

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

Análise química e biológica em alcalóides do gênero *Hippeastrum*
(Amaryllidaceae)

Jean Paulo de Andrade

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi

Porto Alegre, 2007

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

Análise química e biológica em alcalóides do gênero *Hippeastrum*
(Amaryllidaceae)

Dissertação apresentada por **Jean Paulo de Andrade**, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi

Colaborador: Prof. Dr. Martín Cammarota

Porto Alegre, 2007

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.10.2007, pela Comissão Examinadora constituída por:

Dr. Janine Rossato

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Miriam Anders Apel

Colaboradora da Farmacopéia

Profa. Dr. Renata Pereira Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

A553a Andrade, Jean Paulo de
Análise química e biológica em alcalóides do gênero
Hippeastrum (Amaryllidaceae) / Jean Paulo de Andrade – Porto
Alegre: UFRGS, 2007. – xviii, 102 p.: il ., gráf., tab.

Dissertação(mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia.
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Farmacologia. 2. Amaryllidaceae. 3. Hippeastrum papilio. 4.
Alcalóides. I. Zuanazzi, José Ângelo Silveira. II. Cammarota, Martín.
III. Título.

CDU: 547.94:582.572.4

Bibliotecária responsável:

Claudia da Silva Gonçalves de Leon, CRB10/1012

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi, Professor Associado I da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no laboratório de Farmacognosia (505H) e na Central Analítica, desta mesma Faculdade. O trabalho contou com a colaboração do Prof. Dr. Martín Cammarota, Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), no Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUC-RS.

Todos os experimentos de investigação química foram realizados na Faculdade de Farmácia (UFRGS), com exceção das análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, que foram desenvolvidas na Facultat de Farmácia da Universitat de Barcelona. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas foi realizada no Centro de Bioequivalência de Medicamentos, da Faculdade de Farmácia (UFRGS).

Todos os experimentos relativos à análise biológica do alcalóide montanina foram realizados no Centro de Memória do IPB/PUC-RS, sob coordenação do Prof. Dr. Martín Cammarota.

Agradecemos a PROPESQ, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro e pelas bolsas concedidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, pela oportunidade de estudar e realizar sonhos, pelas vitórias que já conquistei e pela força nas horas difíceis.

Agradeço a minha família, por serem quem são, por serem cúmplices, por nos amarmos. Aos meus irmãos Jil e Jaia, por me conhecerem como ninguém, e por sempre estarem do meu lado. À minha mãe, pelos conselhos, pelo amor... pela vida.

Aos meus mais novos amigos do Centro de Memória, pessoas incríveis, excelentes pesquisadores e sempre prontos para auxílio. Creio que nossa amizade e nossa pesquisa andarão sempre juntas, daqui por diante, o que me deixa extremamente contente e confiante no caminho que escolhi.

A todos meus amigos da Faculdade de Farmácia e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas além dos meus amigos da Casa de Estudante (CEU-UFRGS), pelo companheirismo, pela amizade e pela força em todos os momentos. Em especial, ao Marcelino, pela amizade que temos, e pela força mútua que nos permitimos.

A grande família do Seu Jorge Lisboa, a Dona Tere, ao Lucanos, a Marcita e ao Cléo, pela forte amizade que temos, pelos momentos incríveis que já passamos juntos, e por vocês serem as pessoas que são.

Não poderia deixar de agradecer, aonde tudo começou, no laboratório de Farmacognosia, aos grandes amigos que já passaram por ali, os quais não há como citar todos, mas principalmente, aos colegas atuais: Marina, Rafaela, Carolina, Raquel, Letícia, Grazielle, Roger, Eduardo, Maria, Simone, Rossana, Ana Aboy, Juliana, Renata, Claudia, Taís, Laura, Bruna, além da nossa chefe, Miriam. Agradecimento especial a Professora Amélia Henriques, pelos conselhos e pela colaboração na realização deste trabalho, e agradecimento especial às minhas bolsistas; à Liana, que iniciou este trabalho comigo, e a

Kelly, bolsista extremamente dedicada, que me auxiliou muito neste trabalho, e que vai continuar nesta jornada comigo.

Agradeço a Lia Beviláqua, não apenas pela sua simpatia, mas por ser uma grande pesquisadora e ter contribuído para a realização desta dissertação. Também agradeço ao Professor Iván Izquierdo, que mesmo não tendo contato direto no cotidiano, impossível não admirá-lo como pesquisador, somado a pessoa incrivelmente humilde que é. Sem dúvida, muito honroso para mim, trabalhar próximo deste grande cientista.

Dizem que os “últimos serão os primeiros”, mas para mim, com certeza foram os mais importantes neste trabalho. Agradeço muito ao Professor Martín Cammarota, não só por tê-lo conhecido e admirar sua capacidade científica, mas principalmente por ter trabalho sob sua orientação e ter aprendido muito neste período. Com certeza, esta aprendizagem continuará no doutorado, o que me deixa muito contente. E agradeço ao grande Professor José Ângelo, não só por admirá-lo como pessoa, como professor e como pesquisador, mas principalmente por estes anos todos de orientação, desde a iniciação científica, fez com que esta cumplicidade acadêmica se transformasse numa sólida amizade. Muito obrigado Prof. Dr. José Ângelo, por tudo... e continuaremos esta caminhada científica juntos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	7
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
I.1. ASPECTOS BOTÂNICOS	13
I.1.1. Família Amaryllidaceae	13
I.1.2. Tribo <i>Hippeastreae</i>	14
I.1.3. Gênero <i>Hippeastrum</i>	15
I.1.4. Espécie <i>Hippeastrum papilio</i>	15
I.2. ASPECTOS QUÍMICOS	15
I.2.1. Alcalóides de Amaryllidaceae	15
I.2.2. Origem biossintética	17
I.2.3. Estudo químico do gênero <i>Hippeastrum</i>	20
I.2.4. Estudos químicos recentes com outros gêneros da família Amaryllidaceae	22
I.3. ASPECTOS BIOLÓGICOS	23
I.3.1. Usos populares	23
I.3.2. Atividades biológicas relatadas	24
I.3.3. Atividade sobre o sistema nervoso central e a Doença de Alzheimer	25
I.3.4. Memória e estratégias terapêuticas para a Doença de Alzheimer	27
I.3.5. História da galantamina	29
I.3.6. Alcalóide Montanina	31
CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS	37
II.1. MATERIAIS	39
II.2. MÉTODOS	42
II.2.1. Extração, isolamento e identificação dos alcalóides	42
II.2.1.1. Coleta das amostras	42
II.2.1.2. Preparação do material vegetal	42
II.2.1.3. Isolamento dos alcalóides	43

