVAL, Y.; EISENBERG, H. M.; MAELIKE, A.; ALBUQUERQUE, E. X. The nicotinic allosteric potentiation ligand galantamine facilitates synaptic transmission in the mammalian central nervous system. **Molecular Pharmacology**, v. 61, p. 1222-1234, 2002.

SEBBEN, C. **Investigação química e biológica em *Hypeastrum breviflorum* Herb. (Amaryllidaceae)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ UFRGS, Porto Alegre, 2005.

SHAH, R. S.; LEE, H.; XIONGWEI, Z.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; CASTELLANI, R. J. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 199-207, 2008.

SILVA, A. S. *Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcalóides isolados. 2005. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS, Porto Alegre, 2005.

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

VILADOMAT, F.; BATISDA, J.; CODINA, C.; CAMPBELL, W. E.; MATHEE, S. Alkaloids from *Boophane flava*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 307-311, 1995.

VILADOMAT, F.; ALMANZA, G. R.; CODINA, C.; BATISDA, J.; CAMPBELL, W. E.; MATHEE, S. Alkaloids from *Brunsvigia orientalis*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1379-1385, 1996.

WENK, G. L.; QUACK, G.; MOEBIUS, H.; DANYSZ, W. No interaction of memantine with acetylcholinesterase inhibitors approved for clinical use. **Life Sciences**, v. 66, p. 1078-1083, 2000.

WILDMAN, W. C. Alkaloids of the Amaryllidaceae. In: MANSKE, R. H. F. **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. New York: Academic Press INC., 1960, v.6, cap. 9, p. 289-412.

WILDMAN, W. C. Alkaloids of the Amaryllidaceae. IN: MANSKE, R. H. F. **The alkaloids Chemistry and Physiology**. New York: Academic Press INC., 1968. V. IX. Cap. 10, p. 304-404.

WILLIAMS, B. R.; NAZARIANS, A.; GIL, M. A. A review of rivastigmine: a reversible cholinesterase inhibitor. **Clinical therapeutics**, v. 25, p. 1634-1653, 2003.

WOODRUFF-PAK, D. S.; VOGEL III, R. W.; WENK, G. L. Galantamine: Effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. **Neurobiology**, v. 7(2), p. 217-227, 1997.









