

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Estudo Cinético da Atividade Anticolinesterásica de Derivados β -
carbolínicos do Produto Natural Harmana**

Juliana Mariano Torres

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO CINÉTICO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA
DE DERIVADOS β -CARBOLÍNICOS DO PRODUTO NATURAL
HARMANA**

JULIANA MARIANO TORRES

Sob Orientação do Professor

Dr. Victor Marcos Rumjanek

Co-Orientação do Professor

Dr. Arthur Eugen Kümmerle

Dissertação submetida como requisito Parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Química Área de concentração Química Orgânica.

Seropédica, RJ

Julho de 2011

362.196831

T693e Torres, Juliana Mariano, 1983-.

T Estudo cinético da atividade anticolinesterásica de derivados β -Carbolínicos do produto natural harmana / Juliana Mariano Torres - 2011.

97 f.: il.

Orientador: Victor Marcos Rumjanek.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 66-79.

1. Alzheimer, Doença de - Teses. 2. Alzheimer, Doença de - Tratamento - Teses. 3. Colinesterases - Teses. 4. Cinética enzimática - Teses. I. Rumjanek, Victor Marcos, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

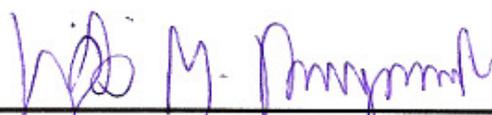
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JULIANA MARIANO TORRES

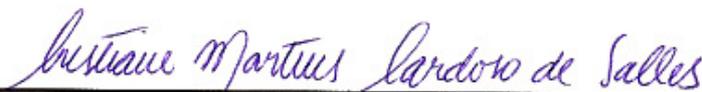
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, Área de concentração Química Orgânica.



Prof. Dr. Victor M. Rumjanek (DEQUIM-ICE-UFRRJ)
Orientador e presidente



Dr. Jochen Junker (CDTS-FIOCRUZ)



Profa. Dra. Crisiane Martins Cardoso de Sales (DEQUIM-ICE-UFRRJ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *DEUS*, o autor da minha vida, por ter me guardado, me abençoado e cumprido, em mim, os seus propósitos.

Aos melhores pais do mundo, os meus, Irani e Nair, pela constante demonstração de amor, pela confiança, oportunidade e todo o apoio de que sempre precisei, amo muito vocês.

Às minhas irmãs, Catiene por ser um exemplo de coragem e garra em enfrentar desafios e, Luciene por compartilhar conhecimentos e experiências em tantas coisas, pelos conselhos e força.

Ao meu orientador Dr. Victor Marcos Rumjanek pela dedicação e confiança que depositou em mim ao longo destes dois anos.

Aos professores, Carlos Mauricio, Arthur, Rosane, João Batista, e Mario Geraldo pelo conhecimento adquirido durante todo o meu curso de pós-graduação em química que me tornou o que sou hoje.

A Aline Figueira pelos primeiros passos dentro do laboratório, pelas inúmeras ajudas, por todos os conselhos, enfim, por todos os momentos alegres e divertidos compartilhados.

Ao amigo Diego, por ser um exemplo pra mim.

Às alunas de Iniciação Científica Daiana Portella e Marcela Amistá, pela ajuda na realização deste trabalho e pela amizade. Aprendi e aprendo muito com vocês.

Aos amigos Natália, Naza, Kely, Charlaine, Junior, Luciana, Aline, Jaqueline, Gisele, Amanda, Daniele, Rodrigo e Vinicius por terem compartilhado comigo todos os momentos de conquistas, frustração e cansaço. E acima de tudo por entenderem esse meu sentimento.

Aos amigos da turma de mestrado, por terem dividido comigo as alegrias e aflições do período de mestrado, pelo convívio, pelas conversas e amizade.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela disponibilidade para a concretização deste trabalho.

Ao CNPq por fornecer a bolsa.

A todas as pessoas que verdadeiramente torceram por mim, me incentivaram e hoje comemoram comigo esta conquista.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

Torres, Juliana Mariano. **ESTUDO CINÉTICO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DE DERIVADOS β -CARBOLÍNICOS DO PRODUTO NATURAL HARMANA**. 2011. Dissertação (mestrado em Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O aumento da expectativa de vida é um fenômeno mundial que mostra o relativo sucesso de políticas de saúde pública, e o Brasil se inclui entre os países em que as pessoas estão vivendo por mais tempo e em condições melhores de saúde. No entanto, o aumento da expectativa de vida tem como efeito negativo o aparecimento de doenças degenerativas, típicas de idades mais avançadas, incluindo-se as várias formas de demência e entre estas, a mais importante é, sem dúvida, a Doença de Alzheimer (DA), patologia irreversível e progressiva caracterizada pela deterioração neuronal que resulta em perda de funções cognitivas, tais como memória, capacidade de comunicação, julgamento e raciocínio. Para o tratamento da DA são utilizados fármacos como o donepezil, galantamina e rivastigmina, os quais agem inibindo reversivelmente a acetilcolinesterase (AChE). Evidências sugerem que a enzima butirilcolinesterase (BChE), intimamente relacionada com a AChE, tem um papel significativo na DA, uma vez que está envolvida em funções neurais tais como a correção da neurotransmissão colinérgica e não-colinérgica. Esta pesquisa pretendeu estudar novas substâncias com ação anticolinesterásica utilizando derivados β -carbolínicos do produto natural harmana, bem como fazer um estudo cinético a fim de descobrir qual o perfil de inibição das enzimas AChE e BChE, a fim de buscar novos compostos que poderiam ser úteis no tratamento dos sintomas da DA. Desta forma, foi efetuada preliminarmente uma triagem com 7 derivados β -carbolínicos e posteriormente foi realizada uma investigação cinética com estes compostos, uma vez que, todos apresentaram alta ação anticolinesterásica tanto para AChE quanto para BChE. A cinética enzimática foi estudada segundo o método de Ellman. Contudo, observou-se que todos os 7 derivados apresentaram uma inibição reversível não competitiva.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Alzheimer, β -carbolínicos, colinesterases, cinética enzimática.

ABSTRACT

The increase in life expectancy is a worldwide occurrence that shows the relative success of public health politics, and Brazil is among the countries where people are living longer and in better physical health. But the increase in life expectancy has a negative effect: the appearance of degenerative diseases typical of old age, including several forms of dementia, like Alzheimer's Disease (AD) that is certainly the most important. It is an irreversible and progressive disease characterized by neuronal deterioration that results in loss of cognitive functions such as memory, communication skills, judgment and reasoning. Donepezil, rivastigmine and galantamine are medicines used for the treatment of AD and act reversibly inhibiting the acetylcholinesterase (AChE). Evidences suggest that the enzyme butyrylcholinesterase (BChE), closely related to AChE, plays a significant role in AD because it is involved in neural functions such as cholinergic co-regulation and non-cholinergic neurotransmission. The aim of this research is to provide new substances with anticholinesterase action by using β -carboline derivatives from the natural product harmane and carry out a kinetic study to determine the inhibition profile of the enzymes AChE e BChE, which could help in the discovery of new compounds which could be useful in the treatment of AD. Firstly, a screening was carried out with seven β -carboline derivatives. In a second stage, a kinetic investigation, employing Ellman's method, was run with these compounds and all of them presented high anticholinesterase action for both AChE and BChE. All seven derivatives presented a non-competitive reversible inhibition.

Keywords: Alzheimer's disease, β -carboline, cholinesterase, enzyme kinetics.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Valores de absorvâncias e concentrações do composto 3 utilizados para o cálculo do percentual de inibição da AChE com os respectivos desvios padrões (dp*)	35
Tabela 2: Percentual de inibição de AChE pelo composto 3 e seus respectivos desvios padrões	37
Tabela 3: Percentual de inibição de AChE pelo composto 1 e seus respectivos desvios padrões	37
Tabela 4: Percentual de inibição de AChE pela fisostigmina e seus respectivos desvios padrões	38
Tabela 5: Percentual de inibição de AChE pelo composto 2 e seus respectivos desvios padrões	38
Tabela 6: Percentual de inibição de AChE pelo composto 4 e seus respectivos desvios padrões	38
Tabela 7: Percentual de inibição de AChE pelo composto 5 e seus respectivos desvios padrões	39
Tabela 8: Percentual de inibição de AChE pelo composto 6 e seus respectivos desvios padrões	39
Tabela 9: Percentual de inibição de AChE pelo composto 7 e seus respectivos desvios padrões	39
Tabela 10: Percentual de inibição de AChE pelo composto 8 e seus respectivos desvios padrões	40
Tabela 11: Percentual de inibição de BChE pelo composto 1 e seus respectivos desvios padrões	44
Tabela 12: Percentual de inibição de BChE pelo composto 2 e seus respectivos desvios padrões	44

Tabela 13: Percentual de inibição de BChE pelo composto 3 e seus respectivos desvios padrões	45
Tabela 14: Percentual de inibição de BChE pelo composto 4 e seus respectivos desvios padrões	45
Tabela 15: Percentual de inibição de BChE pelo composto 5 e seus respectivos desvios padrões	45
Tabela 16: Percentual de inibição de BChE pelo composto 6 e seus respectivos desvios padrões	46
Tabela 17: Percentual de inibição de BChE pelo composto 7 e seus respectivos desvios padrões	46
Tabela 18: Percentual de inibição de BChE pelo composto 8 e seus respectivos desvios padrões	46
Tabela 19: Percentual de inibição de BChE pela fisostigmina e seus respectivos desvios padrões	47
Tabela 20: Valores de CI_{50} para os compostos avaliados quanto à atividade inibitória da AChE e BChE	53
Tabela 21: Seletividade dos compostos testados.....	53
Tabela 22: Valores de concentração do substrato [S] (mM), ABS, $1/V^0$ e $1/S$, para a realização do gráfico de Lineweaver-Burk de interação da AChE com a acetilcolina	54
Tabela 23: Valores de $1/V^0$ e $1/S$ para o composto 3 como demonstrativo de cálculo da cinética enzimática de AChE	55
Tabela 24: Tabela de correlação do valor de CI_{50} com o valor de K_i	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas do núcleo indólico e anel piridínico presentes nos alcalóides β -carbolínicos	6
Figura 2: Sistema β -carbolina	8
Figura 3: Sistema diidro- β -carbolina	9
Figura 4: Sistema tetraidro- β -carbolina	9
Figura 5: Equilíbrio de dissociação da harmana	10
Figura 6: Cinética de Michaelis-Menten	13
Figura 7: Gráfico de Lineaweaver e Burk	14
Figura 8: Estrutura tridimensional da acetilcolinesterase de <i>Torpedo californica</i> .	15
Figura 9: Visão do centro ativo da AChE de mamíferos	16
Figura 10: Estrutura química da acetilcolina	17
Figura 11: Transporte, síntese e degradação da acetilcolina nos nerros pré-sinápticos e sinápticos	18
Figura 12: Gráfico de Lineweaver-Burk para uma inibição reversível competitiva	22
Figura 13: Gráfico de Lineweaver-Burk para uma inibição reversível não competitiva	23
Figura 14: Gráfico de Lineweaver-Burk para uma inibição reversível incompetitiva	25
Figura 15: Inibidores comerciais da AChE	27
Figura 16: Princípio ativo do Bladan	28
Figura 17: Exemplos de metil-carbamatos	28
Figura 18: β -carbolínicos estudados	30

Figura 19: Reações envolvidas no método de Ellman	33
Figura 20: Inibição de AChE pelo composto 3	36
Figura 21: Inibição de AChE pelo composto 1	40
Figura 22: Inibição de AChE pelo composto 2	41
Figura 23: Inibição de AChE pelo composto 4	41
Figura 24: Inibição de AChE pelo composto 5	42
Figura 25: Inibição de AChE pelo composto 6	42
Figura 26: Inibição de AChE pelo composto 7	43
Figura 27: Inibição de AChE pelo composto 8	43
Figura 28: Inibição de AChE pela fisostigmina	44
Figura 29: Inibição de BChE pelo composto 1	47
Figura 30: Inibição de BChE pelo composto 2	48
Figura 31: Inibição de BChE pelo composto 3	48
Figura 32: Inibição de BChE pelo composto 4	49
Figura 33: Inibição de BChE pelo composto 5	49
Figura 34: Inibição de BChE pelo composto 6	50
Figura 35: Inibição de BChE pelo composto 7	50
Figura 36: Inibição de BChE pelo composto 8	51
Figura 37: Inibição de BChE pela fisostigmina	51
Figura 38: Gráfico de Lineweaver-Burk para a interação da acetilcolinesterase com a acetiltiocolina	55
Figura 39: Cinética de inibição de AChE pelo composto 1	56

Figura 40; Cinética de inibição de AChE pelo composto 2	57
Figura 41: Cinética de inibição de AChE pelo composto 3	57
Figura 42: Cinética de inibição de AChE pelo composto 4	58
Figura 43: Cinética de inibição de AChE pelo composto 5	58
Figura 44: Cinética de inibição de AChE pelo composto 6	59
Figura 45: Cinética de inibição de AChE pelo composto 7	59
Figura 46: Cinética de inibição de AChE pelo composto 8	60
Figura 47: Cinética de inibição de BChE pelo composto 1	60
Figura 48: Cinética de inibição de BChE pelo composto 2	61
Figura 49: Cinética de inibição de BChE pelo composto 3	61
Figura 50: Cinética de inibição de BChE pelo composto 4	62
Figura 51: Cinética de inibição de BChE pelo composto 5	62
Figura 52: Cinética de inibição de BChE pelo composto 6	63
Figura 53: Cinética de inibição de BChE pelo composto 7	63
Figura 54: Cinética de inibição de BChE pelo composto 8	64

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Formação dos alcalóides β -carbolínicos a partir da condensação de Pictet-Spengler	8
Esquema 2: Formação do complexo enzima-substrato	12
Esquema 3: Modelo de Michaelis-Menten	12
Esquema 4: Mecanismo de hidrólise da ACh pela AChE	19
Esquema 5: Reação envolvida em uma inibição reversível competitiva	21
Esquema 6: Reação envolvida em uma inibição reversível não competitiva	22
Esquema 7: Reação envolvida em uma inibição reversível incompetitiva	24
Esquema 8: Reação envolvida em uma inibição irreversível	25

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABS - Absorvância

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

AChE-Is - Inibidores seletivos da acetilcolinesterase

ACTI - Iodeto de acetiltiocolina

BChE - Butirilcolinesterase

BChE-Is - Inibidores seletivos da butirilcolinesterase

BCTI - Iodeto de butiriltiocolina

BSA - Albumina sérica bovina

DA - Doença de Alzheimer

DTNB - Ácido 5,5'- ditiobis [2-nitrobenzóico]

E - Enzima

ES - Complexo enzima-substrato.

MAO - Enzima monoaminoxidase

P - Produto

[S] - Concentração de substrato

SNC - Sistema nervoso central

TEEP - Tetraetilpirofosfato

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	vi
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 - A Doença de Alzheimer	2
2.2 - Alcalóides.....	4
2.2.1 - Aspectos Gerais.....	4
2.2.2 - Alcalóides β -carbolínicos.....	6
2.3 - Enzimas	10
2.3.1 - Colinesterases.....	14
2.4 - Acetilcolina	16
2.5 - Processos de inibição enzimática	20
2.5.1 - Inibidores reversíveis	20
2.5.2 - Inibidores irreversíveis.....	25
2.5.3 - Inibidores reversíveis e irreversíveis de colinesterases.....	25
2.5.3.1 - Inibidores reversíveis de colinesterases	25
2.5.3.2 - Inibidores irreversíveis de colinesterases.....	27
3 - OBJETIVOS	30
4 - PARTE EXPERIMENTAL	31
4.1 - Materiais e métodos	31
4.1 a) Equipamento.....	31
4.1 b) Solventes e reagentes utilizados.....	31
4.2 - Ensaio Químico-biológico	31

4.2.1 - Avaliação da atividade anticolinesterásica.....	32
4.2.2 - Cinética enzimática	33
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 - Avaliação da atividade anticolinesterásica.....	34
5.2 - Cinética Enzimática.....	54
6 – CONCLUSÕES	65
7 - REFERÊNCIAS	66

1 - INTRODUÇÃO

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de medicamentos (NODARI & GERRA, 2003). Muitos dos nossos medicamentos atuais são derivados de plantas. A porcentagem de fármacos derivados de produtos naturais era cerca de 40% no ano de 2000, mantendo-se aproximadamente constante nos anos seguintes (BUTLER, 2004). Exemplos de fármacos importantes obtidos de plantas são: morfina, um potente analgésico derivado do ópio (*Papaver somniferum*), digoxina, um medicamento para a congestão cardíaca derivado da digital (*Digitalis purpurea*), (LIEBERMAN, 1945; SMITH, 1988; CASS, 2004; RATES, 2001) e o taxol, anticâncer conhecido pelo nome genérico Paclitaxel, que é um diterpenóide oxigenado complexo isolado da árvore teixo-do-pacífico (*Taxus brevifolia*) (WANI *et al.*, 1971; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

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

Dentre as desordens do sistema nervoso central, destaca-se a Doença de Alzheimer (DA), patologia irreversível e progressiva caracterizada pela deterioração neuronal que resulta em perda de funções cognitivas, tais como memória, capacidade de comunicação, julgamento e raciocínio (MÖLLER, 1946; LANCTÔT *et al.*, 2003). Para o tratamento da DA são utilizados fármacos como o donepezil, galantamina e rivastigmina, os quais agem inibindo a acetilcolinesterase (AChE). Essas substâncias apresentam algumas limitações e efeitos adversos como efeito hepatotóxico decorrente do acúmulo de acetilcolina no organismo do usuário. Uma vez que compostos naturais oriundos de plantas exibem ação anticolinesterásica (TURK, 1995), como a galantamina por exemplo (DALE, 2003), pesquisas estão sendo desenvolvidas com plantas medicinais na busca de novos fármacos com menos efeitos colaterais proporcionando ao indivíduo portador da doença uma melhor qualidade de vida (MARUM, 2008).

Os alcalóides β -carbolínicos possuem uma ampla distribuição, sendo encontrados em várias famílias de plantas, além de estarem presentes na fumaça do cigarro, bebidas alcoólicas, alimentos excessivamente cozidos e em mamíferos. Estes alcalóides são conhecidos por apresentarem várias ações farmacológicas e tem atraído a atenção dos neuroquímicos que tem especulado o suposto papel destes no sistema nervoso central (SNC), onde funcionariam como neurotransmissores e neuromoduladores, interagindo com os receptores da dopamina e com os sistemas neurotransmissores da serotonina (CALLAWAY *et al.*, 1994) tais como, receptores benzodiazepínicos e ácido γ -aminobutírico (GABA); Tais compostos são ainda potentes inibidores das enzimas topoisomerase e monoaminoxidase (MAO) (BUCKHOLTZ, 1980; AIRAKSINEN & KARI, 1981; HUSBANDS *et al.*, 2001).

Esta pesquisa pretendeu fornecer novas substâncias com ação anticolinesterásica utilizando derivados β -carbolínicos do produto natural harmana, bem como fazer um estudo cinético a fim de descobrir qual seria o tipo de inibição que poderia estar ocorrendo com as enzimas AChE e BChE, para quem sabe descobrir novos compostos que poderiam ser úteis no tratamento dos sintomas da DA.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - A Doença de Alzheimer

O aumento da expectativa de vida é um fenômeno mundial que mostra o relativo sucesso de políticas de saúde pública, e o Brasil se inclui entre os países em que as pessoas estão vivendo por mais tempo e em condições melhores de saúde. No entanto, o aumento da expectativa de vida tem como efeito negativo o aparecimento de doenças degenerativas, típicas de idades mais avançadas, incluindo-se as várias formas de demência e entre estas, a mais importante é, sem dúvida, a Doença de Alzheimer (DA). No Brasil, a população de idosos (idade > 60 anos) em 2008 era de cerca de 18,7 milhões de pessoas, 1,3 milhões destes sofriam alguma forma de demência sendo quase 800 mil casos confirmados da DA (CRI, 2008).

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

A DA é uma das causas mais comuns de demência na velhice. É uma doença neurodegenerativa e progressiva associada à perda generalizada das funções mentais. Nas últimas décadas muitos esforços têm sido realizados para tentar esclarecer as causas da DA, com a esperança de que isso resulte no desenvolvimento de tratamentos farmacológicos seguros e efetivos (ORHAN *et al.*, 2007). A DA caracteriza-se pelo acúmulo de um peptídeo chamado beta-amilóide A-42 (A β), que é um fragmento de uma proteína beta-amilóide maior, existente normalmente no cérebro humano. Os níveis elevados desse peptídeo resultam em agregação, formando placas (HARDY & ALLSOP, 1991; HAASS, 1992; MUDHER & LOVESTONE, 2002). Em 2009, esta teoria foi atualizada, sugerindo que a própria proteína β -amilóide, e não o peptídeo A β é o responsável principal pela DA (NIKOLAEV *et al.*, 2009). Nos estágios iniciais, ocorre a perda de memória recente. À medida que a doença progride, novos sintomas aparecem, tais como confusão mental, mudanças de humor e irritabilidade. As funções cognitivas superiores, tais como linguagem, orientação e julgamento são severamente afetadas (MÖLSÄ *et al.*, 1986; WALDEMAR *et al.*, 2007). Finalmente, funções vitais são perdidas, levando à morte.

No mundo todo, o mal de Alzheimer é considerado um grande problema de saúde, devido ao enorme impacto causado ao indivíduo, família, sistema de saúde e à sociedade como um todo, uma vez que, metade dos pacientes são internados em instituições de saúde e o restante, recebe tratamento em casa, envolvido em seus cuidados, familiares, parentes e amigos (FRANCIS *et al.*, 1999; ZIMMERMAN & SOREQ, 2006).

Embora ainda não exista cura, alguns compostos são úteis em retardar a deterioração cognitiva da DA (KATALINIC *et al.*, 2010). Os avanços obtidos na compreensão da evolução e das razões moleculares da gênese da DA têm demonstrado que o uso de inibidores da AChE pode ser uma das formas mais eficientes de controle da evolução da doença (VIEGAS, 2004). A estratégia baseia-se na correção da função colinérgica cerebral através do uso de agentes anticolinesterásicos. Uma das abordagens mais úteis no projeto de descoberta do fármaco para o tratamento da DA é baseado no desenvolvimento de inibidores da acetilcolinesterase (AChE) a fim de retificar o nível de acetilcolina (ACh) cerebral (KATALINIC *et al.*, 2010). A AChE é uma enzima substrato-específica que degrada o neurotransmissor acetilcolina na sinapse versosa. A

ACh é conhecida por ser essencial para o processo de memória. Além do papel catalítico da AChE, ela também age como promotora na formação do peptídeo A β (FAN *et al.*, 2008).