II.2.1.4. Identificação dos alcalóides.....	43
II.2.2. Detecção de inibidores da enzima acetilcolinesterase	44
II.2.3. Estudo comportamental.....	45
CAPÍTULO III – RESULTADOS	51
III.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA	53
III.1.1. Coleta.....	53
III.1.2. Rendimento dos extratos.....	53
III.1.3. Isolamento dos alcalóides	60
III.1.3.1. Raízes	60
III.1.3.2. Bulbos	63
III.2. Análise Biológica	68
III.2.1. Atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase	68
III.2.2. Tarefa de reconhecimento de objetos	69
III.2.3. Detecção de inibição da enzima acetilcolinesterase do alcalóide montanina.....	71
CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO GERAL.....	75
CAPÍTULO IV - CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Acoplamento para formação da licorina (indicada pelas setas) ...	18
Figura 2: Biossíntese a partir da tirosina radiomarcada (setas indicam o ^{14}C).....	18
Figura 3: Biossíntese a partir da fenilalanina e estrutura química da haemantamina.....	18
Figura 4: Alcalóides representativos dos 11 núcleos fundamentais de Amaryllidaceae.....	19
Figura 5: Formação dos variados tipos de núcleos dos alcalóides de Amaryllidaceae, por acoplamento oxidativo.....	20
Figura 6: Esquema para obtenção de extratos enriquecidos em alcalóides da espécie <i>Hippeastrum papilio</i>	44
Figura 7: Desenho esquemático de um dos hemisférios do cérebro de rato, mostrando a região CA1 do hipocampo dorsal (região alvo).	47
Figura 8: Perfil cromatográfico a 290 nm dos extratos obtidos da extração ácido-base de bulbos. Em A, perfil cromatográfico de extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{A}$. Em B, perfil cromatográfico do extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$. Em C, sobreposição de ambos perfis ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{A}$ e $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$), juntamente com fração <i>n</i> -butanólica (<i>n</i> -BuOH) de bulbos.....	55
Figura 9: Perfil cromatográfico a 290 nm dos extratos obtidos da extração ácido-base de partes aéreas. Em A, perfil cromatográfico de extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{A}$. Em B, perfil cromatográfico do extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$. Em C, sobreposição de ambos perfis ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{A}$ e $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$), juntamente com fração <i>n</i> -butanólica (<i>n</i> -BuOH) de partes aéreas.....	56
Figura 10: Cromatogramas obtidos a 290 nm, em comparação entre as frações enriquecidas em alcalóides $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$ (extração com HCl) e $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$ (extração com H_2SO_4), conforme indicado na figura.....	57
Figura 11: Cromatograma obtido por CG-EM, com as respectivas bases indentificadas indicadas. Em A , fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$ de bulbos; em B , fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$ de partes aéreas e em C , extrato bruto de raízes.....	58
Figura 12 Espectro de massas obtido por técnica de CG-EM do alcalóide haemantamina e proposta de fragmentação por CG-EM.....	59
Figura 13: Perfil cromatográfico de JP1, a 290 nm, apresentando três substâncias, com respectivos espectros de UV.	61
Figura 14: Cromatograma a 290 nm obtido de JP1.....	61

Figura 15: Espectro obtido por injeção direta no detector de massas de JP1	62
Figura 16: Cromatogramas obtidos por CLAE-EM mostrando dois sinais de E+1 (288,6 e 302,1) e seus respectivos tr.	62
Figura 17: Cromatograma a 290 nm do precipitado de CH ₂ Cl ₂ B (extração HCl).	63
Figura 18: Perfil cromatográfico a 290 nm da amostra JP3, e análise em UV do sinal com tempo de retenção 4,71 minutos.	66
Figura 19: Cromatograma de JP7 a 290 nm, e análise do sinal por UV.....	66
Figura 20: Cromatograma de JP11 a 290 nm, obtido por CLAE, em equipamento com detector UV-VIS.	67
Figura 21: Perfil cromatográfico a 290 nm de JP11, no qual apresenta um composto majoritário, (tr 8,654 min).	67
Figura 22: Seções das cromatoplasmas da atividade anti-acetilcolinesterase dos extratos de <i>Hippeastrum papilio</i>	68
Figura 23: Curva dose-resposta do alcalóide montanina na tarefa de reconhecimento de objetos.....	69
Figura 24: Curva temporal do alcalóide montanina na tarefa de reconhecimento de objetos.....	70
Figura 25: Inibição da enzima acetilcolinesterase pelo alcalóide montanina em relação a atividade da enzima.	71
Figura 26: Inibição da enzima acetilcolinesterase, pelo alcalóide montanina, em relação à porcentagem de inibição enzimática	71
Figura 27: Estrutura do alcalóides sanguinina, galantamina e narvedina. ..	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos químicos em alcalóides de espécies do gênero <i>Hippeastrum</i> (alcalóides isolados) e respectiva referência.....	21
Tabela 2: História da galantamina	30
Tabela 3: Sistema gradiente utilizado para análise dos extratos e alcalóides isolados de <i>Hippeastrum papilio</i>	41
Tabela 4: Sistema cromatográfico utilizado para análise por CLAE-EM.....	41
Tabela 5: Medidas envolvendo o teste de reconhecimento de objetos.	49
Tabela 6: Resultados iniciais da análise fitoquímica da espécie <i>Hippeastrum papilio</i>	53
Tabela 7: Rendimento das frações de bulbos e partes aéreas, com extração utilizando HCl.....	54
Tabela 8: Rendimento das frações de bulbos e raízes, com extração utilizando H ₂ SO ₄	54
Tabela 9: Resultados da análise por CG-EM das frações enriquecidas em alcalóides, das diferentes partes (bulbos, raízes e partes aéreas) da espécie <i>Hippeastrum papilio</i>	60
Tabela 10: Sistema gradiente de solventes CH ₂ Cl ₂ e MeOH utilizado na coluna 1.....	64
Tabela 11: Frações obtidas da coluna 1, reunidas após análise de seu perfil cromatográfico por CCD e/ou CLAE.....	64
Tabela 12: Sistema gradiente utilizado na coluna 2	66
Tabela 13: Amostras obtidas a partir da coluna 2.....	66