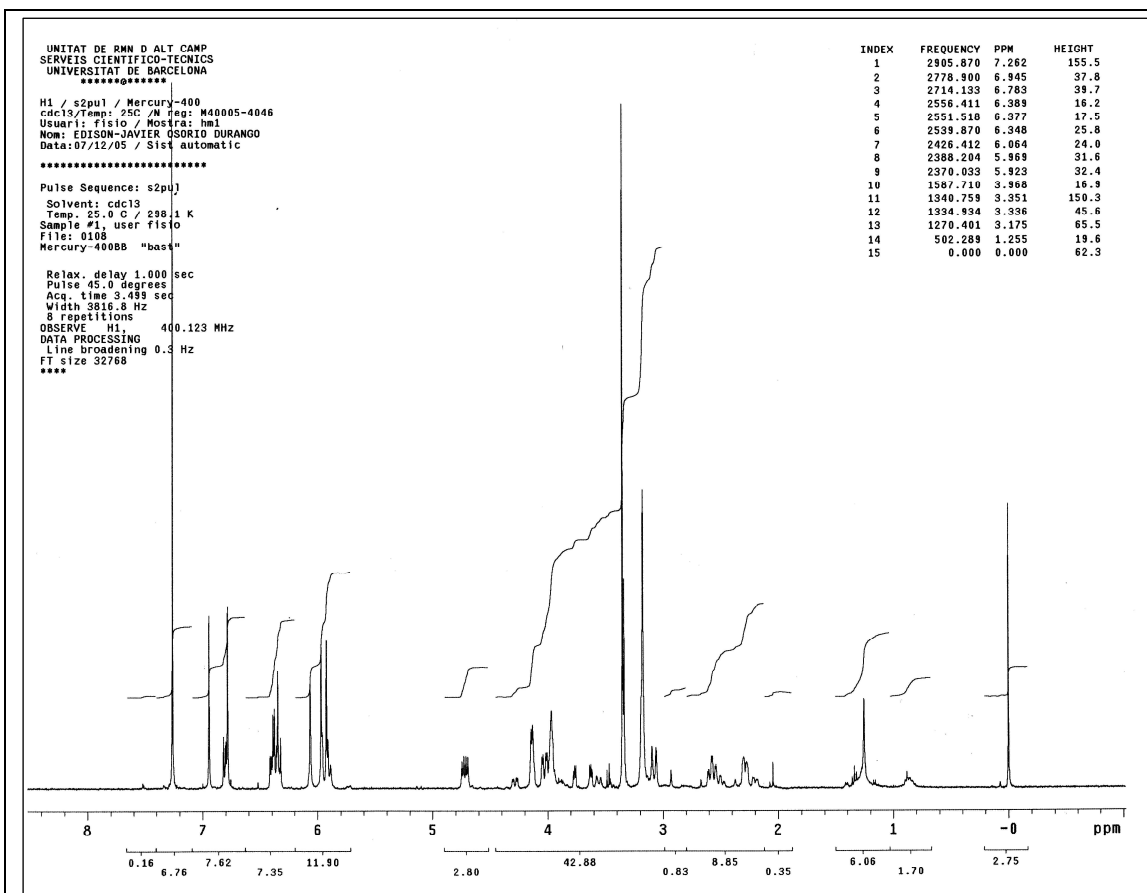
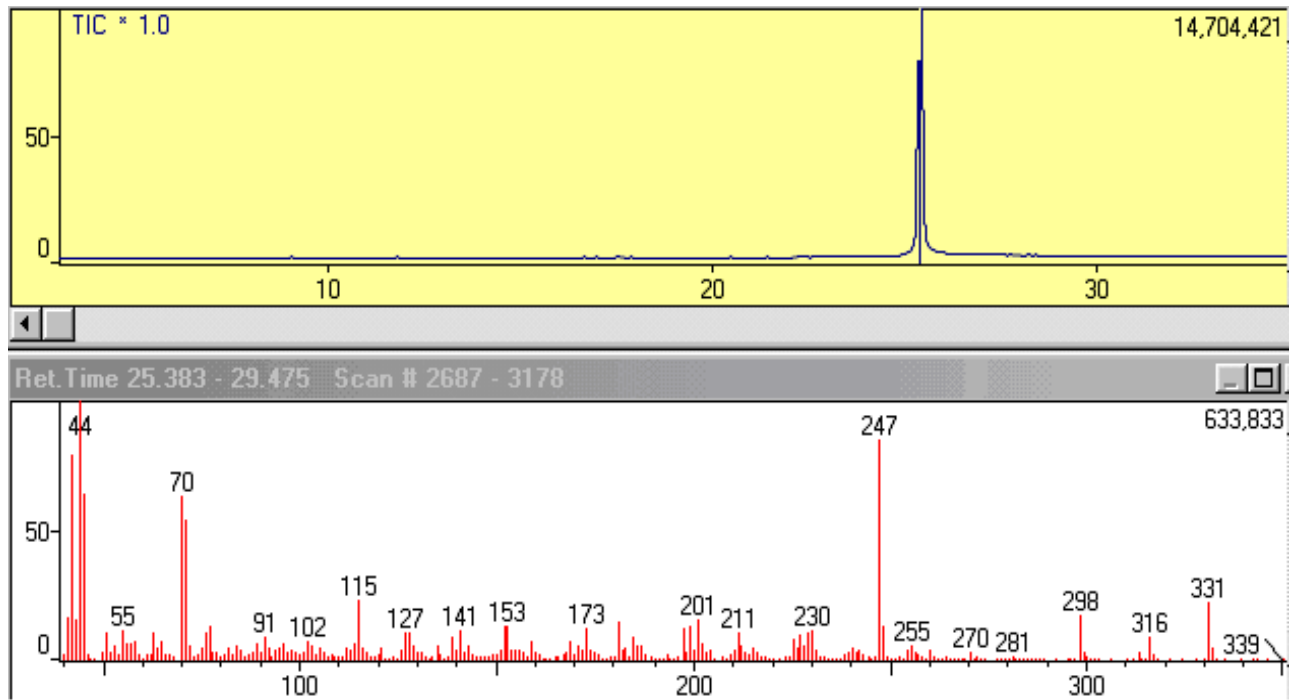
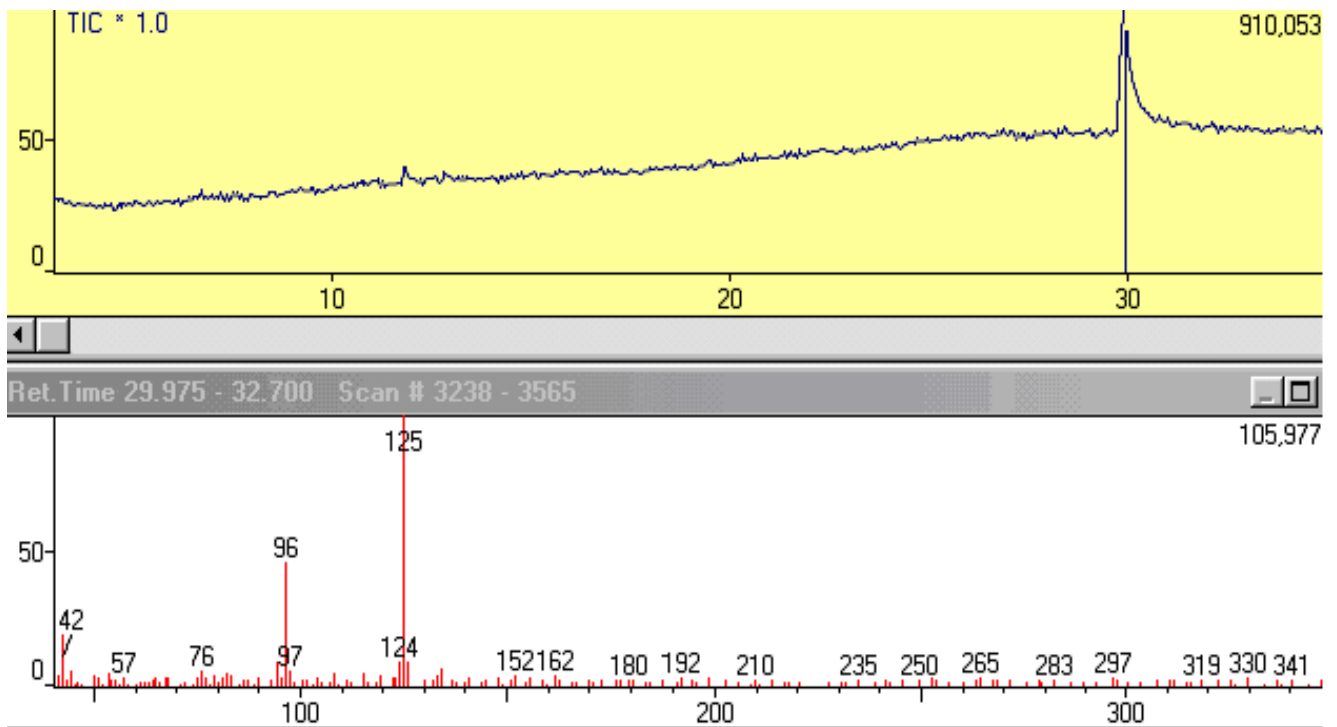