Companhias farmacêuticas vêm apoiando fortemente a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos que aumentem a capacidade cognitiva. Assim, a pesquisa a cerca da possibilidade de que a elevação no nível da ACh seja útil para melhorar os sinais de deficiência de aprendizagem (dificuldade em reter memórias recentes ou adquirir novos conhecimentos), apresenta-se como algo a ser incentivado (SOARES, 2002).

Evidências sugerem que a enzima butirilcolinesterase (BChE), intimamente relacionada com a AChE, tem um papel significante na DA (GREIG *et al.*, 2005; FARLOW, 2007), uma vez que está envolvida em funções neurais tais como a correção da neurotransmissão colinérgica e não-colinérgica. (MESULAM *et al.*, 2002).

Estudos indicam que inibidores seletivos da butirilcolinesterase (BChE-Is) elevam os níveis extracelulares de ACh no cérebro, melhorando o desempenho cognitivo em roedores (HARTMANN *et al.*, 2007), sem os clássicos efeitos colaterais adversos dos inibidores de acetilcolinesterase seletivos (AChE-Is) ou não seletivos, tais como náusea e vômito. O donepezil é o único produto comercial que é um inibidor seletivo da AChE enquanto que tanto a rivastigmina quanto a galantamina são inibidores não seletivos. Assim sendo, quase todos os produtos comerciais produzem os efeitos colaterais descritos acima.

Estudos mais recentes tem tido como objetivo a procura de inibidores duais da AChE, ou seja, aqueles que inibem simultaneamente a AChE e a agregação de A β catalizada pela AChE (PIAZZI *et al.*, 2007; RIZZO *et al.*, 2009; RIZZO *et al.*, 2010). Esses inibidores se ligam a ambos os sítios aniônicos da AChE que são responsáveis tanto pela inibição catalítica quanto pela agregação de amiloide A β .

2.2 - Alcalóides

2.2.1 - Aspectos Gerais

Os alcalóides são um grupo de substâncias químicas presentes em plantas medicinais com grande importância no desenvolvimento de novos fármacos. Isso se deve provavelmente à variedade de estruturas químicas possíveis, que podem ser os responsáveis pelas respostas farmacológicas dos alcalóides presentes nas plantas (ELIZABETSKY, 2006). Um aspecto tradicional de produtos naturais na pesquisa médica tem sido a sua utilização na identificação e investigação do papel fisiológico/patológico de receptores e enzimas como possíveis alvos na busca de novos fármacos. Exemplos clássicos desta função de produtos naturais na pesquisa de novos fármacos pode ser visto na investigação do sistema colinérgico. Por exemplo, a importância dos alcalóides nicotina e fisostigmina na investigação sobre os receptores nicotínicos e muscarínicos (EVANS, 1991). Os alcalóides são constituídos por um grande número de metabólitos de uma variedade estrutural muito ampla. Este grupo de produtos naturais sempre influenciou a história econômica, médica, política e social da humanidade (ROBBERS *et al.*, 1997). Desde os primórdios da civilização, pode-se observar o uso de extratos vegetais contendo alcalóides em medicamentos, venenos e poções mágicas (SIMÕES *et al.*, 1999). Muitos alcalóides são protótipos para a elaboração de fármacos. Atualmente, diversos deles são utilizados na terapêutica, puros ou em associação, e também na forma de derivados. Entre outras atividades farmacológicas inclui-se atividade antidiurética (ajmalicina), hipotensiva (reserpina, iombina), alucinogênica (mescalina), antimalárica (quinina), antitussígena (codeína e noscapina), miorelaxante (tubocurarina), e outras (PELLETIER, 1983; HENRIQUES *et al.*, 1999).

Os alcalóides são encontrados em representantes de todos os grupos vegetais. São produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário vegetal e fonte de reserva de nitrogênio. Acredita-se que estes compostos possuam a função de hormônios reguladores do crescimento e que, provavelmente, sejam os responsáveis pela defesa da planta contra microorganismos e vírus (NOWACKI *et al.*, 1975; SIMÕES *et al.*, 1999).

De maneira geral, eles são formados a partir de aminoácidos. Os mais utilizados em sua biossíntese são: ácido α -aspártico (piridinas e isoquinoleínas), α -lisina (piperidinas e quinolizidinas), α -tirosina (isoquinolinas, benzilisoquinolinas e betalainas), α -triptofano (derivados da triptamina, β -carbolinas, indóis complexos), α -

histidina (imidazóis). Entre os outros precursores usados na biossíntese deste grupo, pode-se citar o ácido mevalônico, ácido antranílico, terpenos e esteróides (ROBINSON, 1974; SIMÕES *et al.*, 1999).

2.2.2 - Alcalóides β -carbolínicos

As β -carbolinas pertencem aos alcalóides do grupo indólico, que além de apresentarem um núcleo indólico, possuem um anel piridínico hidrogenado de seis membros (**Figura 1**).

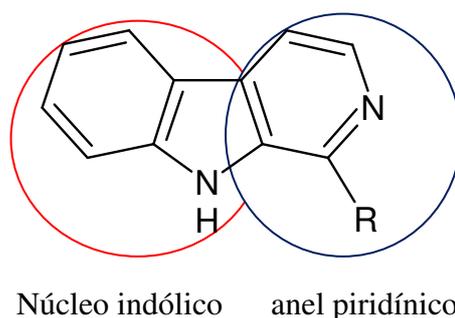


Figura 1: Estruturas do núcleo indólico e anel piridínico presentes nos alcalóides β -carbolínicos.

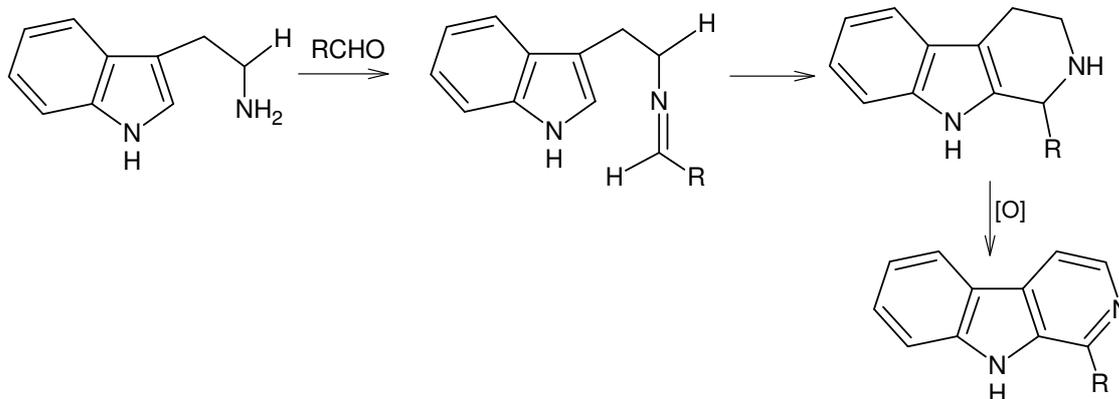
Inicialmente, os alcalóides β -carbolínicos são conhecidos por sua ação psicoativas, sendo identificados em plantas que tem diversos usos na etnofarmacologia e são constituintes com acentuada atividade alucinógena utilizados na cultura indígena Sul – Americana (GLENNON *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2006) e em tribos africanas (HAMANN *et al.*, 2008), assim como a harmina e a harmalina, que são substâncias ativas de espécies de *Banisteriopsis* utilizadas em rituais pelos índios na Amazônia.

Acredita-se que o efeito alucinógeno das β -carbolinas, além de ocorrer devido à inibição da enzima monoaminoxidase (MAO), aconteça também devido à similaridade estrutural dos mesmos com aminas indólicas, como a triptamina e serotonina. Alguns estudos demonstram que as β -carbolinas interagem com moderada afinidade com receptores do sistema nervoso central. Esses alcalóides ligam-se com relativa afinidade a receptores cerebrais de serotonina e receptores imidazólicos. Esta afinidade é altamente dependente dos substituintes no núcleo indólico e também da saturação do anel piridínico (GRELLA *et al.*, 1998; GLENNON *et al.*, 2000; HUSBANDS *et al.*, 2001).

Deste modo, alcalóides β -carbolínicos apresentam um amplo espectro de neuroatividade, interagindo com receptores benzodiazepínicos, serotonina (5HT1A e 5HT2), imidazolínicos (HERRAIZ & CHAPARRO, 2008), glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), transmissão dopaminérgica (MOURA *et al.*, 2006) e também com o ácido γ -aminobutírico (GABA), opióides, enzimas do citocromo P450, inibindo também a MAO (HERRAIZ & CHAPARRO, 2006).

Além disso, esses metabólitos têm mostrado uma ampla variedade de propriedades farmacológicas, incluindo ação hipotensiva (vaso relaxante) e sobre o sistema cardiovascular (HUSBANDS *et al.*, 2001), atividade antimicrobiana (antiparasitária e antiviral) (RIVAS *et al.*, 1999; KUSURKAR & GOSWAMI, 2004), propriedades convulsivante e anticonvulsivante (FARZIN & MANSOURI, 2006), atividade antineoplásica e citotóxicas (HEMMATEENEJAD *et al.*, 2006). Possui ainda ação antioxidante (SHI *et al.*, 2000), potente inibição das enzimas topoisomerase I (HEMMATEENEJAD *et al.*, 2006). Os alcalóides também estão implicados em processos de alcoolismo de toxicodependência, como por exemplo, na infusão crônica da harmana, há um aumento na ingestão voluntária de etanol em ratos (HAMANN *et al.*, 2008). Possuem também ação neuroprotetora, antidepressiva e/ou ansiolítico (BONNET; SCHERBAUM; WIEMANN, 2008).

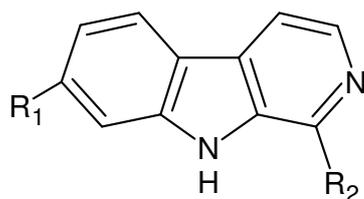
Os alcalóides β -carbolínicos são formados através de uma reação por meio da condensação de Pictet-Spengler (**Esquema 1**) entre indolaminas e substâncias carbonílicas (AFSAH *et al.*, 1985; KUSURKAR & GOSWAMI, 2004). A aromaticidade é restaurada por tautomerismo e posteriormente, é formada a substância com o esqueleto β -carbolina, por oxidação (DEWICK, 2002).



Esquema 1: Formação dos alcalóides β -carbonílicos a partir da condensação de Pictet-Spengler.

As β -carbolidinas podem ser divididas em três grupos estruturais dependendo do grau de saturação do anel: (a) as totalmente aromáticas (**Figura 2**); (b) as diidro- β -carbolidinas (**Figura 3**); (c) as tetraidro- β -carbolidinas, com o anel piridínico totalmente saturado (**Figura 4**) (GLENNON *et al.*, 2000).

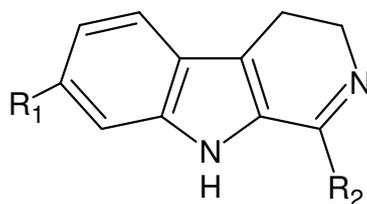
(a) Sistema β -carbolidina



	R ₁	R ₂
Nor-harmana	H	H
Harmana	H	CH ₃
Harmol	OH	CH ₃
Harmina	OCH ₃	CH ₃

Figura 2: Sistemas β -carbolidinas

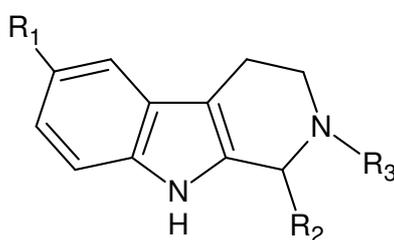
(b) Sistema diidro-β-carbolina



	R ₁	R ₂
Harmalol	OH	CH ₃
Harmalina	OCH ₃	CH ₃

Figura 3: Sistema diidro-β-carbolina

(c) Sistema tetraidro-β-carbolina



	R ₁	R ₂	R ₃
1,2,3,4-tetraidro-β-carbolina	H	H	H
2-metil-1,2,3,4-tetraidro-β-carbolina	H	H	CH ₃
6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-β-carbolina	OCH ₃	H	H
1-metil-1,2,3,4-tetraidro-β-carbolina	H	CH ₃	H

Figura 4: Sistema tetraidro-β-carbolina

Os alcalóides do tipo harmana tem sido alvo de interesse desde o início do século devido as suas diversas propriedades farmacológicas (LUTOMSK, 1959). Como exemplo, Lee e col. isolaram em 2001 o alcalóide harmana da planta *Symplocos serchuensis* e observaram uma expressiva atividade anti-HIV desde composto.

A estrutura β -carbolina da harmana apresenta dois pontos chaves para o estudo dos equilíbrios de dissociação em soluções aquosas: o grupo NH fracamente ácido do anel indólico e o átomo de nitrogênio básico do anel piridínico (HARDIMAN *et al*, 1987).

A harmana em solução aquosa dependendo do pH existe, em pelo menos três espécies diferentes: catiônica, neutra e aniônica. A **Figura 5** representa o equilíbrio de dissociação da harmana.

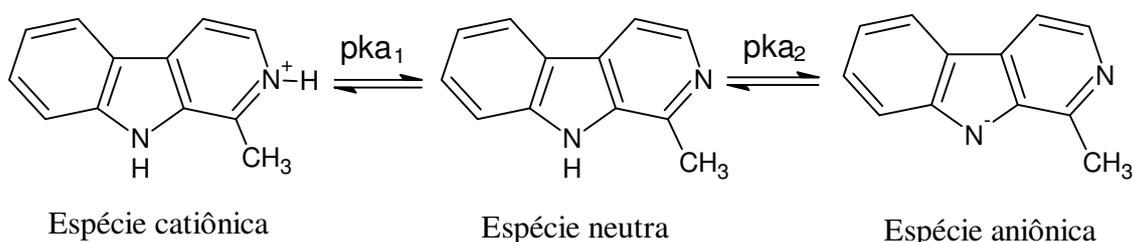


Figura 5: Equilíbrio de dissociação da harmana.

2.3 - Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos, específicos, compostos de uma sequência de aminoácidos. Elas aumentam a velocidade da reação por fatores de 10⁶ ou mais. Muitas enzimas para serem ativas necessitam de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas pequenas, frequentemente derivadas de vitaminas, chamadas de coenzimas (BERG *et al.*, 2002).

As enzimas são fundamentais para qualquer processo bioquímico. Agindo em sequências organizadas, elas catalisam as centenas de reações sucessivas pelas quais as moléculas nutrientes são degradadas, a energia química é conservada e transformada e as macromoléculas biológicas são sintetizadas a partir de moléculas precursoras simples. Devido à ação das enzimas reguladoras, as vias metabólicas são altamente coordenadas de forma a produzir uma atuação harmoniosa das muitas diferentes atividades necessárias para manter a vida (NELSON & COX, 2002).

O estudo das enzimas tem uma grande importância prática. Em algumas doenças, especialmente nas desordens genéticas herdadas, pode ocorrer uma deficiência ou mesmo a ausência total de uma ou mais enzimas. Outras condições anormais

também podem ser causadas pela excessiva atividade de uma enzima. Medidas da atividade de enzimas no plasma sanguíneo, eritrócitos ou amostras de tecido são importantes no diagnóstico de várias doenças. Muitos fármacos exercem seu efeito biológico por meio de interações com as enzimas. Elas tornaram-se importantes ferramentas práticas não apenas na medicina, mas também na indústria química, no processamento de alimentos e na agricultura (NELSON & COX, 2002).

A catálise enzimática é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas - muitas das moléculas biológicas são bastante estáveis no meio aquoso, de pH neutro e temperatura moderada, no interior das células. Além disso, muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são desfavoráveis no ambiente celular, tais como: a formação de intermediários carregados ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa necessária para que ocorra a reação. Sem catálise, por exemplo, as reações necessárias para digerir os alimentos, enviar sinais através dos nervos ou contrair um músculo simplesmente não ocorrem com velocidade útil. Uma enzima contorna esses problemas fornecendo um ambiente específico onde uma dada reação é energeticamente mais favorável. A sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação proteica nativa. Se uma enzima é desnaturada ou dissociada em subunidades, a atividade catalítica geralmente é destruída. Se uma enzima é quebrada em seus aminoácidos constituintes, a sua atividade catalítica é sempre destruída. Assim, as estruturas protéicas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas, são essenciais para a sua atividade catalítica (NELSON & COX, 2002).

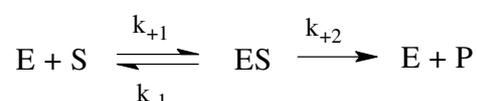
As reações catalisadas pelas enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima (ES) representado no **Esquema 2**. A ligação ocorre em uma região da enzima chamado de **sítio ativo**. A interação da enzima com o substrato no sítio ativo promove a formação do estado de transição diminuindo a energia do estado de transição e conseqüentemente aumentando a velocidade da reação. Esta interação ocorre por interações intermoleculares (ligações hidrogênio, interações iônicas, hidrofóbicas, entre outras) onde a estrutura do substrato é complementar ao sítio ativo da enzima. O equilíbrio de uma reação não é afetado pela enzima (BERG *et al.*, 2002).



Esquema 2: Formação do complexo enzima-substrato.

Algumas enzimas têm uma região da molécula, o **sítio alostérico**, que não está no sítio ativo ou no sítio de ação do substrato, mas que é um sítio peculiar, onde moléculas pequenas ligam-se e efetuam uma alteração no sítio de ligação ao substrato ou na atividade que ocorre no sítio ativo. A ligação de uma molécula pequena específica no sítio alostérico causa uma alteração na conformação da enzima. Isso pode tornar o sítio ativo mais ou menos ativo, pelo aumento ou diminuição da afinidade do sítio de ligação pelo substrato (DEVLIN, 2007).

Mecanismos de reação detalhados têm sido propostos para muitas enzimas. O estudo da cinética enzimática é uma estratégia importante para a elucidação dos mecanismos de reação. A maioria das enzimas tem algumas propriedades cinéticas em comum, e estas seguem o modelo de Michaelis-Menten (MICHAELIS & MENTEN, 1913) onde a enzima (E) se combina com o substrato (S), formando o complexo enzima-substrato (ES), o que pode prosseguir para formar o produto (P) ou dissociar em enzima (E) e substrato (S) como pode ser observado no **Esquema 3**.



Esquema 3: Modelo de Michaelis-Menten.

A velocidade V_0 de formação do produto é dada pela equação de Michaelis-Menten (EQ.1), onde o $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade quando a enzima está saturada de substrato, isto é, todas as moléculas de enzimas estão na forma de complexo ES, o K_M é a constante de Michaelis-Menten, é a concentração do substrato que produz metade da velocidade máxima. A medida que aumenta a concentração do substrato a velocidade catalítica da enzima aumenta de forma hiperbólica, aproximando-se de uma velocidade máxima (BERG *et al.*, 2002).

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{EQ. 1})$$

A equação é caracterizada por um gráfico (**Figura 6**) de V_0 contra $[S]$ chamado de gráfico de Michaelis- Menten, onde é possível obter os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$. (BERG *et al.*, 2002).

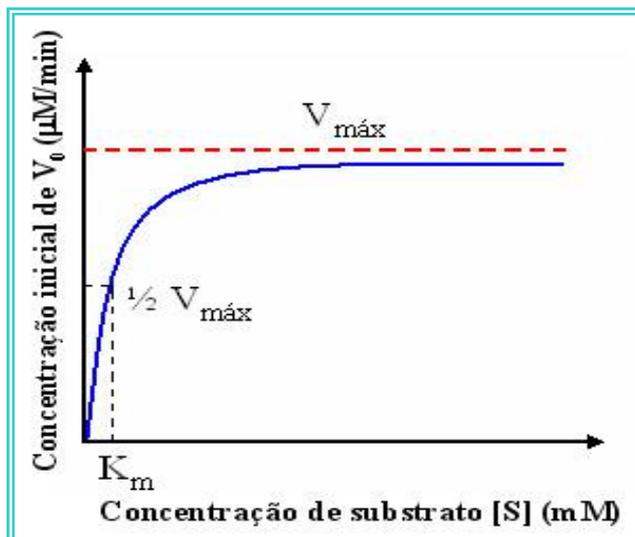


Figura 6: Cinética de Michaelis-Menten.

A velocidade máxima, $V_{m\acute{a}x}$ é igual ao produto de k_{cat} , pela concentração total da enzima. A concentração cinética k_{cat} , chamada de número de renovação, é o numero de moléculas de substrato transformadas em produto por unidade de tempo, em um único centro catalítico, quando a enzima está totalmente saturada com substrato. Existem enzimas, como as enzimas alostéricas, que não se adaptam à cinética de Michaelis e Menten, pois apresentam múltiplos sítios regulatórios (BERG *et al.*, 2002).

Com o objetivo de obter valores precisos de $V_{m\acute{a}x}$ e K_M , Lineweaver e Burk inverteram a equação de Michaelis-Menten (LINEWEAVER & BURK, 1934), dando origem à equação de Lineweaver e Burk (EQ.2) (BERG *et al.*, 2002).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \text{ (EQ. 2)}$$

Através desta equação, pode-se obter um gráfico de $1/V_0$ contra $1/[S]$, chamado de traçado de Lineaweaver e Burk ou duplo recíproco (**Figura 8**), fornecendo uma linha reta, com um intercepto no eixo y que é caracterizado por valores de $1/V_{m\acute{a}x}$ e uma inclinação de $k_M/V_{m\acute{a}x}$. O intercepto no eixo x é $-1/k_M$.

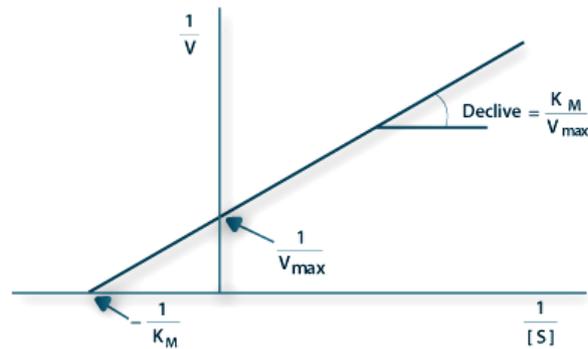


Figura 7: Gráfico de Lineweaver e Burk

2.3.1 - Colinesterases

As colinesterases fazem parte de um grupo numeroso de enzimas classificadas como esterases, que de forma geral atuam sobre ligações éster produzindo um ácido carboxílico e um álcool (FRAGA, 2010).

São enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periféricas (NACHMANSON & ROTHENBERG, 1945). São classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas e especificidades a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ, 1993). Considera-se que as colinesterases, constituam uma família de enzimas, que podem se subdividir em dois tipos principais: a acetilcolinesterase (AChE) que exibe uma especificidade para a acetilcolina e interrompe a transmissão dos impulsos nervosos pela rápida hidrólise desse neurotransmissor na membrana pós-sináptica da junção neuromuscular (PATOCKA *et al.*, 2004), e a butirilcolinesterase (BChE) que não é tão específica e catalisa a hidrólise deste neurotransmissor, porém, possui maior afinidade por substratos mais hidrofóbicos tais como a butirilcolina (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989).

A AChE e BChE têm aproximadamente o mesmo número de aminoácidos por subunidade catalítica, 575 e 574 respectivamente, e suas diferenças no peso molecular são devidas a diferenças na glicosilação. A AChE tem 4 e a BChE tem 9 cadeias de carboidratos por subunidade. As ligações de dissulfeto de ambas as enzimas, estão localizadas exatamente na mesma posição, sugerindo dobramento proteico similar. As sequências de aminoácidos dos sítios ativos da AChE e BChE estão conservadas em muitas espécies estudadas e os resíduos de serina, histidina e glutamato são considerados importantes para a atividade catalítica de ambas. (MIKAMI, 2005).

O sítio ativo da AChE é considerado como tendo dois sub-sítios: um sub-sítio aniônico, onde a cadeia de nitrogênio quaternário da ACh carregada positivamente se liga e um sub-sítio esterásico contendo a tríade catalítica, onde o grupamento éster da ACh se liga através das ligações de hidrogênio (NACHMANSOHN & WILSON, 1951; SILMAN *et al.*, 1994; TAYLOR & BROWN, 1999). Na borda ou superfície do canal do sítio ativo situa-se um segundo sítio aniônico que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (BOURNE *et al.*, 2005). Apesar da hidrólise do substrato ocorrer na tríade catalítica em ambas as colinesterases, algumas diferenças no curso catalítico como, por exemplo, o maior volume do centro ativo, pode ser importante na determinação da preferência pelo substrato e na afinidade pelo inibidor (EKHOLM, 2001).

Evidências sugerem que a BChE pode atuar como um corregulador da atividade da ACh no SNC, uma vez que, a inibição dessa enzima aumenta de maneira dose dependente os níveis desse neurotransmissor no cérebro (GIACOBINE, 2000). Na ausência da AChE, a BChE parece substituí-la na manutenção da integridade estrutural e fisiológica do sistema colinérgico (MESULAM *et al.*, 2002).

A primeira determinação da estrutura primária da AChE foi de uma espécie de peixe elétrico, *Eletrophorus electricus*, que possui abundante quantidade da enzima em seu órgão elétrico (SCHUMACHER, 1986; SUSSMAN, 1991) (**Figura 8**). Posteriormente, as sequências da AChE de várias outras espécies foram obtidas, inclusive da humana (SOREQ, 1990).

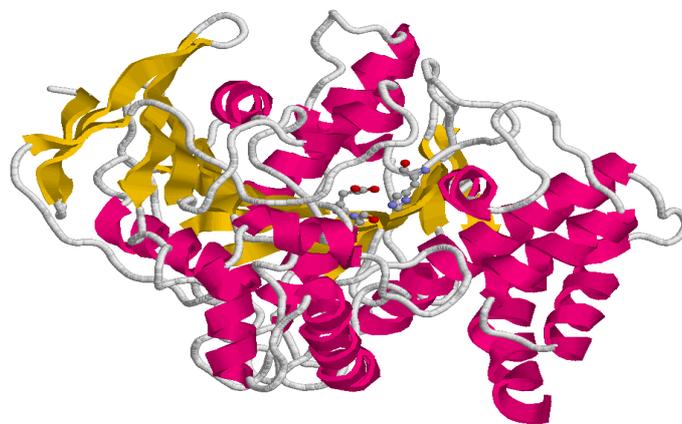


Figura 8: Estutura tridimensional da acetilcolinesterase de *Eletrophorus electricus*.

Levando-se em consideração a grande homologia entre a AChE e a BChE, MILLARD & BROOMFIELD (1992), propuseram por análise computacional um modelo para a BChE humana com base na estrutura da AChE. Nesse modelo, observou-se, conforme o esperado, uma grande similaridade entre as enzimas. Uma diferença encontrada entre elas foi a presença de apenas um resíduo aromático na BChE na entrada do túnel que leva ao sítio ativo (a AChE possui 3). Pela ausência de resíduos aromáticos, o sítio ativo é mais espaçoso do que o da AChE.

A **Figura 9** demonstra a estrutura tridimensional do sítio ativo da AChE o qual é formado por resíduos da chamada tríade catalítica: serina, histidina e glutamato).

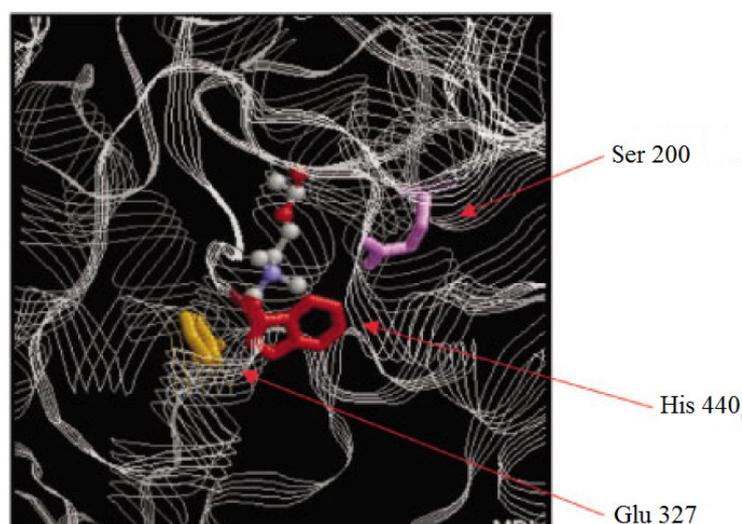


Figura 9: Visão do centro ativo da AChE de mamíferos (Adaptado de FRAGA & BARREIRO, 2004).

2.4 - Acetilcolina

Desde o início da história evolucionária das espécies e antes do surgimento do sistema nervoso em animais, a ACh é considerada uma importante molécula sinalizadora encontrada em bactérias, protozoários, algas e plantas (KAWASHIMA & FUJI, 2003; GOTTI & CLEMENT, 2004). A neurotransmissão química foi investigada por Otto Loewi em 1921 onde identificou a ACh como uma substância cardiotativa liberada pelo nervo vago nomeando-se inicialmente como “vagusstoff” (vagoessência) (VAN DER ZEE & LUITEN, 1999). Desde então, a ACh foi o primeiro composto a ser identificado como um neurotransmissor e passou a ser amplamente estudado nas sinapses do SNC e sistema nervoso periférico (DESCARRIES *et al.*, 1997).

A ACh (**Figura 10**) é amplamente distribuída no cérebro, possui efeitos principalmente excitatórios que são efetivados pelos chamados receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos que transmitem os sinais por mecanismos diferentes (CANEPA, *et al.*, 1966). Os receptores muscarínicos no cérebro atuam a nível pré-sináptico, e muitos dos efeitos comportamentais associados às vias colinérgicas parecem ser produzidos pela ação da ACh sobre estes receptores. Os receptores nicotínicos também estão disseminados no cérebro, porém de modo muito mais esparso do que os receptores muscarínicos. Os receptores nicotínicos de ACh exibem, em sua maioria, localização pré-sináptica e atuam ao facilitar a liberação de outros transmissores como glutamato e dopamina, embora atuem pós-sinápticamente em algumas situações (RANG *et al.*, 2004).

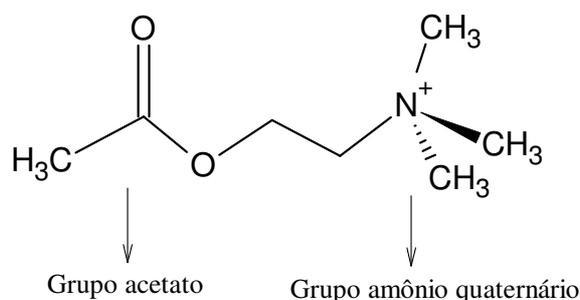


Figura 10: Estrutura da acetilcolina.

A ACh é um neurotransmissor sintetizado pela célula transmissora ou pré-sináptica. Ela é armazenada em vesículas sinápticas até que um potencial de ação leve a uma despolarização da membrana plasmática das células pré-sinápticas. Isto resulta na entrada de Ca^{2+} , seguida pela fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática. A acetilcolina é liberada na fenda sináptica e se difunde até o receptor, a célula pós-sináptica. Aqui, a acetilcolina se liga ao seu receptor, que pode atuar como um canal catiônico. O receptor sofre uma mudança conformacional logo após se ligar à ACh. Esta mudança na estrutura tridimensional resulta em uma entrada de Na^+ , que despolariza a membrana plasmática na célula pós-sináptica. Tem início um potencial de ação. É necessário que a ACh seja removida da fenda sináptica antes que a sinapse seja capaz de responder a outro sinal. Isto requer a ação da AChE, que catalisa a hidrólise da ACh. A colina é absorvida pelas células pré-sinápticas e usada na síntese de mais ACh. O acetato é transportado para outros tecidos e metabolizado.

A **Figura 11** mostra, resumidamente, os eventos da transmissão colinérgica.

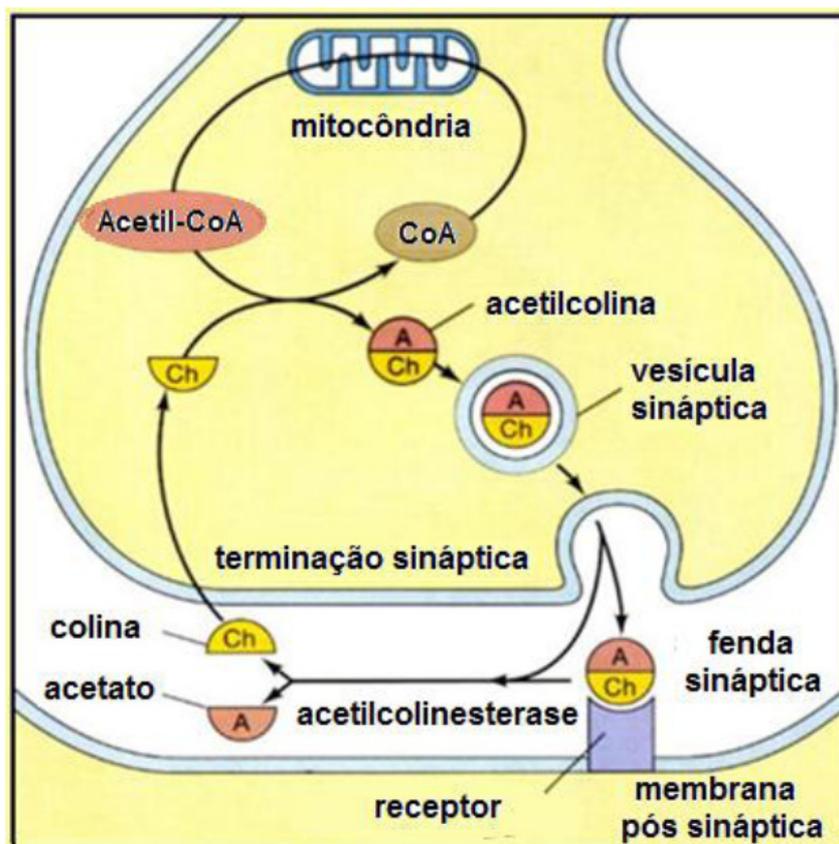
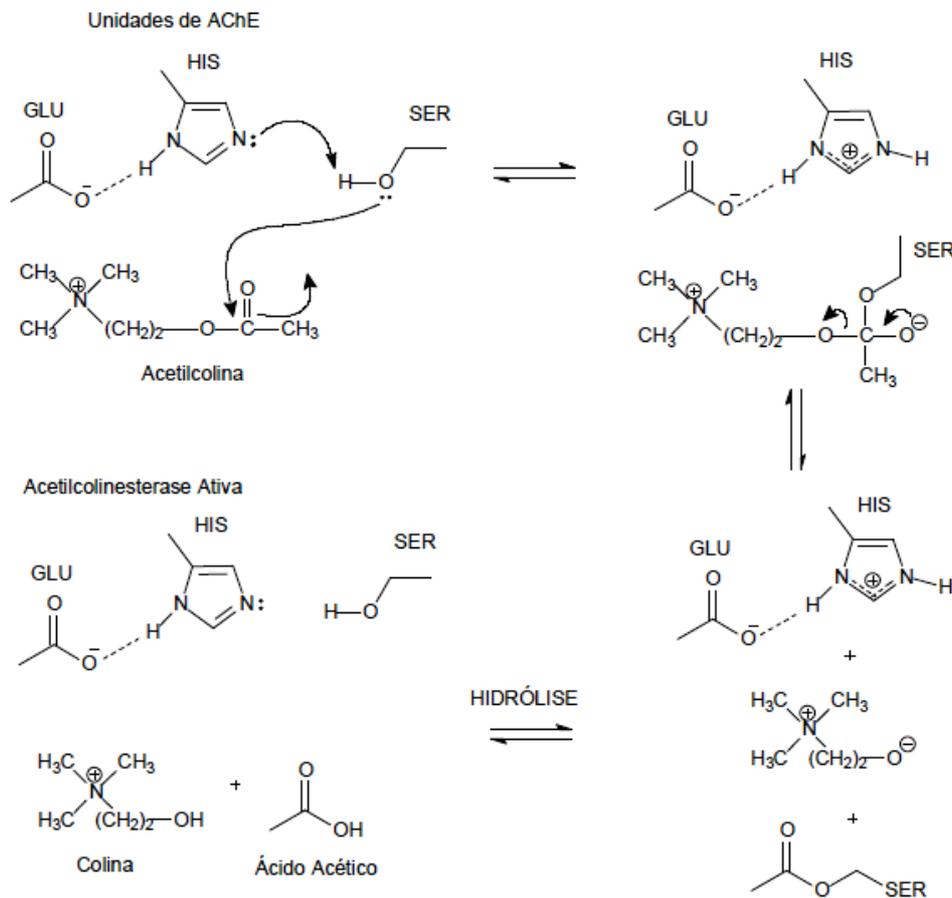


Figura 11: Transporte, síntese e degradação da acetilcolina nos nervos pré-sinápticos e sinápticos.

O **Esquema 4** ilustra o mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase que é iniciada pela ligação da acetilcolina ao sítio ativo da acetilcolinesterase. As cadeias laterais de aminoácidos exercem importantes funções na formação do complexo enzima-substrato e, mais diretamente, no processo catalítico. O primeiro passo, em qualquer reação envolvendo catálise enzimática, é a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima. Isto é facilitado pelas interações entre o substrato e as cadeias laterais amino-acila da enzima. Em geral, estas interações não são covalentes e incluem atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e atrações de Van der Waals. Os fragmentos carregados negativamente podem interagir de maneira favorável com os grupos amino, carregados positivamente. No sítio ativo, o fragmento histidina está próximo do fragmento serina e pode estabilizar a conformação do sítio ativo através de ligações de hidrogênio. De fato, a atividade enzimática depende do pH, e tem um valor máximo em um pH consistente com o valor do pK_a de um fragmento histidina. Além dos fragmentos de aminoácidos envolvidos na formação do complexo enzima-substrato,

há aqueles que estão envolvidos mais diretamente na catálise. Pode-se observar que o fragmento serina está localizado no sítio ativo. O seu grupo hidroxila nucleofílico reage com o carbono do grupo acila da acetilcolina. A serina é acetilada e a colina é o grupo de saída.

As colinesterases enquanto catalisadores, precisam ser regeneradas antes que a reação se complete. O fragmento serina acetilado precisa ser hidrolisado antes que a reação se complete, para que a enzima seja capaz de catalisar uma nova reação. A hidrólise do fragmento serina acetilado resulta na formação de acetato. Uma vez que a colina e o acetado tenham deixado o sítio ativo, a enzima é capaz de ligar-se com mais substratos e repetir a reação catalítica.



Esquema 4: Mecanismo de hidrólise da ACh pela AChE (SANTOS, 2007)

2.5 - Processos de inibição enzimática

Os inibidores enzimáticos são agentes moleculares que interferem na catálise, diminuindo ou parando as reações enzimáticas. As enzimas catalisam virtualmente todos os processos celulares, de forma que não é surpreendente que inibidores enzimáticos estejam entre os agentes farmacêuticos e os pesticidas mais importantes conhecidos. O estudo dos inibidores enzimáticos também fornece informação valiosa sobre os mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir alguns caminhos metabólicos. (NELSON & COX, 2002). Os processos de inibição enzimática estão divididos em dois tipos, inibição reversível e inibição irreversível. A diferença básica está na formação do complexo enzima-substrato, isto é, na estabilidade gerada pela sua ligação com a enzima (CAMPOS, 1999; BISSWANGER, 2008).

2.5.1 - Inibidores reversíveis

Os inibidores reversíveis levam à formação de um complexo em um sistema em equilíbrio, no qual a enzima apresenta um grau definido de inibição (α), que é dependente das concentrações da enzima e dos reagentes no meio (inibidor e substrato), permanecendo constante a partir de um determinado tempo (CAMPOS, 1999).

O grau de inibição α é dado pela equação (EQ.3) abaixo:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \text{ (EQ. 3)}$$

Onde:

[I] = Concentração de inibidor;

K_I = Constante de inibição.

O K_I é a constante de inibição, ela é a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (EI) demonstrado na equação (EQ.4) abaixo:

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \text{ (EQ. 4)}$$

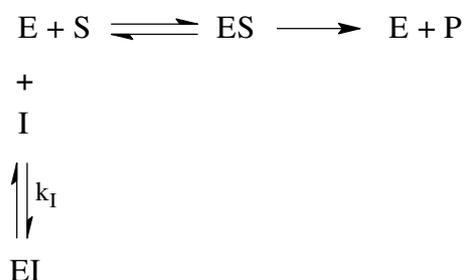
Assim, quanto menor for o valor de K_I , mais fortemente o inibidor se liga à enzima. Os valores de K_I são úteis para avaliar o poder inibitório de diferentes compostos, por exemplo, uma série de compostos sendo testados para utilização como

medicamentos, tendo em mente que, um medicamento eficaz não é necessariamente o composto com o K_I menor (o que se liga mais fortemente), pois outros fatores, como a solubilidade do medicamento ou sua estabilidade, têm que ser considerados (PRATT & CORNELLY, 2006).

Entre os inibidores reversíveis podem-se distinguir três tipos de inibição, a inibição reversível competitiva, não-competitiva e incompetitiva.

- **Inibidores competitivos**

Os inibidores competitivos competem com o substrato pelo centro ativo da enzima. Estas moléculas apresentam configuração semelhante ao substrato e por isso são capazes de se ligarem ao centro ativo da enzima. Eles produzem um complexo enzima-inibidor que é semelhante ao complexo enzima-substrato. Como o processo é reversível, a simples adição de uma maior quantidade de substrato pode deslocar o equilíbrio de modo a favorecer a formação do complexo enzima-substrato (ES) diminuindo a probabilidade de um inibidor se ligar a enzima (CAMPOS, 1999; NELSON & COX, 2002). O processo de inibição reversível é descrito pelo **Esquema 5**.



Esquema 5: Reação envolvida em uma inibição reversível competitiva.

O valor de K_I no caso de uma inibição reversível competitiva é dado pela equação (EQ.5) abaixo:

$$K_I = \frac{CI_{50}}{\left(\frac{S}{K_M} + 1\right)} \text{ (EQ. 5)}$$

Onde:

K_I = Constante de inibição;

CI_{50} = Concentração do composto que inibe 50% da atividade enzimática;

K_M = Constante de Michaelis-Menten;

S = Concentração do substrato.

A **Figura 12** fornece o gráfico de Lineweaver-Burk para uma inibição competitiva, onde as retas interceptam o eixo y no mesmo ponto, ou seja, o valor de $V_{m\acute{a}x}$ permanece o mesmo e o valor de K_M aumenta (LINEWEAVER & BURK, 1934).

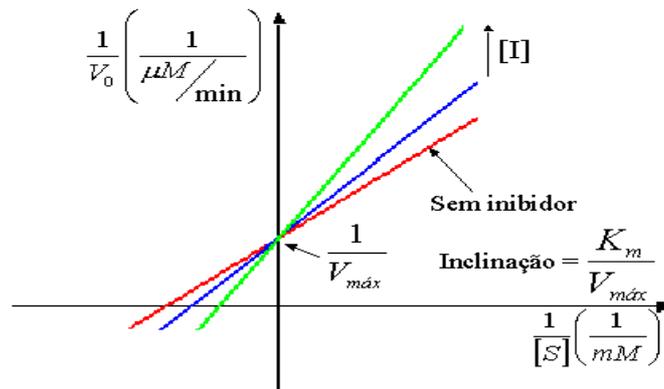
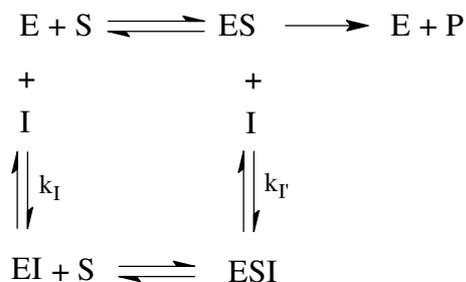


Figura 12: Gráfico de Lineweaver e Burk para uma inibição reversível competitiva.

- Inibidores não competitivos

Os inibidores não competitivos ligam-se reversivelmente à enzima em um sítio próprio de ligação, que não o sítio ativo, podendo estar ligado ou não ao mesmo tempo que o substrato. Este tipo de inibição, depende somente da concentração do inibidor (CAMPOS, 1999; NELSON & COX, 2002; BERG *et al.*, 2002). O processo de inibição não competitiva é descrito no **Esquema 6**.



Esquema 6: Reações envolvidas em uma inibição reversível não competitiva.

O valor de K_I no caso de uma inibição reversível não competitiva é igual ao valor do CI_{50} .

$$K_I = CI_{50}$$

Onde:

K_I = Constante de inibição;

CI_{50} = Concentração do composto que inibe 50% da atividade enzimática.

A **Figura 13** representa uma inibição não competitiva segundo o gráfico de Lineweaver-Burk, onde as retas se encontram no mesmo ponto do eixo x, isto é, o valor de K_M não varia, e a $V_{m\acute{a}x}$ diminui (LINEWEAVER & BURK, 1934).