SIGLAS E ABREVIATURAS

ABL – amígdala basolateral

ADP e ATP – adenosina difosfato e adenosina trifosfato

AC – adenilato ciclase

ACN – acetonitrila

AChase – enzima acetilcolinesterase

ATChI – iodeto de acetiltiocolina

AMPA – ácido α -amino-3-hidróxi-5metil-isoxazol propiônico

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

CaMKII – proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina isoforma

CA1, CA2, CA3 – Corno de Amon 1, 2, ou 3, regiões do hipocampo

CC – cromatografia em coluna

CCD – cromatografia em camada delgada

CPF – córtex pré-frontal

CRE – elemento responsivo ao AMPc

CREB – proteína ligante ao CRE

pCREB – CREB fosforilada (ativada)

DA – Doença de Alzheimer

DTNB - ditiobisnitrobenzoato

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CLAE – EM – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

EtOH – etanol

ERK1/2 – proteína cinase regulada por sinal extracelular, isoformas 1 e 2

MeOH - metanol

ABA – ácido gama aminobutírico

GDP e GTP – guanosina difosfato e guanosina trisfosfato

IC₅₀ – concentração que inibe 50% do crescimento celular

IP3 – inositol trisfosfato

LAM – labirinto aquático de morris

LTM – memória de longa duração

MAPK – proteína cinase ativada por agentes mitógenos

MEK – MAPK ou ERK cinase

NMDA – *N*-metil-*D*-aspartato

NMDAr – receptor NMDA

NO – óxido nítrico

NOS – NO sintase

PDA – arranjo de diodos em série (do inglês “ photo diode array”)

PKA – proteína cinase A

PKC – proteína cinase C

PLC – fosfolipase C

Raf – fator associado a Ras

Ras – proteína G ligante de GTP

SNC – sistema nervoso central

TFA – ácido trifluoroacético

RESUMO

A pesquisa de substâncias biologicamente ativas, advinda principalmente de plantas, tem levado a descoberta de moléculas clinicamente benéficas. A família Amaryllidaceae é conhecida por sintetizar alcalóides biologicamente ativos, principalmente do grupo tetraisoquinolínico. Estudos têm demonstrado que a atividade biológica destes vegetais está relacionada com a presença deste grupo de metabólitos secundários. No Rio Grande do Sul, é encontrado o gênero *Hippeastrum*, pertencente a família Amaryllidaceae. Neste trabalho, realizou-se a investigação preliminar de alcalóides dos extratos de *Hippeastrum papilio*, coletada na região serrana do estado. Foram isoladas 12 substâncias, nas quais 9 apresentam características químicas de alcalóides de Amaryllidaceae. Estudos preliminares de CLAE-EM e CG-EM apontam para a existência de alcalóides de núcleos licorina e haemantamina, além de núcleo galantamina, em menor quantidade. Estas análises também mostram a possibilidade de estruturas inéditas. Os extratos enriquecidos em alcalóides de *Hippeastrum papilio* demonstraram uma grande capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase, pelo método da biotografia em cromatoplaça. Além disso, foi realizada a análise comportamental do alcalóide montanina, previamente isolada de *Hippeastrum vittatum*. Este alcalóide foi avaliado na tarefa de reconhecimento de objeto, com administração intrahipocampal, testado 24 horas pós-treino (memória de longa duração). Obteve-se curva dose-resposta para o alcalóide, com dose pró-cognitiva estatisticamente significativa de 1 µg/µl. Esta mesma dose foi avaliada na mesma tarefa para obtenção de curva temporal. Montanina demonstrou atividade pró-cognitiva na mesma tarefa e testada 24 horas pós-treino, em administração imediatamente pós-treino, 180 minutos pós-treino, mas não em 360 min pós-treino. O alcalóide montanina também foi avaliado quanto ao perfil de inibição da enzima acetilcolinesterase, utilizando método de ultravioleta. Obteve-se inibição da enzima em concentrações de 10 µM, 100 µM e 1 mM. Os resultados obtidos neste trabalho apontam para a necessidade de continuação da investigação química de *Hippeastrum papilio*, motivada pelo grande potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase e por possibilidade de isolamento de estruturas inéditas. Além disso, foi confirmado um grande potencial pró-cognitivo do alcalóide montanina, demonstrado comportamentalmente, além de inibir a enzima acetilcolinesterase, atividade esta necessária e importante para que uma substância seja candidata à terapia da Doença de Alzheimer.

UNITERMOS: *Hippeastrum papilio*, Amaryllidaceae, alcalóides, psicofarmacologia, atividade biológica

ABSTRACT

CHEMICAL AND BIOLOGICAL ANALYSIS OF ALKALOIDS FROM THE GENUS *Hippeastrum* (AMARYLLIDACEAE)