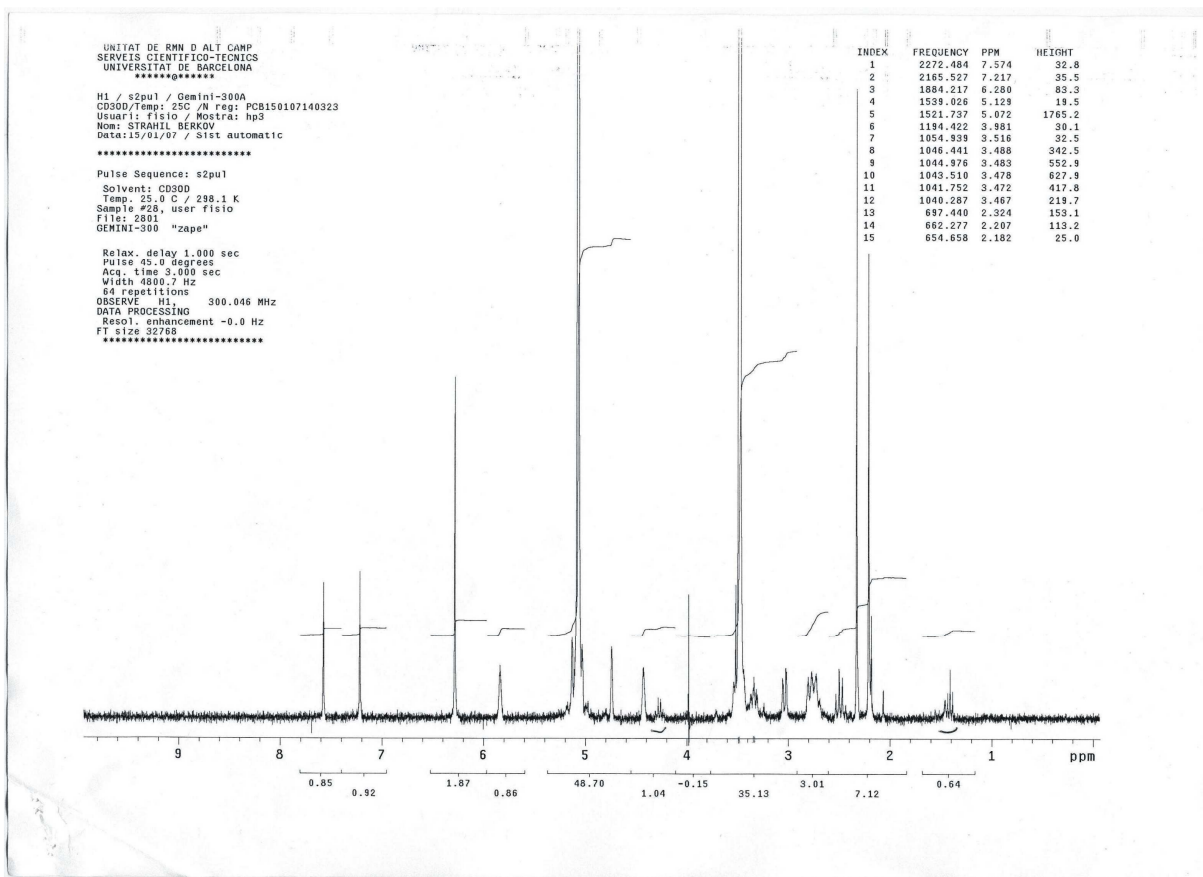
Figura 1: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton do composto HP1



**Figura 2:** Cromatograma e espectro de massas do alcalóide HP2



**Figura 3:** Cromatograma e espectro de massas do alcalóide HP3



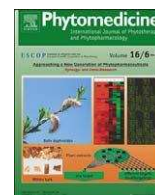
**Figura 4:** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton do composto HP3





Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: [www.elsevier.de/phymed](http://www.elsevier.de/phymed)