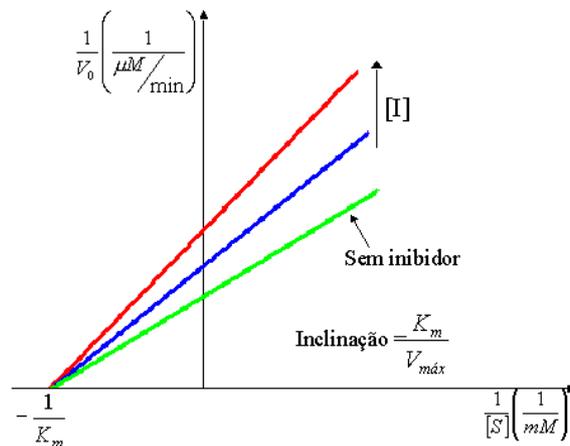


Figura 13: Gráfico de Lineweaver-Burk de inibição reversível não competitiva.

- Inibidores incompetitivos

Um inibidor incompetitivo é aquele que se liga somente ao complexo enzima-substrato, isto é, tem afinidade apenas pelo complexo ES. O **Esquema 7** descreve tal processo.

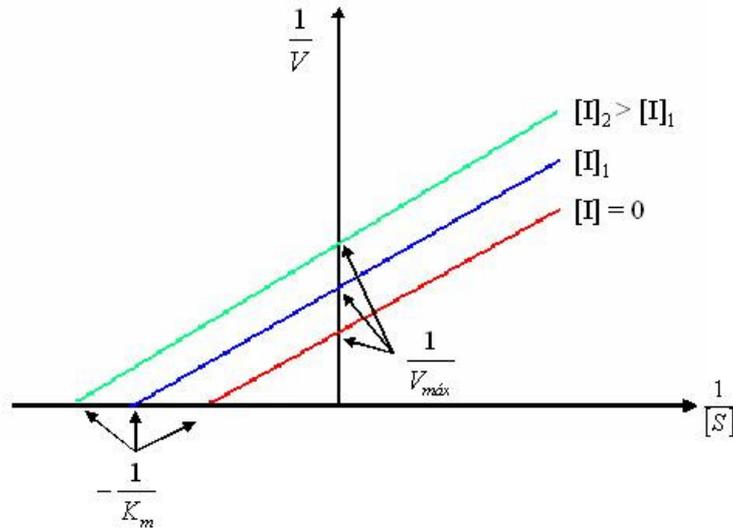


Figura 14: Gráfico de Lineweaver-Burk de inibição reversível incompetitiva.

2.5.2 - Inibidores irreversíveis

Os inibidores irreversíveis se ligam às enzimas levando a inativação definitiva da mesma, geralmente por formação de ligações covalentes, podendo até provocar a destruição de grupos funcionais essenciais para a enzima. A inibição irreversível é progressiva, aumentando com o tempo até atingir seu máximo. Esses inibidores são muito tóxicos para os organismos, uma vez que são capazes de inativar a enzima (CAMPOS, 1999; NELSON & COX, 2002). O **Esquema 8** descreve o processo de modo geral.



Esquema 8: Reação envolvida em uma inibição irreversível

2.5.3 - Inibidores reversíveis e irreversíveis de colinesterases

2.5.3.1 - Inibidores reversíveis de colinesterases

Três domínios distintos na AChE constituem locais de ligação para inibidores: o bolsão acil do centro ativo, o subsítio colina do centro ativo e o sítio aniônico periférico. (TAYLOR & RADIC, 1996).

Alguns inibidores da AChE são utilizados terapeuticamente, enquanto outros tem mostrado uso como inseticidas, dependendo assim, do tipo de inibição que estes efetuam na enzima. Inibidores reversíveis podem ser utilizados atualmente no tratamento paliativo da DA, gerando um aumento nas concentrações de ACh no córtex cerebral; ao mesmo tempo, evitando a degradação da ACh liberada pelos neurônios colinérgicos ainda não danificados pelo processo degenerativo.

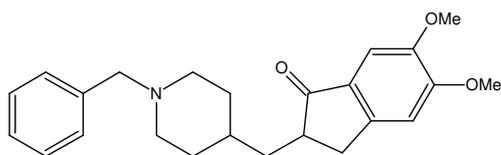
Um dos primeiros fármacos sintéticos utilizados para o tratamento da DA foi a tacrina, mas devido ao elevado risco de hepatotoxicidade, com o tempo caiu em desuso (PENG, 1995). Outros fármacos, tais como, o donepezil, a rivastigmina e a galantamina (**Figura 15**), continuam sendo usados para o controle dos sintomas de DA. Somente o donepezil é utilizado para o tratamento da DA nos estágios mais avançados. (BIRKS, 2006).

O donepezil foi o segundo medicamento a ser aprovado pelo FDA em 1996 e pela ANVISA em 2000 para o tratamento de DA pois assim como a tacrina é um inibidor reversível da AChE. Vários estudos provaram sua eficácia terapêutica (ROGERS *et al.*, 1998). O donepezil apresenta algumas vantagens em relação à tacrina. Sua meia-vida é longa, de aproximadamente 70 horas, permitindo dose única diária. Não é hepatotóxica, sendo desnecessária a monitoração laboratorial.

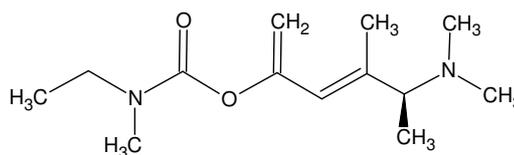
A galantamina é o fármaco mais recente desse grupo, aprovado pela FDA e pela ANVISA em 2001. A galantamina apresenta adicionalmente ação de modulação alostérica de receptores nicotínicos (ligante potenciador alostérico). Embora não esteja estabelecido com clareza o significado clínico dessa modulação, existe relação entre cognição e receptores nicotínicos. Tem meia vida de aproximadamente 7 horas, podendo ser administrada em duas doses diárias. (LEVIN & SIMON, 1998; CACABELOS *et al.*, 1999; CARAMELLI *et al.*, 2004).

Apesar de haver diferenças farmacológicas entre os inibidores de colinesterases citados acima, não há vantagens evidentes na eficácia e no perfil de efeitos adversos, além de que esses fármacos não impedem a progressão da demência. Esses medicamentos agem na inibição das colinesterases e permitem uma ação temporal maior da acetilcolina sobre os receptores colinérgicos. Tal fato permite a diminuição dos sintomas associados às fases iniciais da DA sem prejudicar, *a priori*, o metabolismo

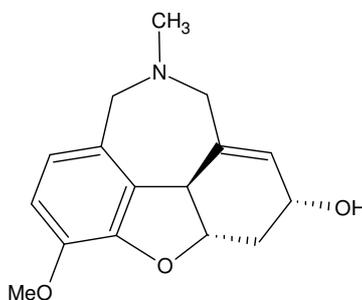
dos neurônios colinérgicos, mas não tem ação sobre as causas dessa demência, portanto não interfere no processo de produção da A β . Deste modo, apenas os aspectos cognitivos serão afetados para melhor, mas não o decorrer do processo degenerativo, sendo tais medicamentos de efeitos paliativos. Entre os efeitos adversos do uso destes medicamentos estão náuseas, problemas gastrointestinais, diarreia, perda de peso, bradicardia, síncope e insônia (DOWNEY, 2008).



Donepezil



Rivastigmina



Galantamina

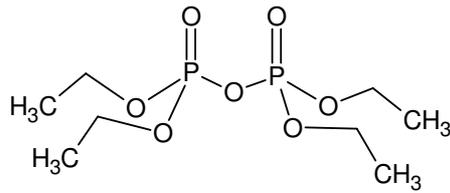
Figura 15: Inibidores comerciais da AChE

2.5.3.2 - Inibidores irreversíveis de colinesterases

Os organofosforados inibem a AChE humana irreversivelmente por fosforilação do grupo hidroxila da serina que ativa a ACh nas sinapses colinérgicas de ambos os sistemas nervosos central e periférico (PANGY *et al.*, 2003; ELHANANY *et al.*, 2001).

Eles são muito utilizados na agricultura para controlar pragas como insetos e outras espécies que danificam o cultivo, porém, ao serem aplicados podem, eventualmente, contaminar outras matrizes ambientais. Com o processo da lixiviação são carregados para os rios e mares causando um maior impacto ambiental. Consequentemente, eles se tornam tóxicos não só para as espécies-alvo mas também para muitas espécies não-alvo (SILVA FILHO, 2004).

O primeiro organofosforado utilizado como pesticida comercial foi o Bladam que tinha como princípio ativo o tetraetilpirofosfato (TEEP) (**Figura 16**).



Tetraetilpirofosfato

Figura 16: Princípio ativo do Bladan

Outro exemplo de inibidor irreversível são os metil-carbamatos que são derivados do ácido carbâmico e são substâncias conhecidas como altamente eficientes quanto à ação pesticida principalmente inseticida. Os compostos desse grupo apresentam as seguintes características: alta atividade inseticida; baixa ação residual, devido a instabilidade química das moléculas; baixa toxicidade a longo prazo, quando comparadas com derivados fosforados (SOARES, 1998).

Os metil-carbamatos são estruturalmente diferentes dos organofosforados, mas funcionam de forma similar, fazendo uma ligação no sítio ativo da enzima AChE, inibindo-a. O fato da inibição da AChE produzida pelos metil-carbamatos ser de mais curta duração é uma das diferenças destes dois grupos de compostos (SOARES, 1998).

Dados reunidos pelo instituto médico legal de 2000 a 2002 revelam que o aldicarb (um carbamato) comercializado na forma de “chumbinho” foi responsável por mais de trezentas mortes só no estado do Rio de Janeiro (FRAGA, 2010). A **Figura 17** demonstra alguns exemplos de metil-carbamatos.

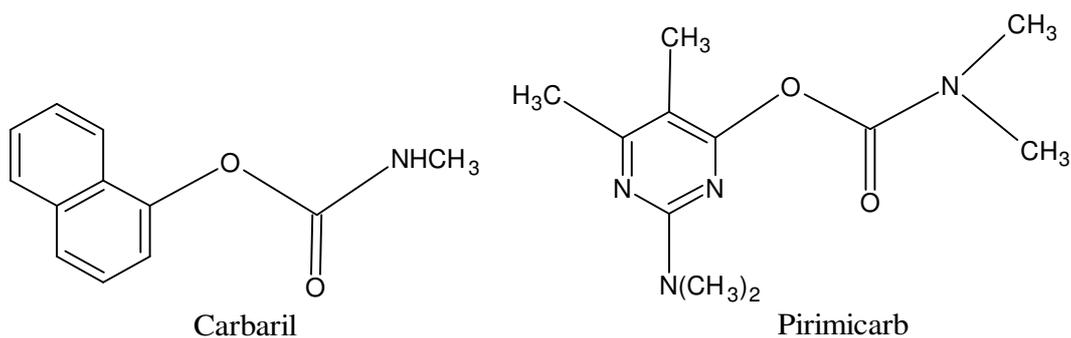


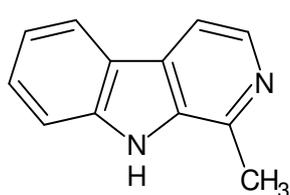
Figura 17: Exemplos de metil-carbamatos.

Os organofosforados e os metil-carbamatos inibem a enzima AChE, responsável pela hidrólise do neurotransmissor ACh nas fibras colinérgicas do sistema nervoso (CASTRO, 2002). As fibras colinérgicas são responsáveis pela estimulação de vários

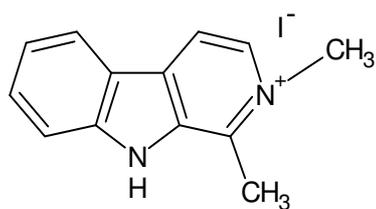
órgãos do corpo e dos músculos voluntários, ocorrendo no sistema nervoso central e nos sistemas periféricos simpático e parassimpático. Neste tipo de fibra nervosa, a ACh é responsável pela transmissão do impulso nervoso, através da sinapse, até receptores específicos, que podem ser de dois tipos, nicotínicos e muscarínicos. A terminação do impulso nervoso ocorre através da hidrólise da ACh, realizada pela AChE. Desta forma, a inibição irreversível da AChE resulta de acúmulo de ACh em todos os sítios de transmissão colinérgica, com conseqüente superestimulação das estruturas enervadas por aquelas fibras (CASTRO, 2002).

Os efeitos da acumulação da ACh (síndrome colinérgica) podem ser divididos em três tipos: centrais, muscarínicos e nicotínicos. A seqüência dos aparecimentos dos sintomas depende da rota de intoxicação e da quantidade de agente absorvido. Em intoxicações fatais, a morte ocorre por parada respiratória de origem central (depressão do centro respiratório) ou periférica (paralisia dos músculos respiratórios) (CASTRO, 2002).

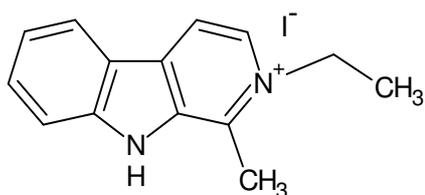
A **Figura 18** mostra os oito compostos β -carbolínicos com os quais foi feito um estudo da atividade anticolinesterásica usando a fisostigmina como controle positivo (a fisostigmina é um potente inibidor reversível de colinesterases, porém não foi aprovado como fármaco devido aos seus altos efeitos colaterais).



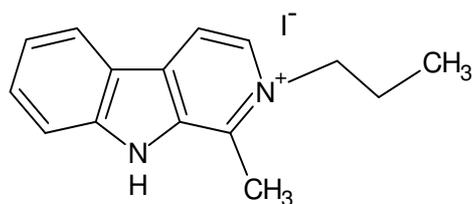
Harmana (1)



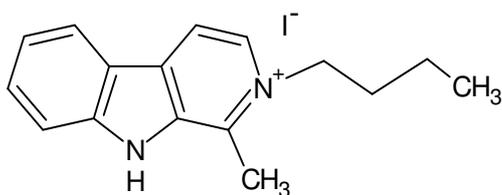
Sal de metila (2)



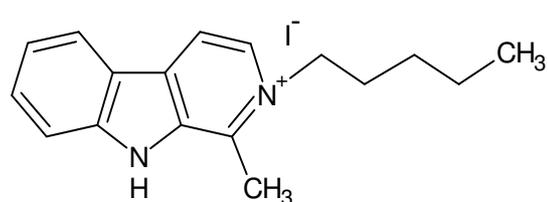
Sal de etila (3)



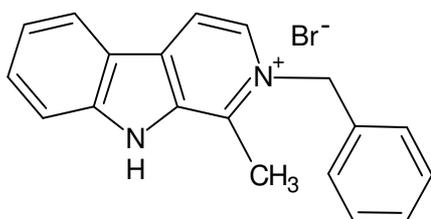
Sal de propila (4)



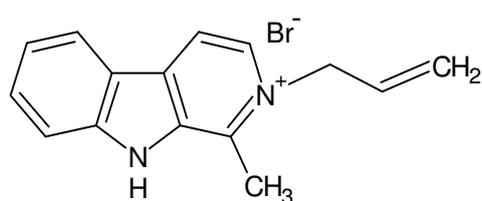
Sal de butila (5)



Sal de pentila (6)



Sal de benzila (7)



Sal de alila (8)

Figura 18: β -carbólicos estudados

3 - OBJETIVOS

1- Tendo em vista os precedentes químico-farmacológicos registrados na literatura para alcalóides β -carbólicos, espera-se com o estudo da atividade anticolinesterásica para estas substâncias, descobrir novos compostos que poderiam ser úteis no tratamento dos sintomas da DA.

2- Realizar uma avaliação com a harmana e alguns de seus derivados, a fim de determinar quais interagem com a AChE e BChE e em que grau as inibem.

3- Investigar a cinética enzimática desses compostos que interagem com AChE e BChE, utilizando o método de Ellman.

4 - PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - Materiais e métodos

4.1 a) Equipamento

A atividade da AChE, da BChE e a cinética enzimática foram determinadas usando leitora de microplaca de 96 poços marca Bio-Rad modelo i-Mark, baseando-se numa modificação do método de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961).

4.1 b) Solventes e reagentes utilizados

Os reagentes e os solventes listados abaixo, foram utilizados sem nenhum tratamento prévio.

- Tris-HCl marca Amresco;
- Ácido 5,5' - ditiobis [2-nitrobenzóico] marca Sigma Aldrich;
- Iodeto de acetiltiocolina marca Sigma Aldrich;
- Iodeto de butiriltiocolina marca Sigma Aldrich;
- Acetilcolinesterase marca Sigma Aldrich de peixe elétrico tipo VI-S;
- Butirilcolinesterase marca Sigma Aldrich de soro equino;
- Albumina sérica bovina marca Sigma Aldrich;
- Fisostigmina da marca Sigma Aldrich;
- Água destilada;
- Etanol marca Merck.

4.2 - Ensaios Químico-biológicos

Os ensaios para avaliação da atividade anticolinesterásica utilizando o método de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) e o posterior estudo cinético, foram realizados em placas de 96 poços em triplicata na ausência e na presença de compostos β -carbolínicos em diferentes concentrações. A densidade óptica foi medida utilizando leitor de microplaca de 96 poços Bio-Rad modelo i-Mark, em comprimento de onda 405nm. Foram realizados no mínimo 3 ensaios independentes, para desta forma ser calculado o desvio padrão, ou seja, a margem de erro do ensaio.

4.2.1 - Avaliação da atividade anticolinesterásica

As seguintes soluções foram preparadas: (1) tampão tris/HCl 50mM pH 8,0; (2) tampão tris/HCl 50mM pH 8,0 contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA); (3) 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoíco] (DTNB ou reagente de Ellman) 0,5mM; (4) iodeto de acetiltiocolina (ACTI) 2,5mM; (5) enzima acetilcolinesterase 0,22U/mL; (6) iodeto de butiriltiocolina (BCTI) 2,5mM e (7) enzima butirilcolinesterase 0,22U/mL.

Nas 96 cavidades da placa, foram adicionados 25 μ L de iodeto de acetiltiocolina dissolvidos no tampão (2); 125 μ L de DTNB dissolvidos no tampão (2); 50 μ L de tampão (2); 25 μ L dos compostos β -carbolínicos dissolvidos em etanol; 25 μ L da enzima (0,22U/mL) dissolvida em tampão (1) e foi então medida a absorvância (λ 405nm) a cada 13 segundos por 3 vezes, sendo a fisostigmina utilizada como controle positivo. Como está descrito na **Figura 19** abaixo, a enzima hidrolisa a acetiltiocolina (no caso da acetilcolinesterase) resultando em tiocolina que reage com o reagente de Ellman (DTNB) produzindo 2-nitro-4-tiobenzóico (cor amarela) e ácido 2-nitro-3-mercaptopitiobenzóico. As velocidades de reação foram então calculadas utilizando-se o programa de computador microplate Manager (Bio-Rad). O mesmo procedimento foi realizado para a enzima butirilcolinesterase, utilizando como substrato a butiriltiocolina.

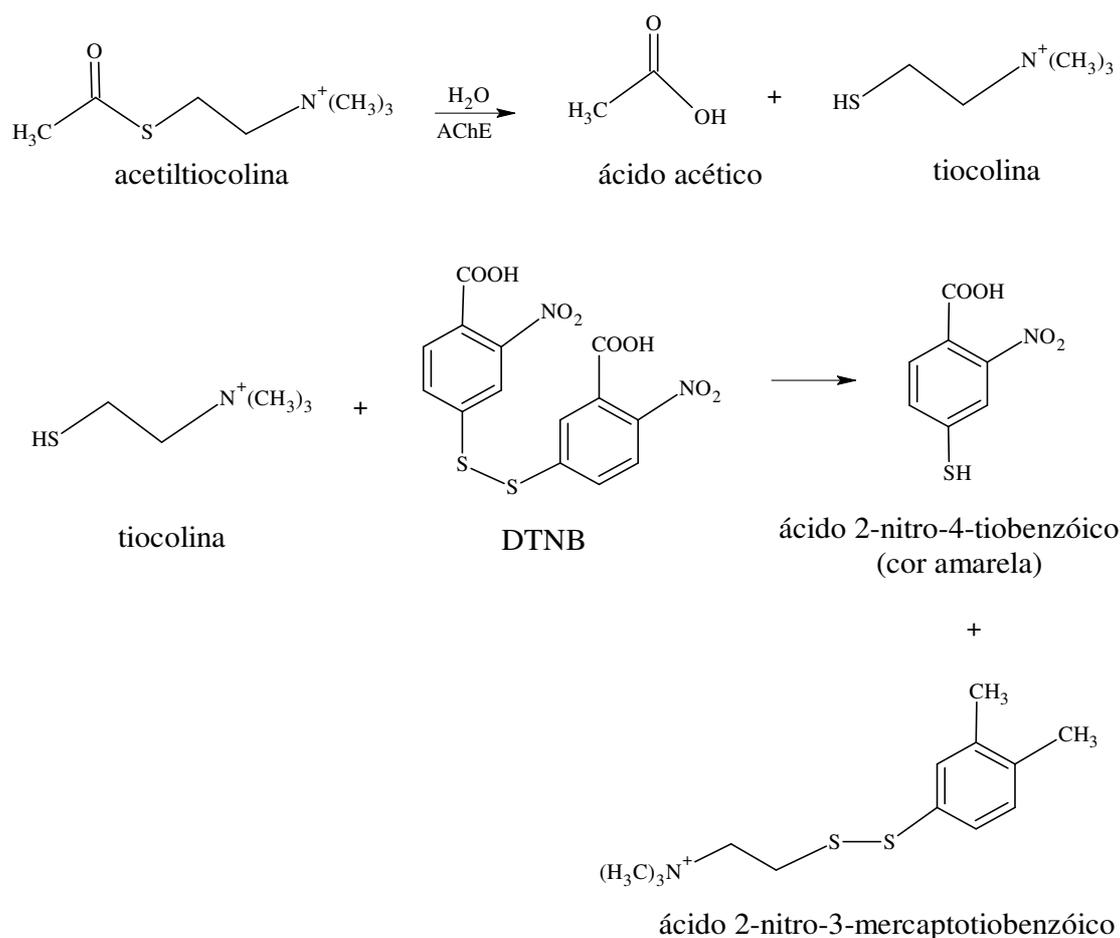


Figura 19: Reações envolvidas no método de Ellman

4.2.2 - Cinética enzimática

A cinética de interação dos β -carbolínicos com a AChE e BChE foi determinada através de gráficos de Lineweaver e Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934), onde o eixo das abcissas representa o inverso da concentração de substrato (ACTI ou BCTI) ($1/S$) e o eixo das ordenadas representa o inverso da atividade enzimática ($1/V^\circ$). Nas 96 cavidades da placa foram adicionados: 25 μ L de substrato (iodeto de acetiltiocolina 0,4mM – 2,5mM) ou (iodeto de butiriltiocolina 0,3mM – 2,5mM) dissolvido em tampão (2), 125 μ L de DTNB (0,5mM) dissolvido em tampão (2), 50 μ L de tampão (2), 25 μ L do β -carbolínico dissolvido em etanol, 25 μ L de AChE ou BChE (0,22U/mL) dissolvida em tampão (1). A absorvância é medida ($\lambda = 405\text{nm}$) a cada 13 segundos por 3 vezes, para desta forma calcular a formação de ácido 2-nitro-4-tiobenzóico. As concentrações de substrato variaram (para ACTI 0,04mM – 0,25mM e para BCTI 0,03mM – 0,25mM) na ausência e na presença do composto **1** (230 μ M e 320 μ M), composto **2** (1,5 μ M e

2,5 μ M), composto **3** (2 μ M e 4 μ M), composto **4** (4,5 μ M e 6,5 μ M), composto **5** (1,5 μ M e 3,5 μ M), composto **6** (3,5 μ M e 4,5 μ M), composto **7** (1 μ M e 2 μ M) e composto **8** (3 μ M e 6 μ M) (para AChE) e composto **1** (30 μ M e 50 μ M), composto **2** (0,1 μ M e 0,2 μ M), composto **3** (0,3 μ M e 0,6 μ M), composto **4** (3 μ M e 6 μ M), composto **5** (7 μ M e 10 μ M), composto **6** (1 μ M e 2 μ M), composto **7** (1 μ M e 2 μ M) e composto **8** (1 μ M e 2 μ M) (para BChE). Foram então deduzidos os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ através do gráfico $1/V^\circ$ contra $1/[S]$ (LINEWEAVER & BURK, 1934). Tendo caracterizado a natureza de inibição e de posse dos valores de CI_{50} , foram calculados os valores de K_I . Para uma inibição não competitiva o valor de K_I é igual ao valor do CI_{50} (CHENG & PRUSSOF, 1973).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Avaliação da atividade anticolinesterásica

Conforme citado na introdução deste trabalho, os alcalóides β -carbolínicos possuem um amplo espectro de neuroatividade. Apesar da harmana (composto **1**) ter sido investigada quanto a sua atividade anticolinesterásica há quase quarenta anos (GHOSAL *et al.*, 1972), o estudo cinético da inibição não foi feito nem tão pouco foi feita a investigação da inibição da BChE, o que nos levou a realizar um estudo mais detalhado com esta classe de compostos.