A search for biologically active substances in plants has led to the discovery of clinically beneficial molecules. The family Amaryllidaceae is known to synthesize biologically active alkaloids, principally of the tetraisoquinolinic group. Studies have shown that the biological activity of these plants is due to the presence of these secondary metabolites. The *Hippeastrum* genus, belonging to the Amaryllidaceae family, is found in Rio Grande do Sul. A preliminary investigation of alkaloids from extracts of *Hippeastrum papilio*, collected in the mountain region of the Rio Grande do Sul was done in this work. Twelve substances were isolated, in which nine have chemical profile of Amaryllidaceae alkaloids. Preliminary studies with HPLC-MS and GC-MS showed the existence of lycorine and haemantamine type alkaloids, as well as galantamine type alkaloids in a lower quantity. These analysis also showed a possible presence of unknown structures. The extracts, enriched in alkaloids of *Hippeastrum papilio*, demonstrated a great ability to inhibit the acetylcholinesterase enzyme by a rapid thin layer chromatography bioautographic method. Furthermore, it was done a behavior analysis of montanine, previously isolated from *Hippeastrum vittatum*. This alkaloid was evaluated in recognition object task with intrahippocampal administration and tested for 24 hours postraining (long term memory). There was found a dose-effect curve of montanine with cognitive-enhanced dose at 1µg/µl. This dose was evaluated in the same task for temporal-curve. Montanine showed pro-cognitive activity in immediately postraining administration and 180 minutes postraining but not with 360 min postraining in the same task. The acetylcholinesterase inhibition profile of montanine alkaloid was also evaluated by a ultraviolet method. The enzyme was inhibited in concentrations of 10 µM, 100 µM and 1 mM of montanine. The results obtained in the present study show a need for further chemical investigation on *Hippeastrum papilio* due to its large potential for inhibition of the acetylcholinesterase and isolation of potentially new structures. Moreover, these results confirm the great pro-cognitive potential of montanine, behaviorally demonstrated, as well as its ability to inhibit the acetylcholinesterase enzyme, which makes the alkaloid a candidate substance for the treatment of Alzheimer's Disease.

keywords: *Hippeastrum papilio*, Amaryllidaceae, alkaloids, psychopharmacology, biological activity

INTRODUÇÃO

Em toda a nossa história, a humanidade sempre buscou, não só pela curiosidade inerente do intelecto humano, mas também pela sua proximidade com a natureza, o uso de plantas e de outras fontes naturais para os mais diversos fins. Evidentemente, falar de tudo o que já foi realizado utilizando as plantas como “protagonistas” é, de fato, fazer um relato histórico de grande parte do nosso planeta. No entanto, a utilização de plantas com finalidade terapêutica, continua sendo uma constância na nossa vida, não apenas pelas numerosas patologias que acometem os seres humanos, mas pela diversidade e complexidade de estruturas químicas isoladas dos vegetais, que muitas vezes, quando por si só não se constituem em fármacos, nos dão a base para o desenvolvimento destes.

Por este motivo, a pesquisa de novos agentes biologicamente ativos obtidos por *screening* de fontes naturais, tais como extratos de plantas, têm conduzido a descoberta de muitas substâncias clinicamente benéficas, que desempenham um importante papel no tratamento de doenças humanas (SHU, 1998). As plantas são uma fonte importante de produtos naturais, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Dentre estes, os alcalóides têm se mostrado especialmente efetivos em diversas atividades biológicas e se encontram amplamente distribuídos em muitas espécies de plantas tropicais (GUERRA e NODARI, 2003).

A família botânica Amaryllidaceae é conhecida desde a Antigüidade, devido a utilização de suas espécies na medicina tradicional. Existem relatos, aproximadamente do quarto século a.C., que apontam para o uso do óleo extraído de *Narcissus poeticus*, por exemplo, para o tratamento do câncer (PETTIT *et al.*, 1986). Ainda hoje, várias espécies são utilizadas na medicina popular, principalmente no continente africano e europeu, das quais podemos citar a espécie *Brunsvigia littoralis*, com atividade antiviral, antitumoral, imunoestimulante e antimalárica (CAMPBELL *et al.*, 1998); *Crinum glaucum*, com atividade antiespasmódica (OKPO e ADEYEMI, 1998) e várias outras do gênero *Crinum*, com atividade analgésica, anticolinérgica, antitumoral e antiviral (FENNEL e STADEN, 2001), além de *Amnocharis coranica*, para o controle de desordens mentais (KOORBANALLY *et al.*, 2000) entre outras.

As diversificadas atividades terapêuticas destas espécies são atribuídas especialmente aos seus alcalóides, pertencentes à classe dos isoquinolínicos (presentes principalmente na família Amaryllidaceae), em concentrações e variedades estruturais muito interessantes. Desde 1877, quando se isolou o alcalóide licorina (COOK e LOUDON, 1952), é crescente o estudo destes alcalóides, além da avaliação de suas atividades biológicas.

Uma das áreas mais promissoras para estudos de atividades biológicas é a atividade sobre o sistema nervoso central (SNC), não só pelas inúmeras desordens que o acometem, especialmente as comportamentais, mas também pelo fato de que alcalóides têm ocupado posição de destaque em algumas estratégias terapêuticas relacionadas ao SNC (CARLINI, 2003). Atualmente, uma atividade promissora destes alcalóides, e que está sendo investigada com grande interesse, é a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase (HARVEY, 2005; LÓPEZ *et al.*, 2002, HOUGHTON *et al.*, 2004; BASTIDA, 2005; FILHO *et al.*, 2005; BERKOV *et al.*, 2007). Um bom exemplo é o alcalóide galantamina, utilizado para o tratamento da Doença de Alzheimer (LEWIS, 1994; 1997; TANI, 1998; HEINRICH e TEOH, 2004).

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Caracteriza-se, principalmente, por um progressivo declínio das habilidades intelectuais, as quais eventualmente são severas o bastante para interferir nas funções pessoais e intelectuais do indivíduo, geralmente resultando em morte (CHUNG e CUMMINGS, 2000). Uma das atividades biológicas principais da galantamina é a sua capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase, favorecendo seu emprego em várias áreas da terapêutica, incluindo a neurologia, por aumentar a transmissão colinérgica e efetividade sináptica em pacientes com a DA (SILVA, 2006), visto que uma das características mais marcantes desta doença é a perda relativamente seletiva dos neurônios colinérgicos nos núcleos basais do prosencéfalo, região cujas lesões produzem déficits cognitivos e de aprendizagem em animais experimentais (RANG *et al.*, 2001).

Além disso, estudos realizados com a galantamina, envolvendo modelo de fatias hipocâmpais de ratos e corticais de cérebro humano, mostraram a sua ação na modulação alostérica dos receptores nicotínicos, bem como melhora na

transmissão sináptica (SANTOS *et al.*, 2002). Atualmente, existem vários estudos envolvendo o papel de alcalóides na modulação de várias proteínas envolvidas com o processo da memória (VALJENT *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2001), mas poucos com alcalóides isoquinolínicos de origem natural (HERDEGEN *et al.*, 1993).