Short Communication

## Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity

L.B. Pagliosa<sup>a</sup>, S.C. Monteiro<sup>b</sup>, K.B. Silva<sup>a</sup>, J.P. de Andrade<sup>a,c,1</sup>, J. Dutilh<sup>d</sup>, J. Bastida<sup>c</sup>, M. Cammarota<sup>b</sup>, J.A.S. Zuanazzi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, Andar 2, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>d</sup> Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato 255, 13083-862 Campinas, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Acetylcholinesterase  
Amaryllidaceae alkaloids  
Ellman

## ABSTRACT

The treatment of neurological disorders and neurodegenerative diseases is related to the levels of acetylcholine (ACh) through the inhibition of acetylcholinesterase (AChE). Galanthamine, an important alkaloid isolated from the Amaryllidaceae family, is approved for the pharmacological treatment of Alzheimer's disease (AD) and acts by inhibiting the acetylcholinesterase (AChE) activity. In the present study, Ellman's method was used to verify the inhibition of AChE activity of some isoquinolines alkaloids such as galanthamine, montanine, hippeastrine and pretazettine. At the concentrations 1 mM, 500  $\mu$ M and 100  $\mu$ M, galanthamine presented an AChE inhibition higher than 90%. Montanine inhibited, in a dose-dependent manner, more than 50% of the enzyme at 1 mM concentration. With the concentrations 500  $\mu$ M and 100  $\mu$ M, 30–45% of AChE activity inhibition was detected. The alkaloids hippeastrine and pretazettine presented no significant inhibition of the AChE activity. The results demonstrate that montanine significantly inhibits AChE activity at the tested concentrations, suggesting the necessity of further investigations on this alkaloid use in treating neurological disorders.

© 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## Introduction

The structures elucidation, the strategies and developed methodology to synthesize Amaryllidaceae alkaloids have been motivated by their diverse and important pharmacological properties (Magnus et al. 1999), including activities such as anticancer, antiviral, immunostimulatory, antimalarial, and acetylcholinesterase (AChE) inhibition (Manpadi and Kornienko 2005). The varied activities assigned to Amaryllidaceae alkaloids and the degree of these alkaloids biological responses may be related to their biosynthetic origin, where the alkaloid norbelladine suffers conversion into *O*-methylnorbelladine through three different oxidative coupling (*ortho-para'*, *para-para'*, *para-ortho'*), resulting in alkaloids of different skeleton types with different biological features possible (Bastida et al. 2006).

Alzheimer's disease (AD) is a fairly common age-related neurodegenerative disease with many cognitive and neuropsychiatric manifestations that result in progressive disability and

eventual incapacitation (Hung et al. 2008). This disease is characterized by a loss of cholinergic neurons in the brain and is associated with decreased levels of acetylcholine (ACh) (Lane et al. 2006). The enzymes AChE and butyrylcholinesterase (BuChE) seem to be simultaneously active in the synaptic hydrolysis of ACh (Lane et al. 2006). AChE contributes to the integrity and permeability of the synaptic membrane during neurotransmission (Grafius et al. 1971). This enzyme has been implicated in cholinergic and non-cholinergic actions, which may play a role in neurodegenerative diseases (Henderson et al. 1996; Cummings 2000; Arendt et al. 1992). Inhibition of AChE is considered a strategy for the treatment of neurological disorders. A potential source of AChE inhibitors is certainly provided by the abundance of plants in nature (Mukherjee et al. 2007). In this context, reversible inhibitors of this enzyme have been used as cognitive enhancers in treatment of patients with Alzheimer's and other neurodegenerative disorders (Lane et al. 2006).

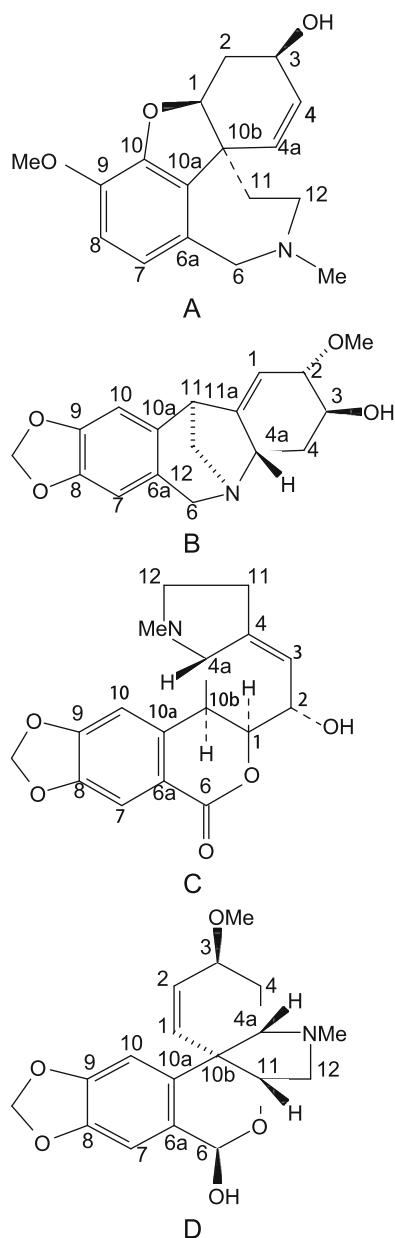
In traditional practices, numerous plants have been used to treat neurodegenerative diseases and different neuropharmacological disorders. Ethnopharmacological approach and bioassay-guided isolation have provided a lead in identifying potential AChE inhibitors from plant sources, including those used for memory dysfunctions (Mukherjee et al. 2007).