Os ensaios para a avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados em placas de 96 poços em triplicata (para o cálculo do desvio padrão) em diferentes concentrações. Após a adição da enzima, foi levada ao aparelho de ELISA e a absorvância foi medida em um comprimento de onda de 405nm. As absorvâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo da porcentagem de inibição. Assim, foram confeccionados os gráficos (concentração x porcentagem de inibição) e calculados os valores de CI_{50} (μ M), com os respectivos desvios padrões.

Todos os derivados apresentaram boa solubilidade em etanol e valores de inibição elevados em concentrações relativamente baixas, permitindo assim, calcular o percentual de inibição em diferentes concentrações e desta forma obter os valores de CI_{50} . As soluções dos compostos β -carbolínicos foram preparadas em etanol, devido a baixa solubilidade destes em meio aquoso. Apesar dos derivados serem sais, estes não apresentaram alta solubilidade em meio aquoso.

A **Tabela 1** mostra os valores de absorvâncias e concentrações para o composto **3** como exemplo da metodologia de cálculo utilizada para a avaliação da atividade anticolinesterásica.

Tabela 1: Valores de absorvâncias e concentrações do composto **3** utilizados para o cálculo do percentual de inibição da AChE com os respectivos desvios padrões (dp*).

Absorvâncias			
Concentração do composto 3 (μM)	Média \pm dp*	Média \pm dp*	Média \pm dp*
	1°	2°	3°
	Amostra	+	Enzima (A_a)
1	0,486 \pm 0,01	0,475 \pm 0,04	0,501 \pm 0,04
3	0,429 \pm 0,02	0,429 \pm 0,04	0,432 \pm 0,09
4,5	0,374 \pm 0,11	0,375 \pm 0,03	0,371 \pm 0,78
8	0,367 \pm 0,04	0,361 \pm 0,03	0,339 \pm 0,05
10	0,348 \pm 0,08	0,349 \pm 0,09	0,350 \pm 0,02
	Amostra	+	Branco (A_b)
1	0,154 \pm 0,19	0,146 \pm 0,09	0,156 \pm 0,89
3	0,147 \pm 0,23	0,153 \pm 0,07	0,156 \pm 0,06
4,5	0,156 \pm 0,90	0,166 \pm 0,09	0,169 \pm 0,56
8	0,171 \pm 0,09	0,173 \pm 0,87	0,172 \pm 0,34
10	0,150 \pm 0,67	0,153 \pm 0,90	0,160 \pm 0,34
	Controle (A_c)		Média
	0,608	0,613	0,618 0,613 \pm 0,005

A equação a seguir foi utilizada para o cálculo de percentual de inibição.

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - \frac{(A_a - A_b)}{A_c} \times 100$$

Onde:

A_a = absorvância da média da amostra ao reagir com a acetilconinesterase;

A_b = absorvância da média da amostra pura;

A_c = absorvância do controle (ausência do inibidor, 100% da atividade enzimática).

Como exemplo, abaixo é dado o procedimento para o cálculo do percentual de inibição do composto **3** na concentração 10 μM , sendo que as absorvâncias obtidas neste ensaio, estão ilustradas na **Tabela 1**.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{100 - (0,349 - 0,153)}{0,613} \times 100 = 68,02$$

A partir da porcentagem de inibição calculada para no mínimo três concentrações diferentes, foi possível confeccionar os gráficos (concentração x porcentagem de inibição), e utilizando o modelo matemático de regressão linear foram calculados os valores de CI_{50} (concentração efetiva que inibe 50% da atividade enzimática) conforme ilustrado na **Figura 20**.

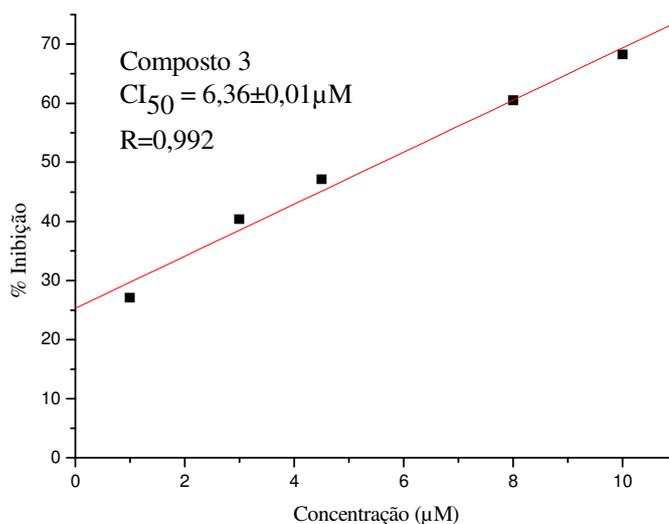


Figura 20: Inibição de AChE pelo composto 3.

A **Tabela 2** mostra os percentuais de inibição de AChE pelo composto **3** em diferentes concentrações.

Tabela 2: Percentual de inibição de AChE pelo composto 3 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	% Inibição \pm dp*
1	27,05 \pm 1,98
3	40,35 \pm 0,74
4,5	47,12 \pm 0,74
8	60,45 \pm 0,59
10	68,23 \pm 0,68

dp*=desvio padrão.

A partir dos dados das **Tabelas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19** foram construídas as curvas de percentual de inibição x concentração, e consequentemente, foram obtidas as equações correspondentes ao modelo matemático já falado, chegando assim, aos valores de CI_{50} na presença de AChE e BChE.

Tabela 3: Percentual de inibição de AChE pelo composto 1 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração(μM)	% de Inibição \pm dp*
100	28,20 \pm 1,01
300	46,48 \pm 2,00
450	59,94 \pm 0,20
600	71,60 \pm 1,31

dp* = desvio padrão

Tabela 4: Percentual de inibição de AChE pela fisostigmina e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	% de Inibição \pm dp*
0,25	7,20 \pm 0,62
0,5	25,01 \pm 0,012
1	40,61 \pm 0,005
3	92,02 \pm 0,15

dp*= desvio padrão

Tabela 5: Percentual de inibição de AChE pelo composto 2 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	% Inibição \pm dp*
1	31,60 \pm 0,83
3	44,05 \pm 0,27
6	56,60 \pm 0,41
8	65,90 \pm 0,82

dp*=desvio padrão

Tabela 6: Percentual de inibição de AChE pelo composto 4 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	% Inibição \pm dp*
3	28,69 \pm 0,37
4,5	38,15 \pm 0,78
6	46,24 \pm 0,48
8	56,09 \pm 1,32
10	61,75 \pm 0,10

dp*=desvio padrão

Tabela 7: Percentual de inibição de AChE pelo composto 5 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	%Inibição \pm dp*
0,5	22,78 \pm 0,50
1	27,16 \pm 0,01
3	45,69 \pm 1,55
4,5	55,56 \pm 0,39
6	63,05 \pm 0,57

dp*=desvio padrão

Tabela 8: Percentual de inibição de AChE pelo composto 6 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	% Inibição \pm dp*
1	29,83 \pm 0,27
3	42,69 \pm 1,63
6	51,99 \pm 0,65
8	61,63 \pm 0,25

dp*=desvio padrão

Tabela 9: Percentual de inibição de AChE pelo composto 7 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	%Inibição \pm dp*
0,25	16,80 \pm 1,08
0,5	24,02 \pm 0,11
1	33,40 \pm 0,49
2	51,55 \pm 0,30

dp*=desvio padrão

Tabela 10: Percentual de inibição de AChE pelo composto 8 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	%Inibição \pm dp*
1	14,86 \pm 0,17
6	37,65 \pm 0,13
8	46,03 \pm 0,60
10	56,12 \pm 0,66
15	68,96 \pm 0,27

dp*=desvio padrão

As **Figuras 21 a 28** apresentam a variação do percentual de inibição x concentração, além dos valores de CI_{50} para os compostos **1, 2, 4, 5, 6, 7, 8** e fisostigmina em AChE e seus respectivos desvios padrões.

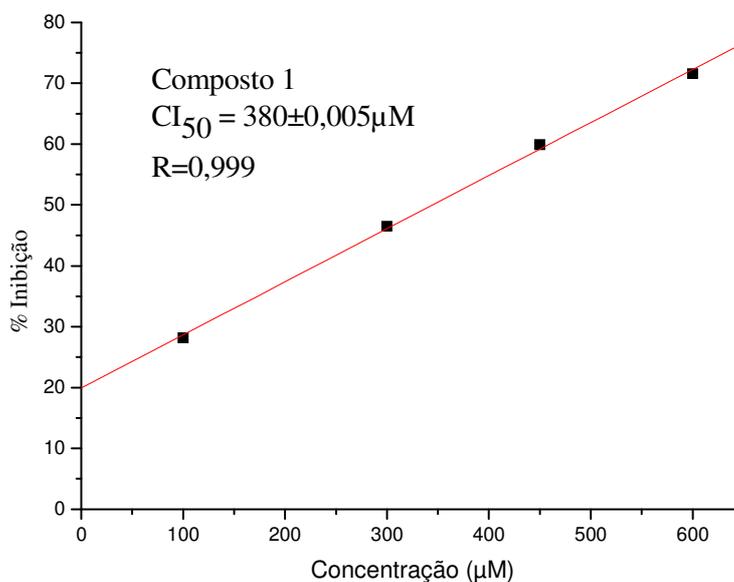


Figura 21: Inibição de AChE pelo composto 1.

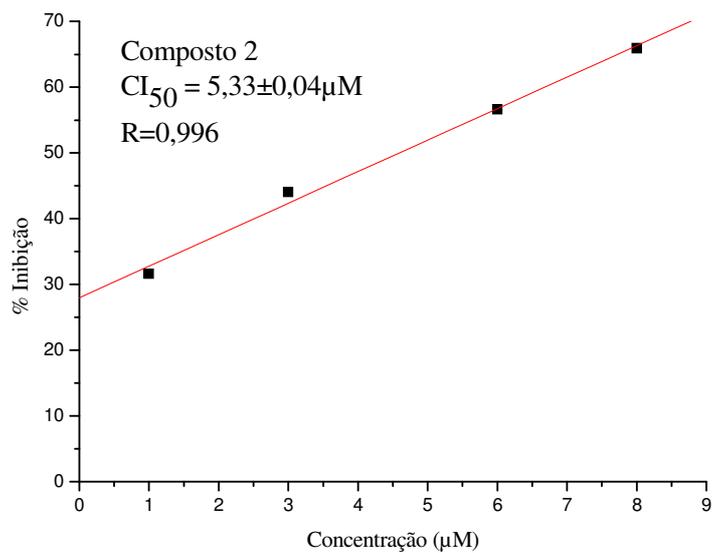


Figura 22: Inibição de AChE pelo composto 2.

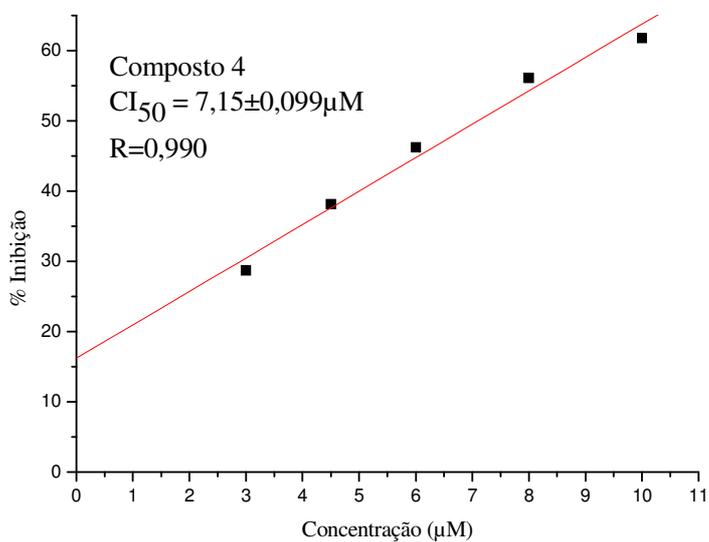


Figura 23: Inibição de AChE pelo composto 4.

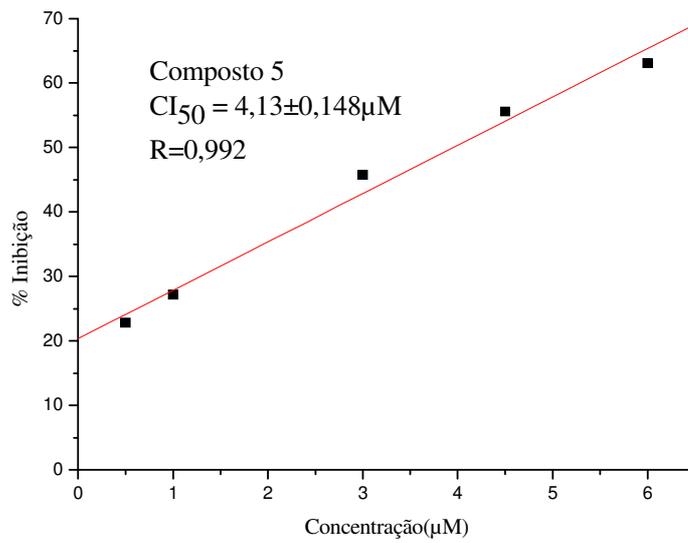


Figura 24: Inibição de AChE pelo composto 5.

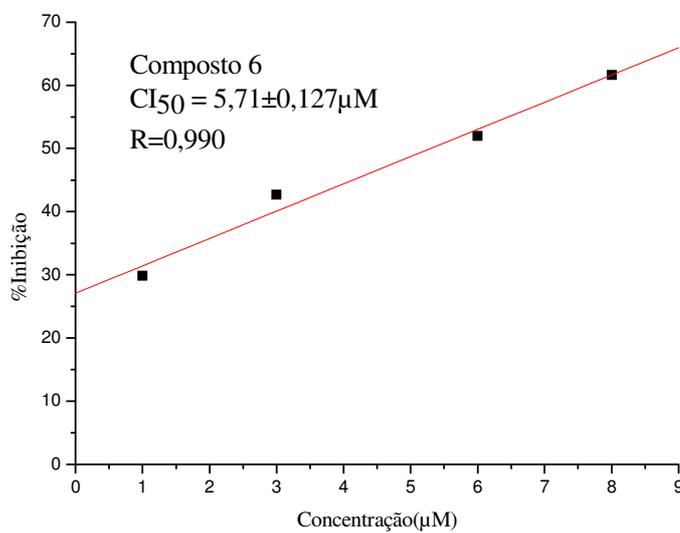


Figura 25: Inibição de AChE pelo composto 6.

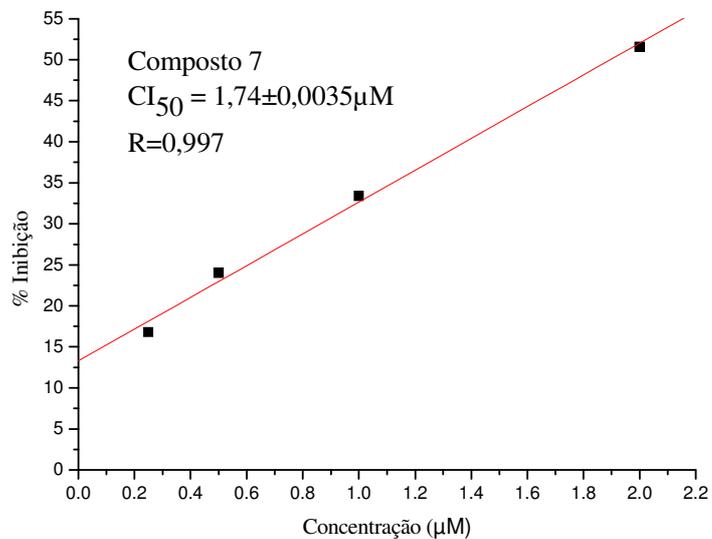


Figura 26: Inibição de AChE pelo composto 7.

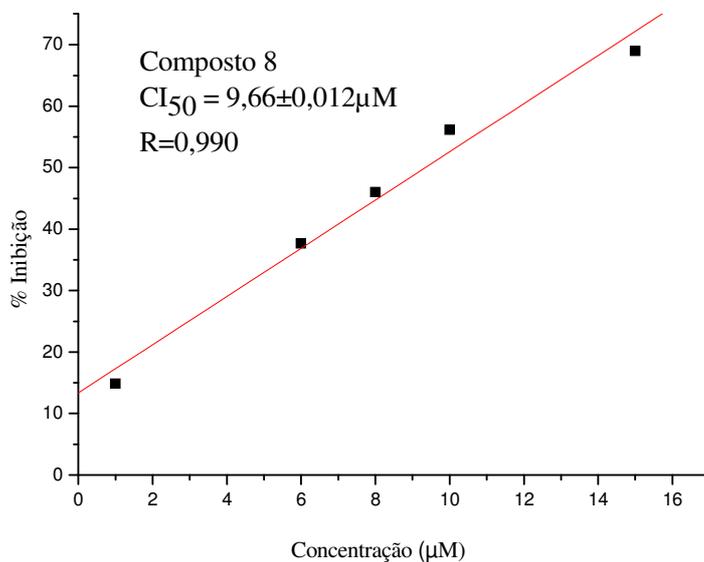


Figura 27: Inibição de AChE composto 8.

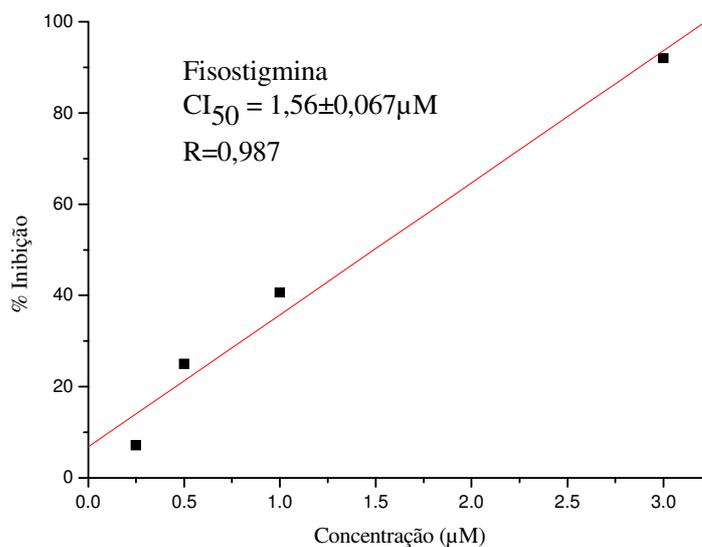


Figura 28: Inibição de AChE pela fisostigmina.

Tabela 11: Percentual de inibição de BChE pelo composto 1 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (µM)	% de inibição
40	21,44 ± 1,17
50	30,79 ± 0,33
80	42,5 ± 0,17
100	55,3 ± 0,57

dp*=desvio padrão

Tabela 12: Percentual de inibição de BChE pelo composto 2 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (µM)	% Inibição ± dp*
0,10	27,18 ± 0,76
0,20	46,42 ± 0,40
0,25	52,00 ± 0,10
0,30	59,06 ± 2,11

dp*=desvio padrão

Tabela 13: Percentual de inibição de BChE pelo composto 3 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	% Inibição \pm dp*
0,1	18,33 \pm 0,51
0,15	20,58 \pm 2,16
0,4	41,17 \pm 0,12
0,5	44,25 \pm 0,28
1	69,56 \pm 0,38

dp*=desvio padrão

Tabela 14: Percentual de inibição de BChE pelo composto 4 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	% Inibição \pm dp*
4	23,81 \pm 0,24
7	46,55 \pm 0,50
9	59,27 \pm 0,49
10	63,22 \pm 0,84

dp*=desvio padrão

Tabela 15: Percentual de inibição de BChE pelo composto 5 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	% Inibição \pm dp*
4	21,34 \pm 0,54
7	32,64 \pm 1,23
10	45,68 \pm 1,10
15	57,28 \pm 1,02
20	69,31 \pm 0,91

dp*=desvio padrão

Tabela 16: Percentual de inibição de BChE pelo composto 6 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	% Inibição \pm dp*
0,5	9,48 \pm 0,80
1	23,14 \pm 0,32
3	53,07 \pm 1,08
4	64,44 \pm 1,59

dp*=desvio padrão

Tabela 17: Percentual de inibição de BChE pelo composto 7 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	%Inibição \pm dp*
1	30,57 \pm 0,369
1,5	34,68 \pm 0,270
2	45,57 \pm 0,550
3	55,68 \pm 0,476
4	68,47 \pm 0,825

dp*=desvio padrão

Tabela 18: Percentual de inibição de BChE pelo composto 8 e seus respectivos desvios padrões.