“Memória” é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações. A aquisição é também chamada de aprendizagem: só se “grava” aquilo que foi “aprendido”. A evocação é também chamada de recordação, lembrança, recuperação. Só lembramos aquilo que gravamos, aquilo que foi aprendido. A memória também pode ser dividida em declarativas (as “episódicas”, referentes a eventos dos quais assistimos ou participamos – e as “semânticas”, de conhecimento geral ou de índole geral) ou procedurais, que são as memórias de hábitos, tais como andar de bicicleta, nadar, etc. Na DA, a principal memória afetada é a declarativa episódica, assim como em outras síndromes amnésicas. Uma boa parte das memórias procedurais e algumas semânticas são preservadas em várias síndromes amnésicas, exceção feita à DA em fase terminal, e doença de Parkinson, nos seus estágios mais avançados (IZQUIERDO, 2002).

Em virtude das várias complexidades que envolvem a patogenia da DA, muitos estudos têm sido feitos buscando moléculas envolvidas na prevenção e cura desta patologia. O alcalóide galantamina tem sido o alcalóide de Amaryllidaceae mais investigado quanto à atividade sobre o SNC (SANTOS, 2002). Recentemente, nosso grupo de pesquisa isolou o alcalóide montanina de uma espécie de Amaryllidaceae nativa do nosso estado (*Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) Herbert) no trabalho de SILVA (2005). Além de atividades psicofarmacológicas apresentada por este alcalóide, tais como ansiolítica, antidepressiva e anticonvulsivante (SILVA *et al.*, 2006), o alcalóide montanina apresentou atividades de modulação (ativação) de proteínas relacionadas com procesos de formação de memórias, além de inibição da enzima acetilcolinesterase (SILVA, 2005), por método descrito por MARSTON e colaboradores (2002).

Portanto, devido ao processo metodológico característico do nosso grupo de pesquisa, de realizar análises fitoquímicas em alcalóides de espécies de Amaryllidaceae concomitantemente com realização de atividades biológicas das bases isoladas, a presente dissertação de mestrado está composta da seguinte

forma: a primeira parte da dissertação está baseada na investigação química preliminar em alcalóides, de uma espécie nativa do nosso estado, a espécie *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen. A segunda parte da presente dissertação, avalia o perfil pró-cognitivo do alcalóide montanina, em tarefas comportamentais de memória. Este alcalóide fora isolado previamente da espécie *Hippeastrum vittatum*, no trabalho de SILVA (2005).

OBJETIVOS

A presente dissertação de mestrado objetiva, portanto, a obtenção de extratos enriquecidos em alcalóides da espécie *Hippeastrum papilio*, observação do perfil de inibição da enzima acetilcolinesterase dos extratos enriquecidos e início da elucidação estrutural de seus constituintes alcaloídicos. Além disso, objetiva também a realização de estudo comportamental do alcalóide montanina, isolada de *Hippeastrum vittatum* no trabalho de SILVA (2005), para avaliar seu perfil pró-cognitivo através da tarefa de reconhecimento de objeto, com injeção intrahipocampal, em ratos.

Objetivos específicos

- Obtenção de extratos enriquecidos em alcalóide de *Hippeastrum papilio*;
- Isolar e iniciar identificação de seus alcalóides;
- Avaliar atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase dos extratos enriquecidos;
- Obtenção de curva dose-resposta do alcalóide (-)-montanina em tarefa comportamental (reconhecimento de objetos) em roedores, com injeção direta no hipocampo (administração intracerebral);
- Obtenção de curva temporal do alcalóide (-)-montanina, para a mesma tarefa, na mesma via de administração (via intrahipocampal) em roedores;
- Avaliar atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase do alcalóide (-)-montanina, por método descrito por ELLMAN e colaboradores (1961) modificado por LASSITER e colaboradores (2003);

CAPÍTULO I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

I.1.1 Família Amaryllidaceae

A família foi identificada primeiramente por Jaume St. Hilaire em 1805, sendo composta por plantas perenes ou bienais, as quais possuem bulbos (característica marcante da família, exceção feita apenas aos gêneros *Scadoxus* e *Clivia*), que podem ser qualificados como grossos e carnosos. As raízes são contrácteis e, em todos os casos conhecidos, possuem vasos com placas de perfuração escalariforme (em contraste com os freqüentemente mais avançados vasos com placas de perfuração simples, das raízes de *Alliaceae*). A haste basal é herbácea, pequena, com ramificação simpodial, geralmente dística, com as folhas basalmente concentradas. Os escapos (que suporta a inflorescência) são terminais, porém devido à ramificação simpodial podem parecer laterais (DAHLGREN *et al.*, 1985). Nesta família foram encontrados aproximadamente 14 tribos e 51 gêneros (MERROW *et al.*, 2000) e aproximadamente 870 espécies (JUDD *et al.*, 1999).

As folhas são geralmente achatadas e dorsiventrais, variando de forma linear até quase orbicular. As folhas possuem nervação paralelinérvea (veias freqüentemente indistintas), principalmente glabrosa e providas de estômatos anomocíticos, com células ricas em mucilagem ou sacos alongados com ráfides (DAHLGREN *et al.*, 1985).

O escapo, geralmente glabroso, suporta uma inflorescência umbeliforme. A inflorescência está protegida por duas a oito brácteas involucrais, as quais estão livres ou ligadas na base. As flores não são articuladas no pedicelo, sendo sempre epiginosas, trímeras e bissexuais e, na maioria dos casos, actinomórficas ou fracamente zigomórficas (fortemente apenas em *Sprekelia*). As tépalas são geralmente similares nos dois verticilos e variam de livres a ligadas dentro do tubo. Sua coloração pode ser branca, amarela, púrpura ou vermelha, porém não azul (violeta em *Grittonia*). Uma estrutura da corona perigonal, “paraperigoneo”, formando um anel ou tubo está presente em *Narcissus* (DAHLGREN *et al.*, 1985).