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 33085258.

E-mail address: [zuanazzi@farmacia.ufrgs.br](mailto:zuanazzi@farmacia.ufrgs.br) (J.A.S. Zuanazzi).

<sup>1</sup> Becario del MAEC – AECID.





**Fig. 1.** Chemical structures of galanthamine (A), montanine (B), hippeastrine (C) and pretazettine (D).

The alkaloid galanthamine (Fig. 1), obtained from *Galanthus* and *Narcissus* species (Amaryllidaceae), has a dibenzofuran nucleus and is biosynthetically obtained by *para-ortho'* oxidative coupling (Bastida et al. 2006). Currently this selective, reversible and competitive AChE inhibitor is commercialized to treat AD (Berkov et al. 2008). Montanine (*para-para'*), hippeastrine (*ortho-para'*), and pretazettine (*para-para'*) (Fig. 1) are isoquinoline alkaloids isolated from different species of Amaryllidaceae. Preliminary investigations carried out by our research group with montanine reported significant antitumor activity of this alkaloid for some cell lines (Silva et al. 2008), in addition to psychopharmacological activities including anxiolytic, antidepressive and anticonvulsive effects when intraperitoneally administered (i.p.) (Silva et al. 2006). In the investigation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) signaling pathway, using hippocampal slices treated with montanine and galanthamine, an increase of phosphorylation of MAPKs and CREB factor transcription was observed, indicating the possible

role of these alkaloids in the mechanisms related to the memory formation (Silva 2005).

Considering that montanine, hippeastrine, and pretazettine are isoquinolinic alkaloids similar to galanthamine which has been used to AD treatment, and that previous studies of our group demonstrated an increase of MAPKs and CREB phosphorylation in hippocampal slices treated with montanine, we decided to investigate the influence of the alkaloids montanine, hippeastrine, and pretazettine on the *in vitro* AChE activity, an important enzyme related to memory mechanisms.

## Material and methods

### General and materials

EIMS were obtained on CG-MS Hewlett-Packard 6890+MSD 5975 operating in EI mode at 70 eV.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Varian INOVA 500 MHz NMR spectrometer operating at 500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 for  $^{13}\text{C}$  nuclei, respectively. Solvent peaks were used as a reference standard. For chromatographic procedures, silica gel PF 254 and silica gel 230–400 mesh or 60–230 mesh (Merck) were used. All other chemicals were purchased from SigmaChemical Co., St. Louis, MO, USA.

### Plant material

*H. psittacinum* was collected in Atibaia, São Paulo, Brazil, where a voucher specimen is deposited under the number UEC-143513. *H. vittatum* was collected in the South of Brazil (Silva et al. 2008).

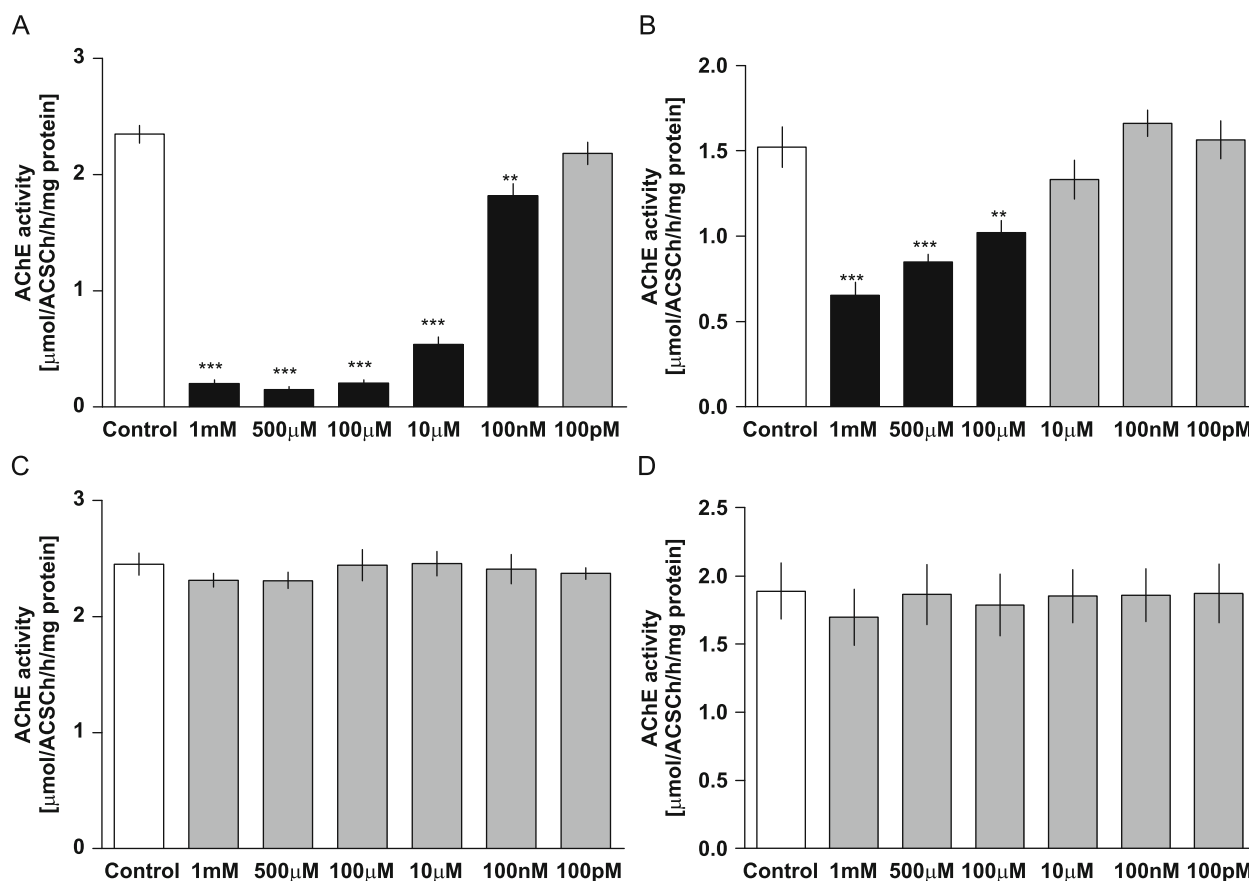
### Extraction and isolation of alkaloids