Concentração (μM)	%Inibição \pm dp*
1,5	31,11 \pm 0,52
2	40,94 \pm 0,81
3	55,88 \pm 0,58
3,5	67,19 \pm 0,12
4	71,67 \pm 0,68

dp*=desvio padrão

Tabela 19: Percentual de inibição de BChE pela fisotigmina e seus respectivos desvios padrões.

Concentração(μM)	% de Inibição $\pm\text{dp}^*$
0,5	24,20 \pm 0,85
2,5	43,34 \pm 1,05
4	57,27 \pm 0,55
5,5	66,05 \pm 0,62

dp*=desvio padrão

As **Figuras 29 a 37** apresentam a variação do percentual de inibição x concentração para BChE, além do valor de CI_{50} para os compostos **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8** e fisotigmina e seus respectivos desvios padrões.

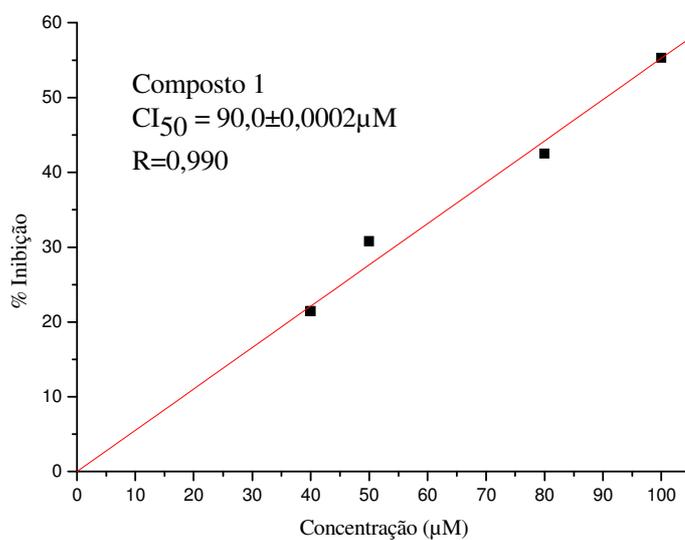
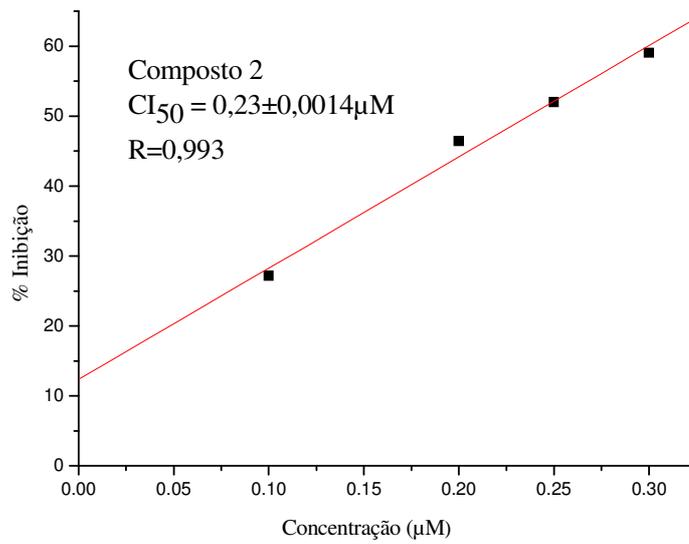


Figura 29: Inibição de BChE pelo composto 1.



]

Figura 30: Inibição de BChE pelo composto 2.

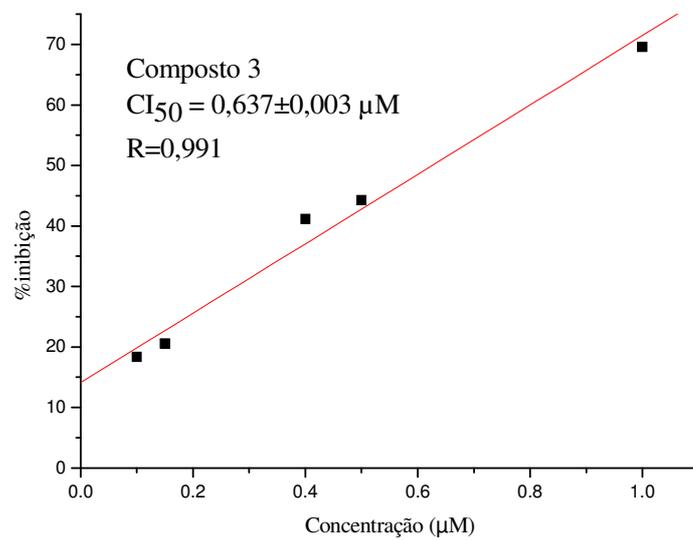


Figura 31: Inibição de BChE pelo composto 3.

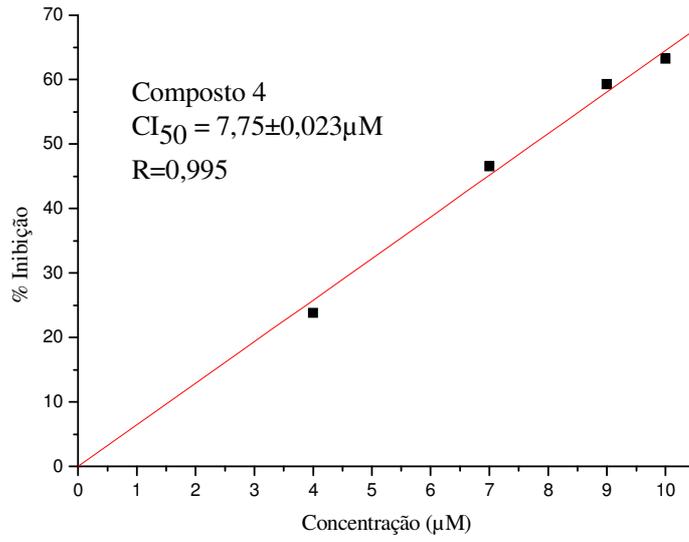


Figura 32: Inibição de BChE pelo composto 4.

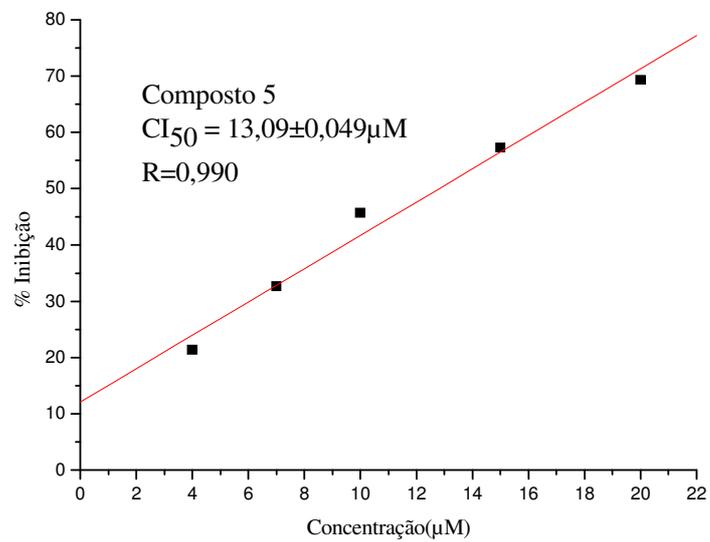


Figura 33: Inibição de BChE pelo composto 5.

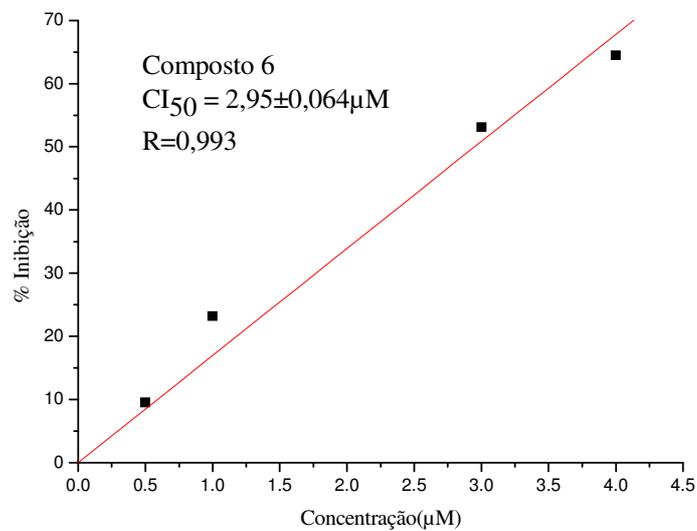


Figura 34: Inibição de BChE pelo composto 6.

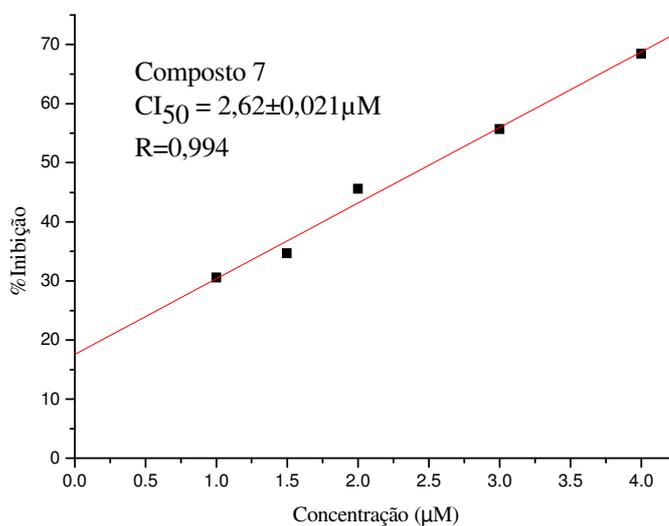


Figura 35: Inibição de BChE pelo composto 7.

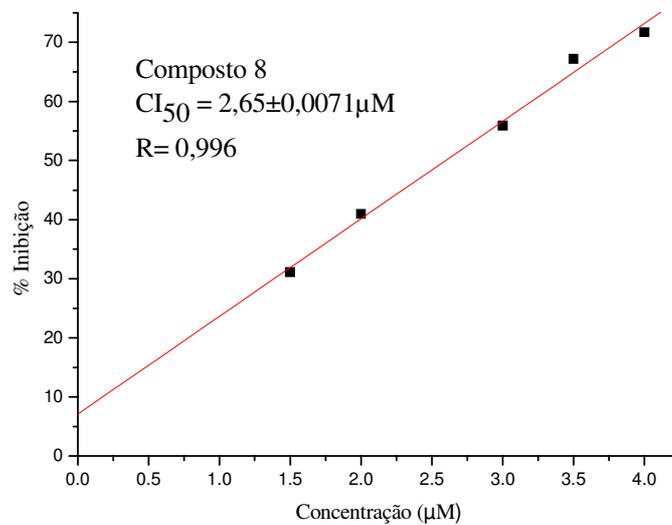


Figura 36: Inibição de BChE pelo composto 8.

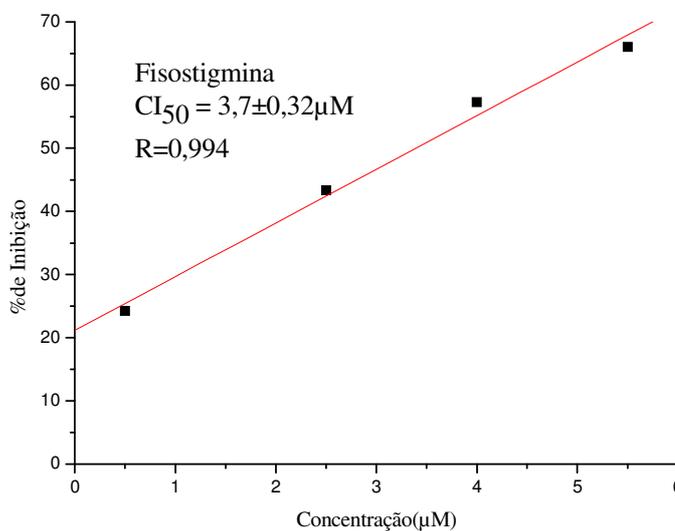


Figura 37: Inibição de BChE pela fisostigmina.

Todos os derivados testados obtiveram ótimos valores de CI_{50} tanto para AChE quanto para BChE, e o composto **7** foi o que mais se destacou visto que, o valor de CI_{50}

para tal composto em AChE e em BChE foi menor do que o valor de CI_{50} para galantamina ($CI_{50}=8,70\pm 0,05\mu M$ em AChE) e ($CI_{50}=24,4\pm 2,84\mu M$ em BChE), um dos fármacos utilizados atualmente para o tratamento da DA (BECHER *et al.*, 2005; GEISSLER *et al.*, 2010). Uma vez que o composto mais ativo foi o **7** para AChE, nota-se que este, diferentemente dos outros derivados testados, possui um anel aromático a mais em sua estrutura, ou seja, esse anel poderia estar contribuindo com a sua nuvem eletrônica, fazendo com que haja interações π - π com resíduos aromáticos da enzima, fato que deve ser relevante para uma inibição tão elevada, comparável à inibição da AChE e superior à inibição da BChE por fisotigmina.

A partir dos valores de CI_{50} encontrados para a harmana (composto **1**) e os seus derivados (compostos **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7** e **8**) foi possível observar uma queda acentuada nos valores de CI_{50} para os compostos **2** a **8** em relação ao composto **1**, tanto para AChE quanto para BChE. Isso pode ser causado devido às diferenças de interações entre a enzima e os inibidores, uma vez que no caso dos derivados poderiam ocorrer interações iônicas, devido à presença de cargas nestes compostos. Isso de certa forma é muito bom, sabendo que, quanto menor o valor de CI_{50} para uma substância, maior é o seu potencial de inibição em concentrações menores.

A **Tabela 20** mostra os valores de CI_{50} dos compostos analisados com seus respectivos desvios padrões para uma melhor observação dos dados.

Tabela 20: Valores de CI_{50} para os compostos avaliados quanto à atividade inibitória da AChE e BChE.

Compostos	AChE	BChE
	$CI_{50}(\mu M) \pm dp$	$CI_{50}(\mu M) \pm dp$
1	380±0,005	90,0±0,0002
2	5,33±0,04	0,23±0,014
3	6,39±0,078	0,637±0,003
4	7,15±0,099	7,75±0,023
5	4,13±0,148	13,09±0,049
6	5,71±0,127	2,95±0,064
7	1,74±0,035	2,62±0,021
8	9,66±0,012	2,65±0,0071
Fisostigmina	1,56±0,067	3,70±0,320

dp* = desvio padrão

Com base no CI_{50} dos compostos testados em AChE e BChE pode-se obter o valor da seletividade de cada composto que pode ser observado na **Tabela 21**.

Tabela 21: Seletividade dos compostos testados.

Compostos	Seletividade= $CI_{50} BChE/CI_{50} AChE$
1	0,236harmana
2	0,043metila
3	0,100etila
4	1,083propila
5	3,169butila
6	0,516pentila
7	1,505benzila
8	0,274alila
fisostigmina	2,370

De acordo com a **Tabela 21**, é possível observar que a seletividade, ou seja, a afinidade dos compostos pelas enzimas, parece estar relacionada com a natureza dos grupos “R” adicionados à molécula. Enquanto grupos de pequeno volume favorecem a inibição da BChE, grupos volumosos favorecem a inibição da AChE.

5.2 - Cinética Enzimática

A cinética enzimática foi realizada segundo o método de Ellman já descrito na parte experimental deste trabalho (FRANCIS *et al.*, 1999; BAYNES, 1991). A velocidade máxima da enzima e a sua constante de Michaelis-Menten (K_M) foi deduzida a partir do gráfico de Lineweaver-Burk, $1/V^\circ$ em função de $1/[S]$ que pode ser observado na **Figura 38**. Este gráfico de Lineweaver-Burk, referente ao branco, isto é, o referente à atividade máxima da enzima, fornece a reta de onde retira-se o K_M e a $V_{máx}$ da enzima. A **Tabela 22** mostra os 10 pontos que compõe o gráfico, e através deste, chega-se ao valor aproximado de K_M da enzima AChE, $0,083 \pm 0,1 \times 10^{-3} M$, que está próximo do K_M encontrado na literatura (BISSWANGER, 2008). Da mesma forma, foi obtido o valor de K_M para a enzima BChE cujo o seu valor aproximado foi $0,153 \pm 0,2 \times 10^{-3} M$. Os valores de $V_{máx}$ também foram deduzidos através do traçado de Lineweaver-Burk, obtendo os valores para a AChE $V_{máx} = 0,588 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ e para a BChE $V_{máx} = 0,833 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tabela 22: Valores de concentração do substrato [S] (mM), ABS, $1/V^\circ$ e $1/[S]$, para a realização do gráfico de Lineweaver-Burk de interação da AChE com acetiltiocolina.

[S]	ABS	$1/[S]$	$1/V^\circ \pm dp^*$
0,04	0,260	25,00	$3,841 \pm 0,004$
0,05	0,297	20,00	$3,363 \pm 0,006$
0,085	0,384	11,76	$2,601 \pm 0,010$
0,1	0,434	10,00	$2,304 \pm 0,012$
0,15	0,490	6,66	$2,039 \pm 0,015$
0,177	0,562	5,65	$1,778 \pm 0,016$
0,2	0,584	5,00	$1,711 \pm 0,023$
0,22	0,597	4,54	$1,675 \pm 0,021$
0,24	0,606	4,16	$1,650 \pm 0,022$
0,25	0,636	4,00	$1,572 \pm 0,023$

dp*=desvio padrão

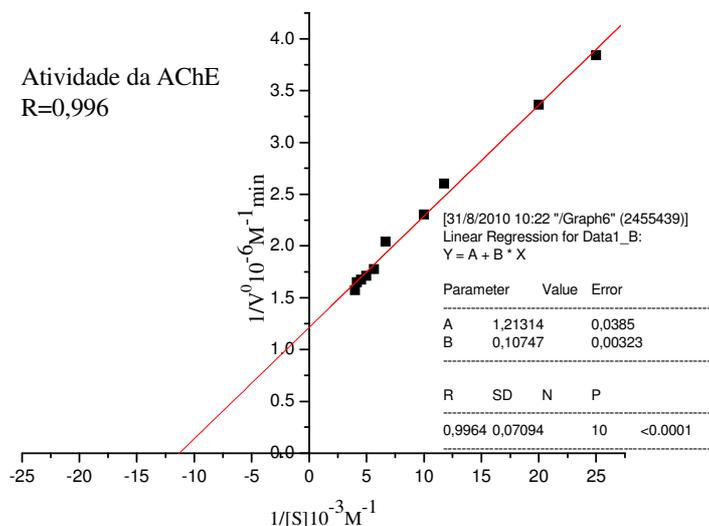


Figura 38: Gráfico de Lineweaver-Burk para a interação da acetilcolinesterase com a acetiltiocolina.

A **Tabela 23** mostra os Valores de $1/V_0$ e $1/[S]$ para o composto **3** como exemplo da metodologia de cálculo utilizado para avaliação da cinética enzimática.

Tabela 23: Valores de $1/V^0$ e $1/[S]$ para o composto 3 como demonstrativo de cálculo da cinética enzimática de AChE.

$1/[S]$	$1/V^0 \pm dp^*$	$1/V^0(2\mu M) \pm dp^*$	$1/V^0(4\mu M) \pm dp^*$
25,00	$3,580 \pm 0,004$	$4,672 \pm 0,004$	$5,450 \pm 0,004$
20,00	$2,874 \pm 0,006$	$3,997 \pm 0,004$	$4,510 \pm 0,011$
11,76	$2,306 \pm 0,010$	$3,021 \pm 0,006$	$3,466 \pm 0,005$
10,00	$2,053 \pm 0,013$	$2,774 \pm 0,007$	$3,026 \pm 0,010$
5,649	$1,604 \pm 0,015$	$2,153 \pm 0,011$	$2,506 \pm 0,009$
5,00	$1,535 \pm 0,016$	$2,105 \pm 0,012$	$2,398 \pm 0,009$
4,545	$1,500 \pm 0,018$	$2,037 \pm 0,012$	$2,381 \pm 0,009$
4,166	$1,458 \pm 0,021$	$1,961 \pm 0,013$	$2,222 \pm 0,008$
4,00	$1,448 \pm 0,011$	$1,867 \pm 0,013$	$2,165 \pm 0,010$

dp*=desvio padrão

A partir dos valores de $1/V^0$ e $1/[S]$ mostrados na **Tabela 23** foi possível confeccionar um gráfico relativo à cinética enzimática para duas concentrações diferentes de inibidor, conforme ilustrado na **Figura 41**.

Foi realizada uma investigação cinética dos compostos **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8** com o objetivo de relacionar sua estrutura com o tipo de inibição enzimática. As **Figuras 39 a 46** mostram os gráficos cinéticos relativos aos compostos **1 a 8** em duas concentrações diferentes em AChE. As **Figuras 47 a 54** mostram os gráficos cinéticos relativos aos compostos **1 a 8** em duas concentrações diferentes em BChE. A análise do perfil destes gráficos permite caracterizar a natureza da inibição.