A família Amaryllidaceae ocorre no continente africano, principalmente na África do Sul e em alguns países da América do Sul. Essas regiões, na verdade, são

consideradas centros de diversificação primária e secundária desta família, respectivamente (ITO *et al.*, 1999). No entanto, alguns gêneros desta família podem ser encontrados também na Austrália, Malásia, países próximo ao Mediterrâneo e no continente asiático (ITO *et al.*, 1999). A família não está muito representada no Brasil, sendo encontrados os gêneros: *Amaryllis*, *Hippeastrum*, *Crinum*, *Alstroemeria*, *Clivia*, *Zephyranthes*, *Haemanthus*, *Eucharis*, *Habranthus*, *Worseleya*, *Griffinia* (MEEROW *et al.*, 1999; JOLY, 2002) e *Rodophiala* (CASTILHOS *et al.*, 2007).

I.1.2 Tribo Hippeastreae

A tribo Hippeastreae contém cerca de dez gêneros com predominante distribuição americana. São ervas que possuem vários tamanhos, com bulbos tunicados que não se apresentam fibrosos quando partidos. As folhas são lineares e achatadas, e o escapo geralmente côncavo. A inflorescência é protegida por um involúcro de duas ou quatro brácteas que podem ser livres entre si (como em *Hippeastrum* e gêneros próximos), ou mais comumente soldadas no tubo (como em *Zephyranthes* e vários gêneros próximos). As flores podem ser solitárias ou, geralmente, em inflorescências; são actinomórficas ou, freqüentemente, zigomórficas (como, em particular, em *Sprekelia*). As tépalas são praticamente livres, ou mais freqüentemente fusionadas dentro do tubo, enquanto é desprovido de um “paraperigônio” ou, quando presente, imperceptível. As anteras possuem deiscência longitudinal e os grãos de pólen são sulcados. O estilete não é espesso e os lóculos têm poucos a muitos óvulos. A fruta é uma cápsula loculicidal com sementes que são geralmente planas, secas, encrustadas com fitomelaninas e freqüentemente aladas (DAHLGREN *et al.*, 1985).

Existem ainda muitas controvérsias com relação à posição sistemática da tribo Hippeastreae. Existem vários trabalhos investigando a filogenia da família Amaryllidaceae, sendo que em uma investigação, que fez uso de seqüenciamento genético (genes *rbcL* e *trn-F*), concluiu-se na permanência da tribo Hippeastreae na família Amaryllidaceae (MEEROW *et al.*; 1999).

I.1.3 Gênero *Hippeastrum*

O gênero *Hippeastrum*, da tribo Hippeastrae, abrange cerca de aproximadamente 70 espécies (JUDD *et al.*, 1999), com distribuição desde o México até a Argentina. Consistem freqüentemente de ervas robustas com folhas achatadas, dísticas e escapo com duas brácteas livres. As flores são grandes, na maioria das vezes púrpuras ou vermelhas, afuniladas e ligeiramente zigomórficas. As tépalas são livres ou ligadas à base e os filetes são de diferentes tamanhos e mais ou menos curvados para cima (DAHLGREN *et al.*, 1985).

I.1.4 Espécie *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen

No trabalho de DUTILH (1987), existe referência à espécie *Amaryllis papilio* Rav. No entanto, até aquele momento, não havia sido feita a combinação para o gênero *Hippeastrum*, tal como ocorria com inúmeras espécies do gênero *Amaryllis*. Neste trabalho existe apenas referência à espécie *Amaryllis papilio* Rav., sem realizar sua descrição botânica mais aprofundada. No entanto, o trabalho de MEEROW e colaboradores (1997) relata a transposição do gênero *Amaryllis* para o gênero *Hippeastrum* de várias espécies, incluindo a *Amaryllis papilio* Rav., passando a ser denominada *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen. Em outro trabalho, foi feita a análise cladística de várias espécies de Amaryllidaceae, baseados em características genéticas (seqüências conservadas do DNA, inclusive da espécie em questão, *Hippeastrum papilio*), no qual se observa a formação de dois “clados” distintos: o “Hippeastroid” (no qual se encontra a *Hippeastrum papilio*) e o “Andean” (MEEROW, 2000). São os únicos trabalhos encontrados na literatura em relação à espécie *Hippeastrum papilio*.

I.2 ASPECTOS QUÍMICOS

I.2.1 Alcalóides de Amaryllidaceae

Alcalóides (termo derivado da palavra árabe *al quali*, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente obtida) são compostos nitrogenados, farmacologicamente ativos, que são encontrados predominantemente em Angiospermas (HENRIQUES *et al.*, 2003). Dentre as Angiospermas, os alcalóides

são muito comumente encontrados em dicotiledôneas. No entanto, existem alcalóides também em monocotiledôneas, sendo que as famílias que mais se destacam neste grupo são as famílias Colchicaceae e a família em estudo, Amaryllidaceae. Esta última, conta com a presença de bases alcaloidais biologicamente ativas (PETTIT *et al.*, 1986; CAMPBELL *et al.*, 1998; FENNEL e STADEN, 2001; KOORBANALLY *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2006), mas também de grande interesse taxonômico (DAHLGREEN *et al.*, 1985).

O primeiro alcalóide isolado da família Amaryllidaceae foi o alcalóide licorina, ainda no século XIX, como já dito anteriormente. No entanto, por vários anos, não ocorreu nenhum estudo químico com representantes desta família, sendo retomado apenas na metade do século passado, por volta de 1950 (MASHKOVSKY e KRUGLIKOVA-LVOVA, 1951 *apud* HEINRICH e TEOH, 2004¹; COOK e LOUDON, 1952; HENDRICKSON, 1965; GHOSAL *et al.*, 1988). O interesse inicial foi baseado principalmente nas potenciais atividades antivirais e antitumorais dos mesmos (EVIDENTE *et al.*, 2004; KARTSEV, 2005). Desde então, diversas espécies desta família foram observadas quanto seu conteúdo alcaloídico (CORDELL *et al.*, 2001).