Fresh bulbs (3.37 kg) of *H. psittacinum* were triturated and macerated with EtOH. The procedure was repeated until negative test against Bertrand reagent. The EtOH extracts were dried under vacuum, and the residue was partitioned in light petroleum and HCl (10%). The HCl phases were washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The remaining acid phase was basified with  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH 9) and the extract with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The residue obtained by drying under vacuum yielded 3.78 g of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extracts. 1.6 g of this extract was submitted to silica gel (60–220 mesh) vacuum liquid chromatography using different solvents in increasing order of polarity (hexane, ethyl ether, dichloromethane, *n*-butanol, ethyl acetate, acetone and methanol) to afford seven fractions. The *n*-butanol and ethyl acetate fractions provided a pure product, pretazettine (70 mg), and the methanol fraction afforded hippeastrine (115 mg). These alkaloids were identified by spectroscopic methods and are in agreement with those reported in the literature (Zhang et al. 2006; Evidente et al. 2004).

The isolation and identification of the alkaloid montanine employed in this work was described by Silva et al. (2006). The isolation of galanthamine was performed through an acid-base extraction of galanthamine commercial tablets (Remynil<sup>®</sup>).

### AChE activity

Rats were killed at the age of 90 days. Their brains were removed and the hippocampus was dissected out. AChE activity was determined using a standard spectrophotometric method according to Ellman et al. (1961) and modified by Lassiter et al. (2003). Hydrolysis rates were measured at an acetylthiocholine concentration of 0.8 mM in 1 ml assay solutions with 30 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic Acid) (DTNB) at 25 °C. About 50 ml of rat hippocampus supernatant was added to the reaction mixture and preincubated



**Fig. 2.** *In vitro* effect of the alkaloids galanthamine (A), montanine (B), hippeastrine (C) and pretazettine (D) on AChE activity from hippocampus of adult wistar rats. Results are expressed as mean±S.E. for five independent experiments performed in duplicate. \*\*\* $p < 0.001$  and \*\* $p < 0.01$  compared to control (Dunnett's Multiple Range Test).

for 3 min. The hydrolysis was monitored by formation of the thiolate dianion of DTNB at 412 nm for 3 min with 30 s intervals. Specific enzyme activity was expressed as  $\mu\text{mol ASCh}$  per hour per mg of protein. All samples were run in duplicate. The alkaloids montanine, hippeastrine, pretazettine and galanthamine were added to the experimental assays at the range of 1 mM, 500  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100 nM, and 100 pM. Control did not contain alkaloids in the incubation medium.

#### Protein determination

Protein determination was performed by the method of Bradford (1976) using bovine albumin serum as standard.

#### Statistical analysis

All assays were performed in duplicate and the mean was used for statistical analysis. Data were analyzed by ANOVA followed by the Duncan multiple range test when the  $F$  test was significant. Pearson linear regression coupled to ANOVA was also used to verify dose-dependent effects. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

#### Results

The alkaloids obtained in the crystalline form by vacuum liquid chromatography were submitted to CG-MS analyses. The resulting products of *n*-butanol/ethyl acetate and methanol fractions

presented fragmentation pattern in mass spectra of the alkaloids pretazettine ( $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ ,  $m/z=331$  [ $\text{M}^+$ ]) and hippeastrine ( $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ ,  $m/z=315$  [ $\text{M}^+$ ]), respectively, when compared with the literature data (Zhang et al. 2006; Evidente et al. 2004). Spectroscopic analyses by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR confirmed these hypotheses.