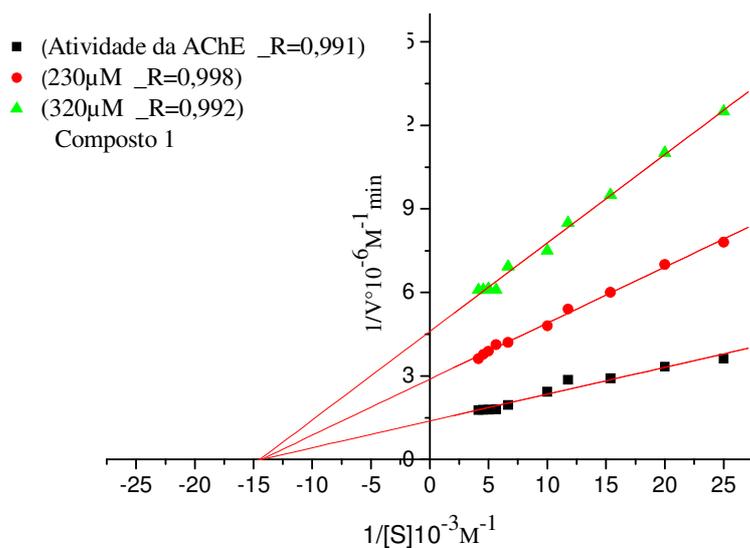


Figura 39: Cinética de inibição de AChE pelo composto 1

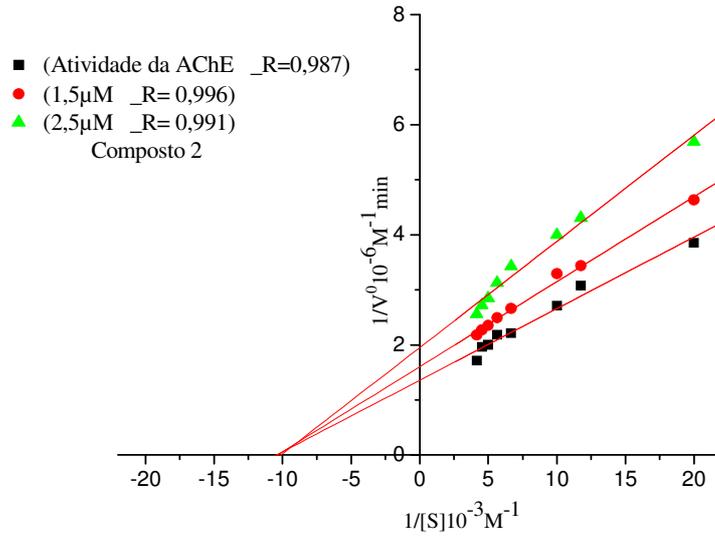


Figura 40: Cinética de inibição de AChE pelo composto 2

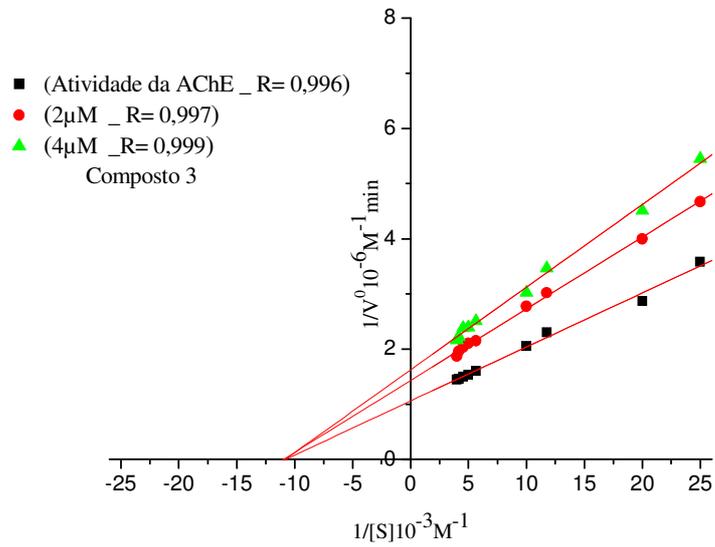


Figura 41: Cinética de inibição de AChE pelo composto 3

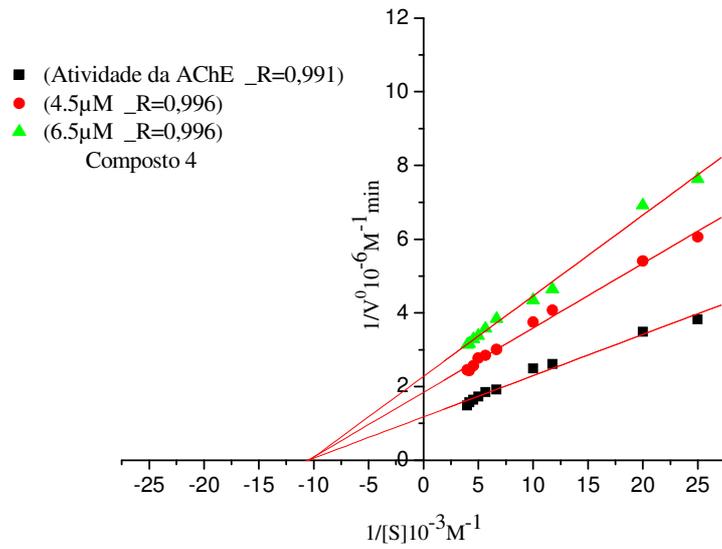


Figura 42: Cinética de inibição de AChE pelo composto 4

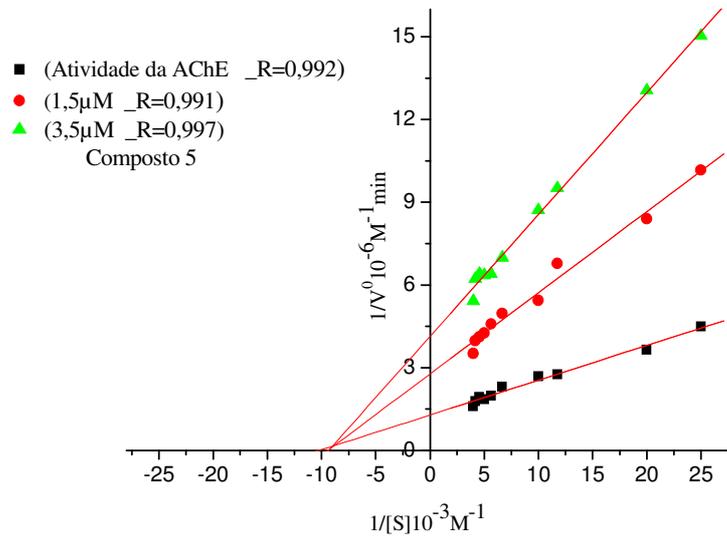


Figura 43: Cinética de inibição de AChE pelo composto 5

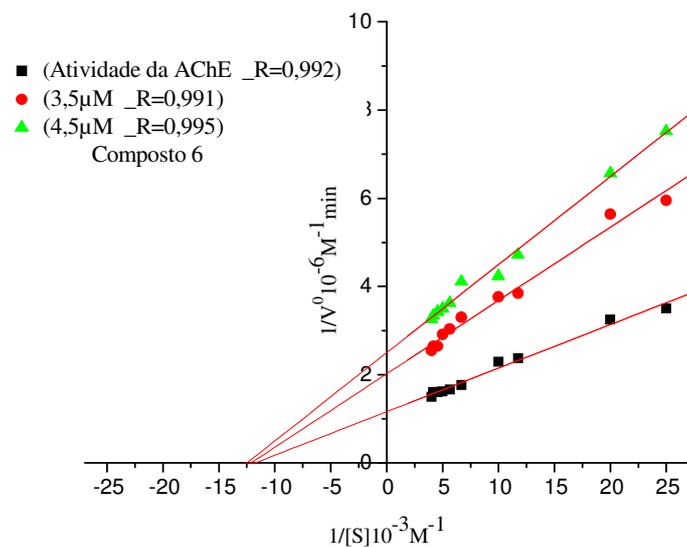


Figura 44: Cinética de inibição de AChE pelo composto 6

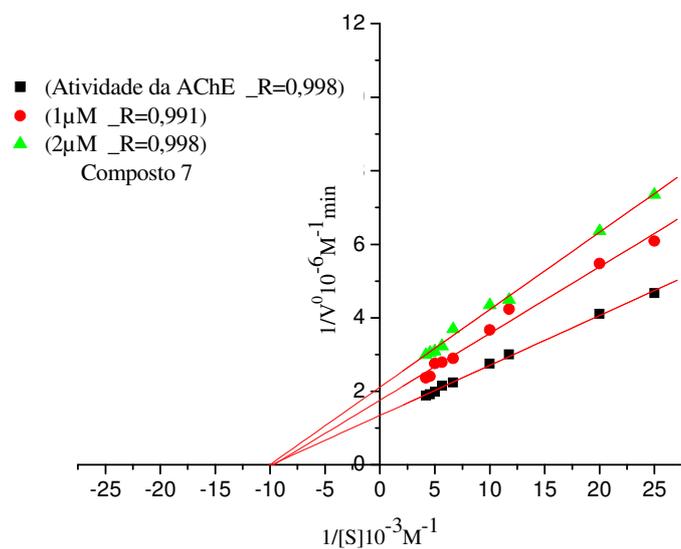


Figura 45: Cinética de inibição de AChE pelo composto 7

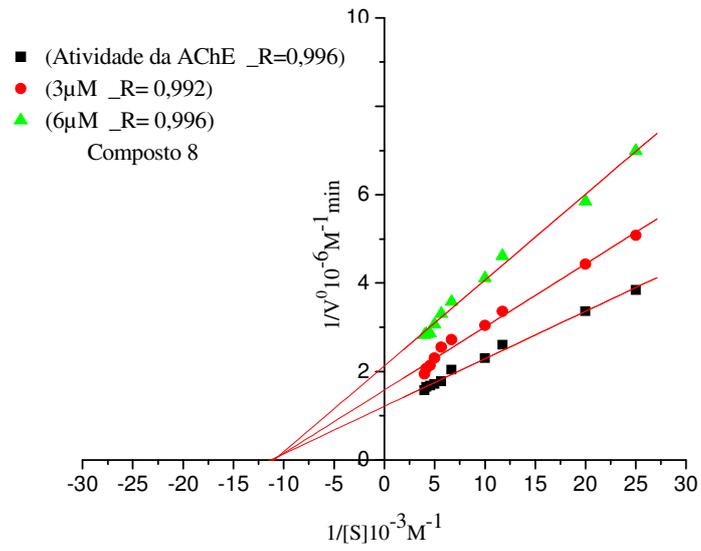


Figura 46: Cinética de inibição de AChE pelo composto 8

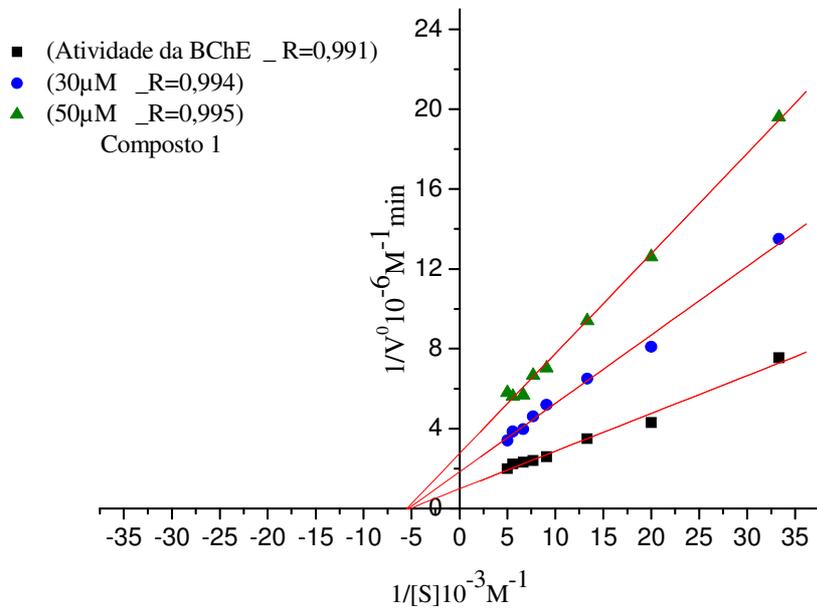


Figura 47: Cinética de inibição de BChE pelo composto 1

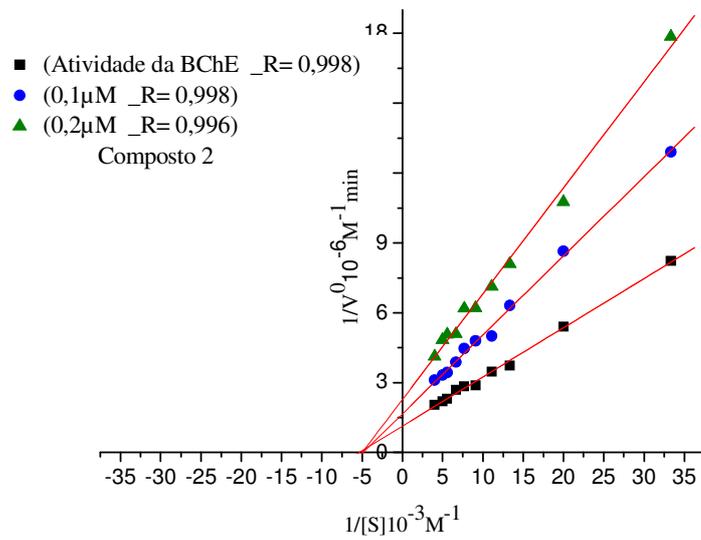


Figura 48: Cinética de inibição de BChE pelo composto 2

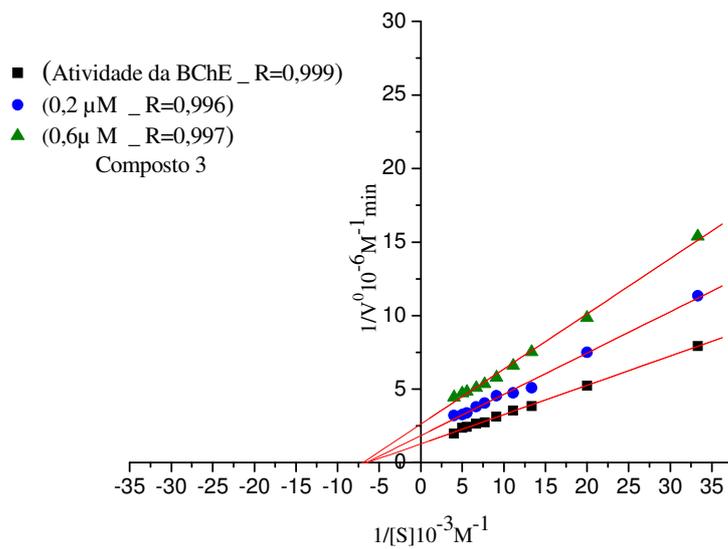


Figura 49: Cinética de inibição de BChE pelo composto 3

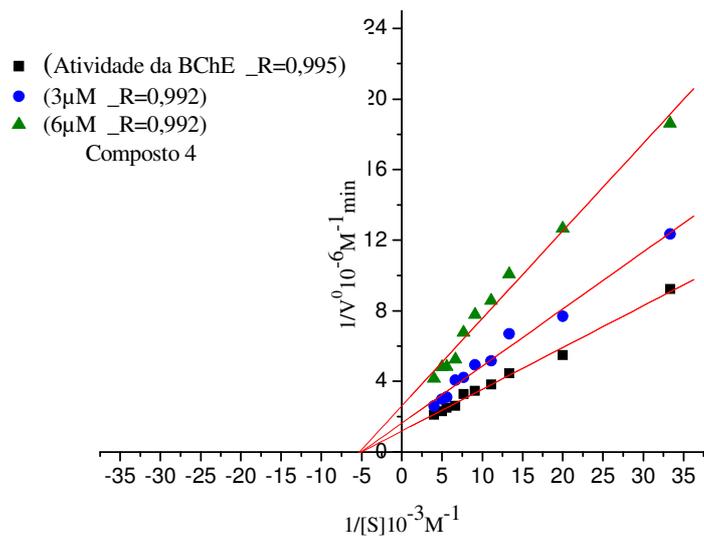


Figura 50: Cinética de inibição de BChE pelo composto 4

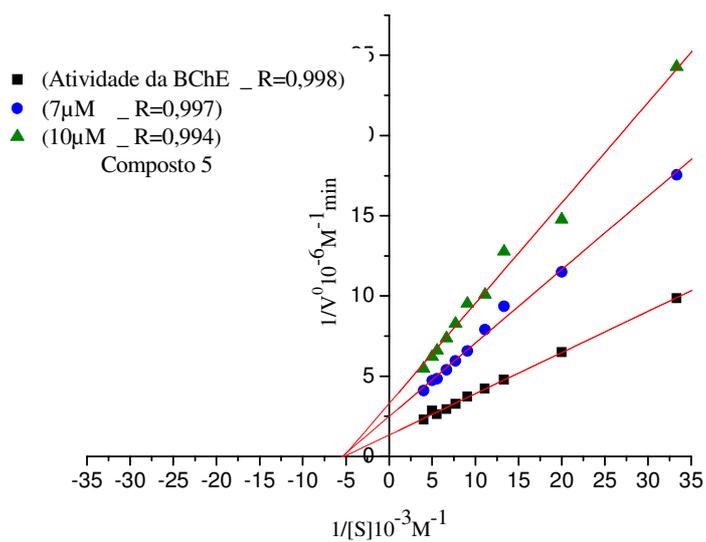


Figura 51: Cinética de inibição de BChE pelo composto 5

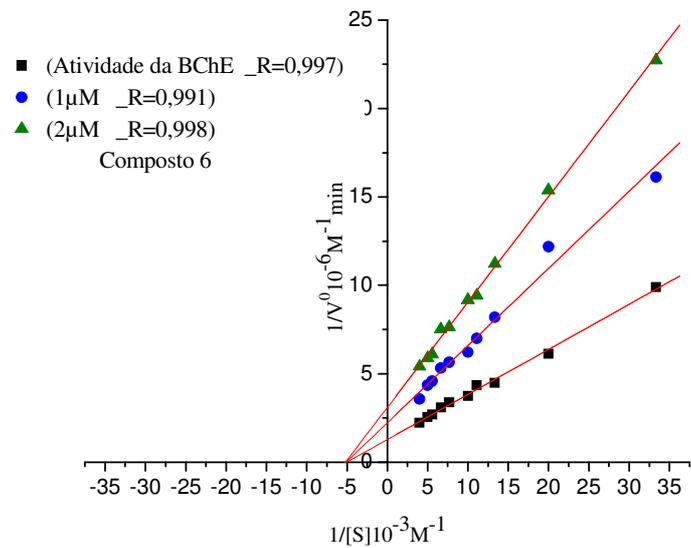


Figura 52: Cinética de inibição de BChE pelo composto 6

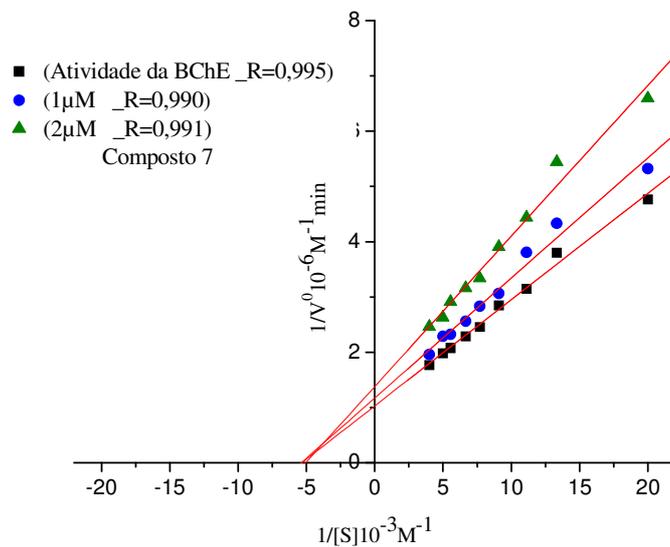


Figura 53: Cinética de inibição de BChE pelo composto 7

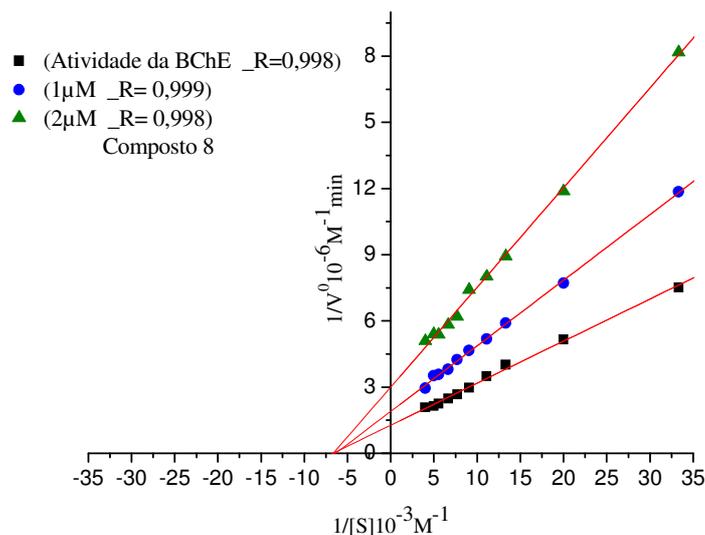


Figura 54: Cinética de inibição de BChE pelo composto 8

Com base neste estudo cinético pode-se observar que todos os compostos analisados agem como inibidores reversíveis não competitivos. Diferentemente do descrito na literatura (GHOSAL *et al*, 1972; GEISSLER *et al*, 2010), observou-se que a carga positiva destes derivados não mimetiza a subunidade colínica dos substratos endógenos, visto que observou-se uma inibição não competitiva. Este tipo de inibição é caracterizado pela interação do inibidor em um sítio próprio de ligação, e não no sítio ativo da enzima. Desta forma, esses compostos β -carbolínicos não poderiam estar imitando a forma de interação dos substratos endógenos visto que, tais substratos interagem no sítio ativo da enzima.

Como estes compostos atuam inibindo a enzima provavelmente em um sítio aniônico próximo à entrada do canal onde está o sítio ativo, isto poderia explicar a diferença nos valores de CI_{50} do composto **1** para os seus derivados. Não tendo carga positiva em sua estrutura, o composto **1** atua inibindo as enzimas apenas por interações de Van der Waals, já os seus derivados que são sais com uma carga positiva em sua estrutura, atuam inibindo as enzimas neste centro aniônico por interações iônicas que são muito mais fortes que as de Van der Waals e por isso a inibição mais acentuada.

A **Tabela 24** correlaciona o valor de CI_{50} com o valor de K_I para uma inibição do tipo não competitiva.

Tabela 24: Tabela de correlação do valor de IC₅₀ com o valor de K_I.

Compostos	CI ₅₀ (μM)		K _I (μM)	
	AChE	BChE	AChE	BChE
1	328	90	328	90
2	5,33	0,23	5,33	0,23
3	6,39	0,637	6,39	0,637
4	7,15	7,75	7,15	7,75
5	4,13	13,09	4,13	13,09
6	5,71	2,95	5,71	2,95
7	1,74	2,62	1,74	2,62
8	9,66	2,65	9,66	2,65

6 – CONCLUSÕES

A análise da atividade anticolinesterásica dos derivados β-carbolínicos (**2-8**) pelo método de Ellman, indicou que estes sais foram até 200 vezes mais potentes (**7**) em relação à harmana (**1**).

Todos os derivados forneceram ótimos valores de CI₅₀ tanto para AChE (<10μM) quanto para BChE (<15μM), indicando que estes compostos possivelmente poderiam ser utilizados contra os sintomas da DA, sendo necessário fazer os testes *in vivo* para então, se ter resultados mais precisos, uma vez que, os resultados *in vitro* estão próximos do valor de CI₅₀ do controle fisostigmina.

Todos os compostos testados agem como inibidores não competitivos, ou seja, interagem com sítios da AChE e BChE diferentes do sítio ativo.