Os alcalóides isolados desta família ainda são popularmente conhecidos como “alcalóides de Amaryllidaceae”, pelo motivo principal que, até o momento da denominação, estas bases eram encontradas exclusivamente nesta família. Esta afirmação decorria da ausência de estudos químicos em alcalóides com outras famílias. Com o passar dos anos, devido às investigações químicas com outras espécies, sabemos que estes alcalóides, que foram isolados inicialmente de Amaryllidaceae, não são exclusivos desta família. Crinamina, típico alcalóide de Amaryllidaceae, foi isolada da espécie *Dioscoreae dregeana* (família Dioscoreaceae) (MULHOLLAND *et al.*, 2002). Alcalóides como capnoidina e bulbocapnina já foram encontrados em espécies de Papaveraceae, Fumariaceae e Laureaceae (KAYA *et al.*, 2004). Além disso, espécies de Amaryllidaceae também sintetizam alcalóides que são comumente encontrados em outras famílias. Em estudo com a espécie *Hippeastrum equestre*, por exemplo, se obteve, além de alcalóides já conhecidos à

¹ MASHKOVSKY e KRUGLIKOVA-LVOVA. On the pharmacology of new alkaloid galantamine. **Farmakologia Toxicologia**, Moskow, 1951, 14, p. 27-30 (in Russian) *apud* HEINRICH, M.; TEOH, H. L. Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer’s disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, p.147-162, 2004.

época, o alcalóide egonina, do tipo mesembrina, típico integrante da família Aizoaceae (PHAM *et al.*, 1999).

I.2.2 Origem biossintética

Os estudos a respeito da biossíntese dos alcalóides de Amaryllidaceae iniciaram na década de 50. Inicialmente, existiam duas propostas para a biossíntese destes alcalóides: a primeira (BARTON e COHEN, *apud* BATTERSBY e BINKS, 1960)² se baseava na possibilidade de acoplamento oxidativo de precursores fenólicos que formariam intermediários adequados para a conversão nos vários tipos de alcalóides de Amaryllidaceae, podendo ocorrer, por exemplo, acoplamento *orto-para*, que era requerido para formação da licorina (**Figura 1**); a segunda proposta (WENKERT, *apud* BATTERSBY e BINKS, 1960)³ se baseava em precursores reduzidos do ácido chiquímico e do ácido prefênico formando uma amida que, após alguns passos de estabilização, formaria a licorina. Dessa forma, BATTERSBY e BINKS (1960) iniciaram as pesquisas envolvendo tirosina radiomarcada com plantas do gênero *Narcissus*, e obtiveram como resultado a presença do alcalóide norpluvina radiomarcado. Os mesmos autores (BATTERSBY e BINKS, 1961) constataram que a norpluvina continuava sendo sintetizada a partir da tirosina, sustentando a primeira hipótese. Além disso, foi sugerida ainda a formação de um precursor, pois a incorporação da base norbeladina na base norpluvina foi bem mais acentuada do que a incorporação direta da tirosina radiomarcada (**Figura 2**).

Os estudos envolvendo tirosina radiomarcada prosseguiram. WILDMAN e colaboradores (1962) estudaram a espécie *Sprekelia formosissima*, utilizando o composto radiomarcado 3-C¹⁴-tirosina, que radiomarcou os compostos haemantamina, haemantidina e tazetina, nas posições C e D (**Figura 3**). JEFFS (1962) também chegou aos mesmos resultados. No mesmo ano, SUHADOLNIK e colaboradores (1962), em estudo incorporando compostos radioativos, observou que a unidade 3-C¹⁴-fenilalanina originou o anel A e a unidade 3-C¹⁴-tirosina originou o fragmento C₆C₂ (anéis C e D) (**Figura 3**).

² BARTON e COHEN. Festschrift Arthur Stoll, Birkhäuser Verlag, Basle, 1957, p. 117 *apud* BATTERSBY, A. R.; BINKS, R. Biosynthesis of lycorine. **Proceedings of the Chemical Society**, p. 410, 1960.

³ WENKERT, *Experientia*, 1959, 15, 165 *apud* BATTERSBY, A. R.; BINKS, R. Biosynthesis of lycorine. **Proceedings of the Chemical Society**, p. 410, 1960.



Figura 1. Acoplamento para formação da licorina (indicada pelas setas).

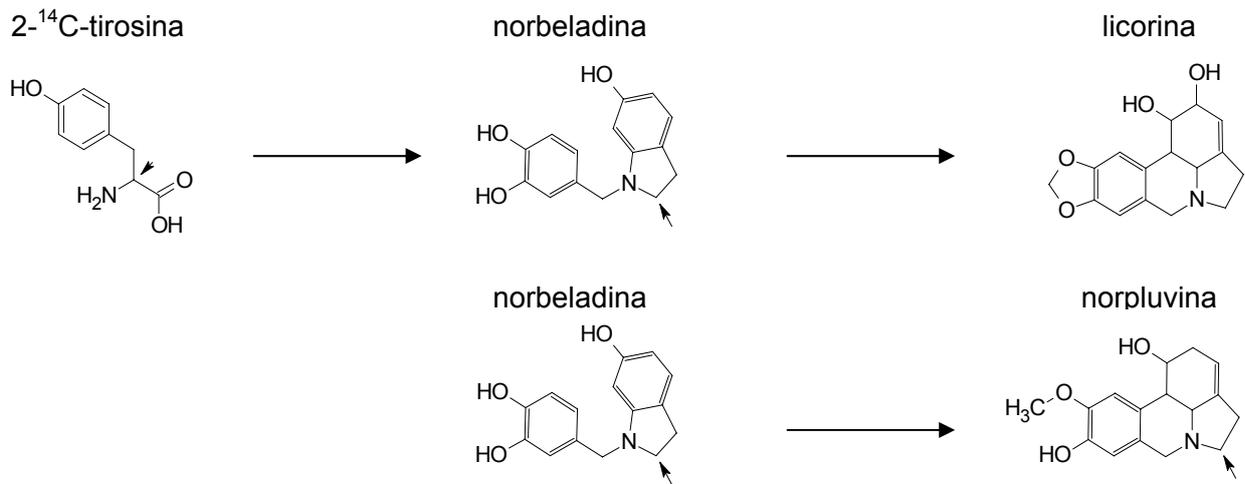


Figura 2: Biossíntese a partir da tirosina radiomarcada (setas indicam o ¹⁴C).