Fig. 2 shows the percentage of inhibition of the alkaloids galanthamine (A), montanine (B), hippeastrine (C), and pretazettine (D) compared to control. The Fig. 2A shows that the galanthamine displayed more than 90% inhibition of AChE ( $F(6,35)=215.5$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) at concentrations 1 mM, 500  $\mu\text{M}$ , and 100  $\mu\text{M}$ . As can be seen in Fig. 2B, the montanine inhibited in a dose-dependent manner more than 50% of the enzyme ( $F(6,35)=18.34$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) at 1 mM concentration, and at the concentrations 500  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  the inhibition was in the range of 30–45%. The Figs. 2C and D displayed that hippeastrine and pretazettine, respectively, showed no significant inhibition of the AChE.

#### Discussion

Amaryllidaceae alkaloids represent a kind of phenylalanine and tyrosine derivatives restricted to Amaryllidaceae family only. These compounds exhibited several types of pharmacological activities including on central-nervous system (Mroczek and Mazurek 2009). Synthetic medicines, such as tacrine and donepezil, are used for treatment of cognitive dysfunction and memory loss associated with AD. However, some compounds have been reported to have adverse effects including gastrointestinal disturbances and problems with bioavailability (Oh

et al. 2004; Schulz 2003). After the discovery that the alkaloid galanthamine is a potent acetylcholinesterase inhibitor and, consequently, very important for the symptomatic treatment of AD (Liu et al. 2004), the isolation and characterization of alkaloids from Amaryllidaceae has exponentially increased with the interest in finding better AChE inhibitors from natural resources.

It has been reported that the damage caused by reactive oxygen species is considered a contributing factor to several diseases including AD (Giordani et al. 2008). In this context, a recently study showed that the treatment with vitamins E plus C significantly reversed the action of ovariectomy on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and AChE activities in hippocampus of female adult rats (Monteiro et al. 2007). A preliminary study of our group demonstrated a promising antioxidant and anticholinesterase activity of three *Hippeastrum* species (Amaryllidaceae) by bioautography method (Giordani et al. 2008).

In this work, the activity of four isoquinoline alkaloids isolated from *Hippeastrum* species was investigated through the assay of AChE activity developed by Ellman et al. (1961). The pretazettine and hippeastrine, alkaloids isolated from *Hippeastrum psittacinum*, did not show anticholinesterase activity by the proposed method.

The alkaloid montanine significantly inhibited AChE activity at concentrations 1 mM, 500  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  by the method from Ellman et al. (1961). In previous investigations, this alkaloid also showed inhibitory activity of AChE by bioautography method (Silva, 2005). Although montanine has decreased the AChE activity at higher concentrations than galanthamine, this alkaloid requires further investigations regarding its structure-activity relationship, interaction with AChE, as well as investigations that relate the AChE activity and cognition at *in vivo* memory studies.

The interest in products for AD treatment, providing desired therapeutic effects and less adverse effects, is based on studies that showed that galanthamine is a less potent alkaloid than physostigmine and tacrine, yet less toxic (Mary et al. 1998). A variety of synthetic galanthamine derivatives has been previously described including C-ring derivatives (Han et al. 1992), quaternary ammonium derivatives (Han et al. 1992), or other carbamates of 6-O-demethylgalanthamine (Bores and Kosley 1996), which have been more active than galanthamine (Jia et al. 2009).

Considerable research efforts have been devoted to elucidate the molecular, biochemical, and cellular mechanisms of AD in the past decades (Sheng et al. 2009). Our results with montanine can contribute to the research of alternative products for the treatment of neurological disorders as well as neurodegenerative diseases. Therefore, further investigations on the structure of montanine may result in a more active compound, at lower concentrations.

## Acknowledgments

This investigation was supported by grants of CAPES, FAPERGS and CNPq (Brazil). J.A.S.Z. acknowledge CNPq for researcher fellowship.