Uma vez que o composto mais ativo foi o **7** para AChE, nota-se que este, diferente dos outros compostos testados, possui um anel aromático a mais que poderia estar contribuindo para que haja interações π-π com resíduos aromáticos da enzima.

De modo geral, a geração de carga positiva nesta série de derivados β-carbolínicos levou a um ganho considerável de potência. A seletividade parece estar relacionada ao volume e à natureza dos grupos acrescentados à molécula. Enquanto grupos de pequeno volume (metila) favorecem a inibição de BChE, a adição de grupos volumosos aromáticos (benzila) favorecem a inibição da AChE, provavelmente por realizar interações π-π com o canal enzimático da AChE, não sendo favorecidos na BChE devido ao menor número de resíduos aromáticos presentes nela.

7 - REFERÊNCIAS

AIRAKSINEN, M. M.; KARI, I. Beta-carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body 2 effects. **Medical Biology**. v. 59, pp. 190-211, 1981.

AFSAH, E. M.; HAMMOUDA, M.; HAMAMA W. S. *Pictet-Spengler* reactions of Tryptamine and tryptophan with cycloalkanones and ketonic *Mannich* bases. **Monarshefte für Chemie**. V. 116, pp. 851-855, 1985.

BARBOSA-FILHO, J.M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; DA CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Natural Products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n. 2, pp. 258-285, 2006.

BAYNES, J. W. **Bioquímica médica**. Tradução da 2º Edição. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 1991. ISBN: 978-85-352-2298-2.

BECHER, P. G.; BEUCHAT, J.; GADEMANN, K.; JÜTTNER, F. Nostocarboline: Isolation and Synthesis of a New Cholinesterase Inhibitor from *Nostoc* 78-12A. **J. Nat. Prod.** v. 68, pp. 1793-1795, 2005.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRVER, L. **Bioquímica**. 6º Edição. Guanabara Koogan, 2008. ISBN: 8527713691.

BIRKS, J.; HARVEY, R. J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. (1), CD001190, 2006.

BISSWANGER, H. **Enzimes Kinetics. Principles and methods**. 2º Edição; WILEY-VCH; VERLAG GMBH & CO.KGA, 2008. ISBN: 978-3-527-31957-2

BONNET, U.; SCHERBAUM, N.; WIEMANN, M. The endogenous alkaloid harmaline: Acidifying and activity-reducing effects on hippocampal neurons in vitro. **Progress in neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 32, pp. 362-367, 2008.

BOURNE, Y.; RADIC , Z.; KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B.; MARCHOT, P. Structural insights into conformational flexibility at the peripheral site and within the active center gorge of AChE. **Chemico-Biological Interactions**. v. 157, pp. 159-165, 2005.

BUCKHOLTZ, N. S. Neurobiology of tetrahydro-beta-carbolines. **Life Sciences**. v. 27, pp. 893-903, 1980.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**. v. 67, pp. 2141-2153, 2004.

CACABELOS, R.; TAKEDA, M.; WINBLAD, B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimers disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**. v. 14, pp. 3-47, 1999.

CALLAWAY, J. C.; GYNTHNER, J.; POSO, A.; VEPSALAINEM, J.; AIRALKSINEM, M. M. J. **Journal of Heterocyclic Chmistry**. v. 31, pp, 431-435, 1994.

CAMPOS, L.S. **Entender a Bioquímica**. 2º Edição. Lisboa: Escolar Editora, 1999. ISBN: 972-592-108-9.

CANEPA, F. G; PAULING, P.; SORUM, H. Structure of acetylcholine and other substrates of cholinergic systems. **Nature**. v. 210, pp. 907- &, 1966.

CARAMELLI, P.; CHAVES, M. L. F.; Engelhardt E, *et al*. Effects of galantamine on attention and memory in Alzheimers disease measured by computerized neuropsychological tests: results of the Brazilian Multi-Center galantamine study (GAL-BRA-01). **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. v. 62, pp. 379-384, 2004.

CASS, H. Herbs for the nervous system: Ginkgo, Kava, Valerian, Passionflower. **Seminars in Integrative Medicine**. v. 2, pp. 82-88, 2004.

CASTRO, A. T. Estudo por modelagem molecular da reativação da acetilcolinesterase inibida por agentes químicos neurológicos. 121 f. Dissertação (mestrado em área envolvida) – IME, Rio de Janeiro, 2002.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **The Biochemical Journal**. Londres, v.260, n.3, pp. 625-634, 1989.

CHENG, Y. & PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. **Biochem. Pharmacol.** v. 22, pp. 3099–3108, 1973.

CRI - CENTO DE REFERÊNCIA DO IDOSO DO HC/UFMG. Dados coletados com base nas informações do DATASUS (Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS - (SAI/SUS), e pela Gerência de Medicamentos Excepcionais (Superintendência de Assistência Farmacêutica/SES/MG), 2008.

DALE, M. C.; LEBRETTO, S. E.; PATTERSON, C.; ANDERSON, J.; CHOUDHURY, T.; MCCAFFERTY, F.; MCWILLIAM, C.; RICHARDSON, M. Clinical experience of galantamine in dementia: A series of case reports. **Current Medical Research and Opinion**. v. 19, pp. 508-518, 2003.

DESCARRIES, L.; LISIGER, V.; STERIADE M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. **Progress in Neurobiology**. v. 53, pp. 603-625, 1997.

DEVLIN, M. T. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. Tradução da 6ª Edição. Blücher, 2007. ISBN: 9788521204060.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C-5-C-25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**. v. 19, pp. 181-122, 2002.

DOWNEY, D. Pharmacologic management of Alzheimer Diseases. **Journal of Neuroscience Nursing**. v. 40, n.1, pp. 55-59, 2008.

EKHOLM, M. Predicting relative binding free energies of substrate and inhibitors of acetylcholin- and butyrylcholinesterases. **Journal of Molecular Structure-Theochem.** v. 572, pp. 25-34, 2001.

ELHANANY, E.; ORDENTLICH, A.; DGANY, O.; KAPLAN, D.; SEGALL, Y.; BARAK, R.; VELLAN, B.; SHAFFERMAN, A. Resolving pathways of interaction of covalent inhibitors with the active site of acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS analysis of various nerve agent phosphyl adducts. **Chemical Research in Toxicology.** v. 14, pp. 912-918, 2001.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. The alkaloid alstonine: a review of its pharmacological properties. **Evidence based complementary and alternative medicine.** v. 3, pp. 39-48, 2006.

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

EVANS, F. J. Natural products as probes for new drug target identification. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 32, PP. 91-101, 1991.

FAN, P.; HAY, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K., Acetylcholinesterase-Inhibitory Activity of Linarin from *Buddleja davidii*, Structure-Activity Relationships of Related Flavonoids, and Chemical Investigation of *Buddleja nitida*. **Pharmaceutical Biology,** v. 46, pp. 596-601, 2008.

FARLOW, M. R. Effective pharmacologic management of Alzheimer's disease. **American Journal of Medicine.** v. 120, pp. 388-397, 2007.

FARZIN, D.; MANSOURI, N. Antidepressant-like effect of harmaline and other β -carbolines in the mouse forced swim test. **European Neuropsychopharmacology.** v. 16, pp, 324-328, 2006.

FRAGA, A. S. Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, carboxilesterase e a resistência de peixes neotropicais aos pesticidas organofosforados. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em biociências). Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. J. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**. v. 66, pp. 137-147, 1999.

FREITAS, E. V.; *et al.* **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. Guanabara Koogan, 2002.

GEISSLER, T.; BRANDT, W.; PORZEL, A.; SCHLESNIZIG, D.; KEHLEN, A.; WESSJOHANN, L.; ARNOLD, N. Acetylcholinesterase inhibitors from the toadstool *Cortinarius infractus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 18, pp. 2173-2177, 2010.

GHOSAL, S.; BHATTACH, S. K.; MEHTA, R. Naturally occurring and synthetic beta-carbolines as cholinesterase inhibitors. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 61, (5), pp. 808, 1972.

GIACOBINE, E. In: Giacobin, E. (ed.), Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. pp. 181-226, 2000.

GLENNON, R. A.; DUKAT, M.; GRELLA, B. Binding of β -carbolines and related agents at serotonin (5-HT₂ and 5-HT_{1A}), dopamine (D₂) and benzodiazepine receptors. **Drug and alcohol dependence**. v. 60, pp. 121-132, 2000.

GOTTI, C.; CLEMENT, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. **Progress in Neurobiology**. v. 74, pp. 363-396, 2004.

GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; INGRAM, D. K. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid

peptide in rodent. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America**. v. 102, pp. 17413-17418, 2005.

GRELLA, B.; DUKAT, M.; YOUNG, R.; TEITLER, M.; DEIVIS, K. H.; GAUTHIER, C. B.; GLENNON, R. A. Investigation of hallucinogenic and related β -carbolines. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 50, pp. 99-107, 1998.

HAASS, C.; SCHLOSSMACHER, M. G.; HUNG, A. Y.; VIGO, C. P.; MELLON, A.; OSTASZEWSKI, B. L.; LIEBERBURG, I.; KOO, E. H.; SCHENK, D.; TEFLOW, D. B.; SELKOE, D. J. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. **Nature**. V. 359, pp. 322-325, 1992.

HAMANN, J.; WERNICKE, C.; LEHMANN, J. 9-Methyl- β -carboline up-regulates the appearance of differentiated dopaminergic neurones in primary mesencephalic culture. **Neurochemistry International**. v. 52, pp. 688-700, 2008.

HARDIMAN, J.; CARREL, H. L.; ZACHARIAS, D. E.; GLUSKER, J. P. The structure of harman, a comutagen. **Bioorganic Chemistry**. v.15, pp. 127-132, 1987.

HARDY, J.; ALLSOP, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.12, pp. 383-388, 1991.

HARTMANN, J.; KIEWERT, C.; DUYSSEN, E. G. Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity. **Journal of Neurochemistry**. v. 100, pp. 1421-1429, 2007.

HEMMATEENEJAD, B.; ABBASPOUR, A.; MAGHAMI, H. Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in *Peganum harmala* seed extracts. **Analytica Chimica Acta**. v. 575, pp. 290-299, 2006.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos. In: Simões, C. M. O. *et al.*, **Farmacognosia**. Da planta ao

medicamento. 1° Edição. Ed. Universidade/UFRGS. Ed. UFSC. Porto Alegre/ Florianópolis, 1999.

HERRAIZ, T.; GALISTEO, O. J.; CHAPARRO, R. C. Preparation of beta-carboline compounds, useful as inhibitors of monoamino-oxidase for treating e.g. depression, comprises enzymatic oxidation of natural tetrahydro precursors. **Consejo Superior Investigaciones Cientif.** Patent: ES2278534-A1; WO2007085679-A1; ES2278534-B1, 2008.

HERRAIZ, T.; CHAPARRO, R. C. Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and β -carbolines norharman and harman isolated from coffee. **Life Sciences.** v. 78, pp. 795-802, 2006.

HUSBANDS, S. M.; GLENNON, R. A.; GORGERAT, S.; GOUGH, R.; TYACKE, R.; CROSBY, J.; NUTT, D. J.; LEWIS, J. W.; HUDSON, A. L. Beta-carboline binding to imidazoline receptors. **Drug Alcohol Dependence.** v. 64, pp. 203-208, 2001.

ISHIDA, J.; WANG, H. K.; OYAMA, M.; COSENTINO, M. L.; HU, C. Q.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents. 46. Anti-HIV activity of harman, an anti-HIV principle from *Symplocos setchuensis*, and its derivatives. **Journal of Natural Products.** v. 64, pp. 958-960, 2001.

KATALINIC, M.; KUSAK, G.; DOMACINOVIC, J.; SINKO, G.; JELIC, D.; ANTOLOVIC, R.; DOVARIK, Z. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 45, pp. 186-192, 2010.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences.** v. 74, pp. 675- 696, 2003.

KUSURKAR, R. S.; GOSWAMI, S. K.; VYAS, S.M. Corrigendum to: Efficient one-pot synthesis of anti HIV and antitumor compounds: harman and substituted harmans. **Tetrahedron Letters.** v. 44, pp. 4761-4763, 2003.

KUSURKAR, R. S.; GOSWAMI, S. K. Efficient one-pot synthesis of anti-HIV and anti-tumour β -carboline. **Tetrahedron**. v. 60, pp. 5315-5318, 2004.

LANCTÔT, K. L., HERRMANN, N., YAU, K. K., KHAN, L. R.; LIU, B. A.; LOULOU, M. M.; EINARSON, T. R. Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in alzheimer's diseases: a meta analysis. **Canadian Medical Association or its Licensors**. v. 169, pp. 557-564, 2003.

LEVIN, E. D., SIMON, B. B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. **Psychopharmacology**. v. 138, pp. 217-230, 1998.

LIEBERMAN, S. L. Morphine with pentothal anesthesia. **Jama-Journal of the American Medical Association**. v. 127, pp. 1147-1147, 1945.

LINEWEAVER, H. BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **J. Amer. Chem. Soc.** v. 56, pp. 658-666; 1934.

LUTOMSK, J. Qualitative and quantitative chromatographic investigation of alkaloids of *Passiflora incarnata*. **Biul. Inst. Roslin Lecznicych**. v. 5, pp. 181-198, 1959.

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

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTE, L.; BON, S.; KREJCI, S.; VALLETTE, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**. v. 41, pp. 31-91, 1993.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**. v. 110, pp. 627-639, 2002.

MICHAELIS. L.; MENTEN. M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**. v. 49, pp. 333-369, 1913.

MIKAMI, L. R. Variabilidade dos Exons 2 e 4 do gene BChE e sua relação com a atividade da butirilcolinesterase. Curitiba, 2005. Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Área de genética. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

MILLARD, C.B.; BROOMFIELD. C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. San Diego, v. 189, p. 1280-1286, 1992.

MÖLLER. E. E. A FAMILY WITH ALZHEIMER'S DISEASE. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. v. 21, pp. 233-244, 1946.

MOURA, D. J.; RORIG, C.; VIEIRA, D. L. Effects of beta-carboline alkaloids on the object recognition task in mice. **Life Sciences**. v. 79, pp. 2099-2014, 2006.

MÖUSÄ, P.K.; MARTTILA, R. J.; RINNE, U. K. Survival and cause of death in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. **Acta Neurologica Scandinavica**. v. 74, n. 2, pp. 103-107, 1986.

MUDHER, A.; LOVESTONE, S. Alzheimer's disease – do tauists and baptists finally shake hands? **Trends in Neurosciences**. v. 25, n. 1, pp. 22-25, 2002.

NACHMANSOHN, D.; ROTHENBERG, M. A. Studies on cholinesterase .1. On the specificity of the enzyme in nerve tissue. *Journal of Biological Chemistry*. v. 158, pp. 653-666, 1945.

NACHMANSOHN, D.; WILSON, I. B. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**. v. 12, pp. 259-339, 1951.

NELSON, N.L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios da Bioquímica**. 3ª Edição. Sarvier, 2002. ISBN: 85-7378-125-4.

NIKOLAEV, A.; MCLAUGHLIN, T.; O'LEARY, D.; TESSIER-LAVIGNE, M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. **Nature**. v. 457, pp. 981-990, 2009.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. Em Farmacognosia: da planta ao medicamento, ed. por C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, e P. R. Petrovick, pp. 11-24, Editora UFSC/Editora UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, 2003.

NOWACKI, E.; JURZYSTA M; GORSKI P. Study on origin and protective function of alkaloids in plants. 2. Effect of availability of nitrogen on alkaloid synthesis in Solanaceae. Bulletin del Academie Polonaise des Sciences-Serie des Sciences Biologiques. v. 23, pp. 219-225, 1975.

ORHAN, I.; KARTAL, M.; TOSUN, F.; SENER, B. Screening of Various Phenolic Acids and Flavonoid Derivatives for Their Anticholinesterase Potential. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, pp. 829-832, 2007.

PANG, Y. P.; KOLLMAYER, T. M. ; HONG, F. ; LEE, J-C.; MAMMOND, P. I.; HAUGALO, K. S.; BRIMJOIN, S. Rational design of alkylene-linked bis-pyridiniumalidoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. **Chemistry & Biology**. v.10, pp. 491-502, 2003.

PATOCKA, J.; KUCA, K.; JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body. **Acta Medica**, Hradec Králové, v. 47, n.4, p.215-228, 2004.

PELLETIER, S. W.; The nature and definition of an alkaloid. In: Alkaloids and Biological Perspectives. John Wiley, New York, pp. 1-31, 1983.

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

PIAZZI, L.; CAVALLI, A.; BELLUTI, F.; BISI, A.; GOBBI, S.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; RACANATINI, M.; RAMPA, A. Extensive SAR and Computational Studies of 3-{4-[(Benzylmethylamino)methyl]phenyl}-6,7-dimethoxy-2*H*-2-chromenone (AP2238) Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 50, pp. 4250-4254, 2007.

PRATT, C. W.; CORNELLY, K. **Bioquímica Essencial**. 1^o Edição. Guanabara Koogan, 2006. ISBN: 85-277-1128-1.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 5^a edição. Elsevier. pp. 920, 2004. ISBN: 8535213686.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*: **Official Journal of the International Society on Toxicology**. v. 39, pp. 603-613, 2001.

RIVAS, P.; BRUCE, K.; CASSELS.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. Effects of some β -carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**. v. 122, pp. 27-31, 1999.

RIZZO, S.; CAVALLI, A.; CECCARINI, L.; BARTOLINI, M.; BELLUTI, F.; BISI, A.; ANDRISANO, V.; RECANATINI, M.; RAMPA, A. Structure-Activity Relationships and Binding Mode in the Human Acetylcholinesterase Active Site of Pseudo-Irreversible Inhibitors Related to Xanthostigmine. **Chemmedchem**. v. 4, pp. 670-679, 2009.

RIZZO, S.; BARTOLINI, M.; CECCARINI, L.; PIAZZI, L.; GOBBI, S.; CAVALLI, A.; RECANATINI, M.; RAMPA, A. Targeting Alzheimer's disease: Novel indanone hybrids bearing a pharmacophoric fragment of AP2238. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 18, pp. 1749-1760, 2010.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo. Premier, 1997.

ROBINSON, T. Metabolism and Function of Alkaloids in Plants. *Science*. v. 184, pp. 430-435, 1974.

ROGERS, S. L.; DOODY, R. S.; MOHS, R. C. Friedhoff LT and the Donepezil Study Group. Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, doubleblind doubleblind, placebo-controlled study. **Archives of Internal Medicine**. v. 158, pp. 1021-1031, 1998.

ROGERS, S.L.; FARLOW M. R.; MOHS, R. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. **Neurology**. v. 50, pp.136-145, 1998.

SCHUMACHER, M.; CAMP, S.; MAULET, Y.; NEWTON, M.; MACPHEEQUIGLEY, K.; TAYLOR, S.S.; FRIEDMAN, T.; TAYLOR, P. Primary structures of *Torpedo-californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. **Nature**. v. 319, pp. 407-409, 1986.

SHI, C. C.; CHEN, S. Y.; WANG, G. J. Vasorelaxant effect of Harman. **European Journal of Pharmacology**. v. 390, pp. 319-325, 2000.

SILMAN, I.; HAREL, M.; AXELSEN, P.; RAVES, M.; SUSSMAN, J. L. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase agents. **Biochemical Society transactions**. v. 22, pp.745-749, 1994.

SILVA FILHO, M. V.; OLIVEIRA, M. M.; SALLES, J. B.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; CASSANO, V. P. F.; CUNHA BASTOS, J. Methyl-paraoxon inhibition kinetics for acetylcholinesterase from brain of neotropical fishes. **Toxicology Letters**. v. 153 pp. 247-254, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G., MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**. Da planta ao medicamento. 1º Edição. Universidade/UFRGS. Ed. UFSC. Porto Alegre/ Florianópolis, 1999.

SMITH, T. W. Should Digoxin be the drug of 1st choice after diuretics in chronic congestive heart-failure - protagonists viewpoint. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 12, pp. 267-271, 1988.

SOARES, E.; S. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, v. 15, pp. 71-81, 2002.

SOARES, L. F. Intoxicações Agudas por Carbamatos em Pediatria. Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. Rio de Janeiro, 1998. (Monografia do Curso de Especialização em Pediatria) Universidade Federal Fluminense – UFF. Rio de Janeiro, 1998.

SOREQ, H.; BEN-AZIZ, R.; PRODY, C.A.; SEIDMAN, S.; GNATT, A.; NEVILLE, L.; LIEMAN-HURWITZ, J.; LEV-LEHMAN, E.; GINZBERG, D.; LIPIDOT-LIFSON, Y. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. **Proceedings of the National Academy of Science**. v. 87, pp. 9688-9692, 1990.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K., GUPTA, M. M.; KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 13 (21), pp. 5892-5908, 2005.

SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; PROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo-californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**. v. 253, pp. 872-879, 1991.

TAYLOR, P. Anticholinesterase Agents. In: Hardman, J. G.; Gilman, A. G.; Limbird, L. E. (Ed). **The Pharmacology Basis of Therapeutics**. McGraw-Hill, New York, USA, pp. 161-176, 1996.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Acetylcholine. In: Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Molinoff, P. B. (Ed). **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, Medical Aspects**. **Lippincott-Raven Publishers Philadelphia**, USA, pp. 214-242, 1999.

TURK, T.; MACEK, P.; SUPUT, D. Inhibition of acetylcholinesterase by a pseudozoanthoxanthin-like compounds isolated from the zoanthid *parazoanthus-axinellae* (o-schmidt). **Toxicon**. v. 33, pp. 133-142, 1995.

VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. M. Muscarine acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala : a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. **Progress and Neurobiology**. v. 58, pp. 409-471, 1999.

VIEGAS, C. J.; DA SILVA, V. B.; FURLAN, M.; ALBERTO, C. M. F.; BARREIRO, E. J. Produtos Naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, pp. 655-660, 2004.

WAGNER, H. Pesquisa Fitomédica do novo milênio: Tendências e mudanças. In: CECHINEL-FILHO, V., YUNES, R. A. **Química de Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2^o Edição. Itajaí: UNIVALI, pp. 31-47, 2009.

WALDEMAR, G.; DUBOIS, B.; EMER, M. The Category Cued Recall test in very mild Alzheimer's disease: discriminative validity and correlation with semantic memory functions. **European Journal of Neurology**. v. 14, n. 1, pp. 102-108, 2007.

WANI, M. C.; WALL, P. C.; HAROLD, L. T.; MONROE, E.; ANDREW, T. M. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.** V. 93, pp. 2325–2327, 1971.

ZIMMERMAN, G.; SOREQ, H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. **Cell and Tissue Research**. v. 326, pp. 655–669, 2006.