## References

- Arendt, T., Bruckner, M.K., Lange, M., Bigl, V., 1992. Chances in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development a study of molecular forms. *Neurochem. Int.* 21, 381–396.
- Bastida, J., Lavilla, R., Viladomat, F., 2006. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In: Cordell, G.A. (Ed.), *The Alkaloids, Chemistry and Biology*, Vol. 63. Elsevier Academic Press, New York, pp. 87–179.
- Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J., 2008. *N*-alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 115, 2263–2266.
- Bores, G.M., Kosley Jr, R.W., 1996. *Drugs Future* 21, 621–635.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cummings, J.L., 2000. The role of cholinergic agents in the management of behavioral disturbances in Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol.* 3, 21–29.
- Ellman, G.L., Courtney, D.K., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Evidente, A., Andolfi, A., Abou-Donia, A.H., Touema, S.M., Hammada, H.M., Shawky, E., Motta, A., 2004. Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry.* 64, 2113–2118.
- Giordani, R.B., Pagliosa, L.B., Henriques, A.T., Zuanazzi, J.A.S., 2008. Investigação do Potencial Antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Quim. Nova* 31, 2042–2046.
- Graffius, M.A., Bond, H.E., Millar, D.B., 1971. Acetylcholinesterase interaction with a lipoprotein matrix. *Eur. J. Biochem.* 22, 382–390.
- Han, S.Y., Sweeney, J.E., Bachaman, E.S., Schweiger, E.J., Forloni, G., Coyle, J.T., Davis, B.M., Joulili , M.M., 1992. Chemical and pharmacological characterization of galanthamine, and acetylcholinesterase inhibitor, and its derivatives. A potential application in Alzheimer's disease?. *Eur. J. Med. Chem.* 27, 673–687.
- Henderson, V.W., Watt, L., Buckwalter, J.G., 1996. Cognitive skills associated with estrogen replacement in women with Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology* 21, 421–430.
- Hung, T.M., Na, M., Dat, N.T., Ngoc, T.M., Youn, U., Kim, H.J., Min, B., Lee, J., Bae, K., 2008. Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschanimovii*. *J. Ethnopharmacol.* 119, 74–80.
- Jia, P., Sheng, R., Zhang, J., Fang, L., He, Q., Yang, B., Hu, Y., 2009. Design, synthesis and evaluation of galanthamine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 772–784.
- Lane, R.M., Potkin, S.G., Enz, A., 2006. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 9, 101–124.
- Lassiter, T.L., Marshall, R.S., Jackson, L.C., Hunter, D.L., Vu, J.T., Padilla, S., 2003. Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. *Toxicology* 186, 241–253.
- Liu, J., Hu, W.X., He, L.F., Ye, M., Li, Y., 2004. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *FEBS Lett.* 578, 245–250.
- Magnus, P., Bailey, J.M., Porter, M., 1999. Application of the  $\beta$ -azidation reaction to the enantioselective synthesis of the lycorane Amaryllidaceae alkaloids. *Tetrahedron* 55, 13927–13936.
- Manpadi, M., Kornienko, A., 2005. Highly anti-selective conjugate addition of arylcuprates to a  $\gamma$ -alkoxy- $\alpha$ ,  $\beta$ -enoate. A new method to address stereochemical challenges presented by Amaryllidaceae alkaloids. *Tetrahedron Lett.* 46, 4433–4437.
- Mary, A., Renko, D.Z., Guillou, C., Thal, C., 1998. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, and structure-activity relationships of bis-interacting ligands in the galanthamine series. *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1835–1850.
- Monteiro, S.C., Mattos, C.B., Scherer, E.B.S., Wyse, A.T.S., 2007. Supplementation with vitamins E plus C or soy isoflavones in ovariectomized rats: effect on the activities of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and cholinesterases. *Metab. Brain Dis.* 22, 156–171.
- Mroczek, T., Mazurek, J., 2009. Pressurized liquid extraction and anticholinesterase activity-based thin-layer chromatography with bioautography of Amaryllidaceae alkaloids. *Anal. Chim. Acta* 633, 188–196.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J., 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14, 289–300.
- Oh, M.H., Houghton, P.J., Whang, W.K., Cho, J.H., 2004. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. *Phytomedicine* 11, 544–548.
- Sheng, R., Xu, Y., Hu, C., Zhang, J., Lin, X., Li, J., Yang, B., He, Q., Hu, Y., 2009. Design synthesis and AChE inhibitory activity of indanone and aurone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 7–17.
- Schulz, V., 2003. Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: What clinical trials and guidelines fail to consider. *Phytomedicine* 10, 74–79.
- Silva, A.F.S., Andrade, J.P., Machado, K.R.B., Rocha, A.B., Apel, M.A., Sobral, M.E.G., Henriques, A.T., Zuanazzi, J.A.S., 2008. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine* 15, 882–885.
- Silva, A.F.S., Andrade, J.P., Bevilaqua, L.R.M., Souza, M.M., Izquierdo, I., Henriques, A.T., Zuanazzi, J.A.S., 2006. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85, 148–154.
- Silva, A.F.S., 2005. *Hippeastrum vittatum* (L'H er) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avalia o biológica dos alcalóides isolados (*Hippeastrum vittatum* (L'H er) Herbert and *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: chemical analysis and biological evaluation of the isolated alkaloids). Thesis (Ph.D.). Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Brazil.
- Zhang, F., Tu, Y., Liu, J., Fan, X., Shi, L., Hu, X., Wang, S., Zhang, Y., 2006. A general approach to crinine-type of ( $\pm$ )-haemanthidine, ( $\pm$ )-pretazettine, ( $\pm$ )-tazettine and ( $\pm$ )-crinamine. *Tetrahedron* 62, 9446–9455.



**PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO**

- Giordani, R. B.; Pagliosa, L. B.; Henriques, A. T.; Zuanazzi, J. A. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 2042-2046, 2008.

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**





**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CARTA DE APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

**Número :** 2007894

**Título :** Análise Química e Biológica de Alcalóides em *Hippeastrum psittacinum*

**Pesquisador (es) :**

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
JOSE ANGELO SILVEIRA ZUANAZZI	PESQ RESPONSÁVEL	zuanazzi@farmacia.ufrgs.br	33085313
KELLY BUENO DA SILVA	PESQUISADOR	kellybueno@gmail.com	
LETÍCIA BALVEDI PAGLIOSA	PESQUISADOR	leticiapagliosa@yahoo.com.br	
MARTIN PABLO CAMMAROTA	PESQUISADOR	mcammaro@terra.com.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 36 , ata nº 116 , de 2/10/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

**Porto Alegre, quinta-feira, 2 de outubro de 2008**

**ILMA SIMONI BRUM DA SILVA**  
Coordenador do CEP-UFRGS