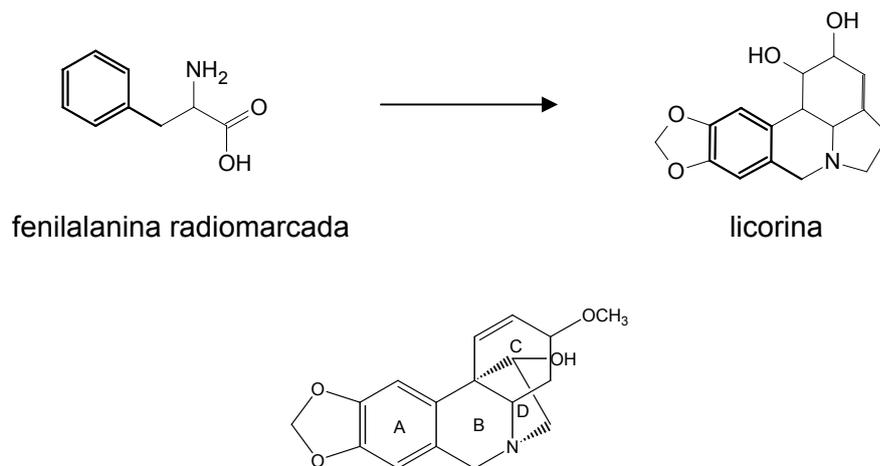


Figura 3. Biossíntese a partir da fenilalanina e estrutura química da haemantamina.

Posteriormente confirmou-se a origem biogenética, a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, formando a estrutura básica do anel tetraidroisoquinolínico (BRUNETON, 2001). Atualmente, os alcalóides de Amaryllidaceae podem ser classificados em 11 grandes grupos de núcleos fundamentais (**Figura 4**) (HOSHINO, 1998; ÜNVER *et al.*, 1999; ÜNVER *et al.*, 2003). Em recente estudo a respeito dos tipos de acoplamento oxidativo para formação dos variados núcleos, foi estabelecido as formas *para-ortho'* (para o tipo galantamina, por exemplo), *ortho-para'* e *para-para'* (**Figura 5**) (BASTIDA, 2006). A 4-O-metilnorbeladina é considerada o precursor universal dos alcalóides de Amaryllidaceae (EICHHORN *et al.*, 1998; BRUNETON, 2001; BASTIDA, 2006).

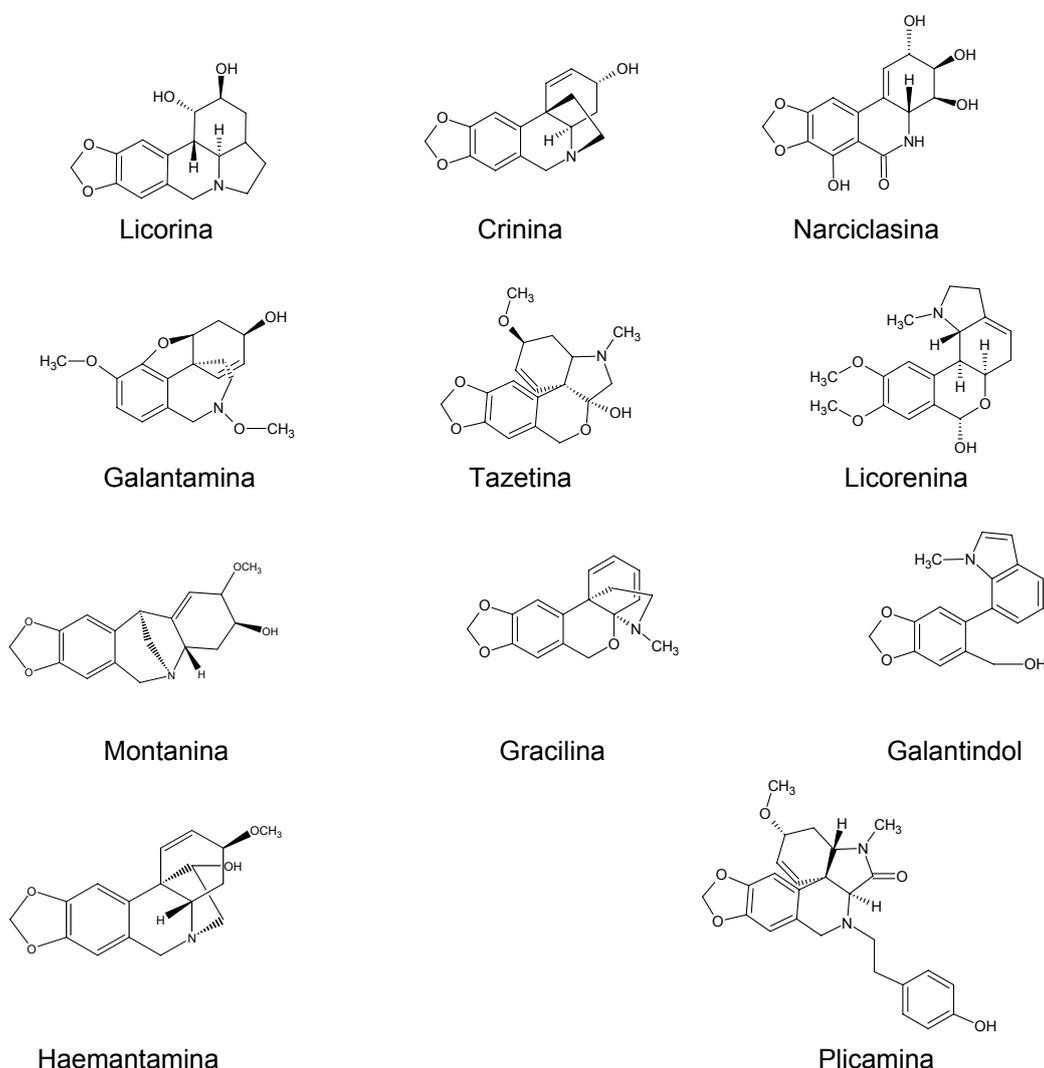


Figura 4. Alcalóides representativos dos 11 núcleos fundamentais de Amaryllidaceae.

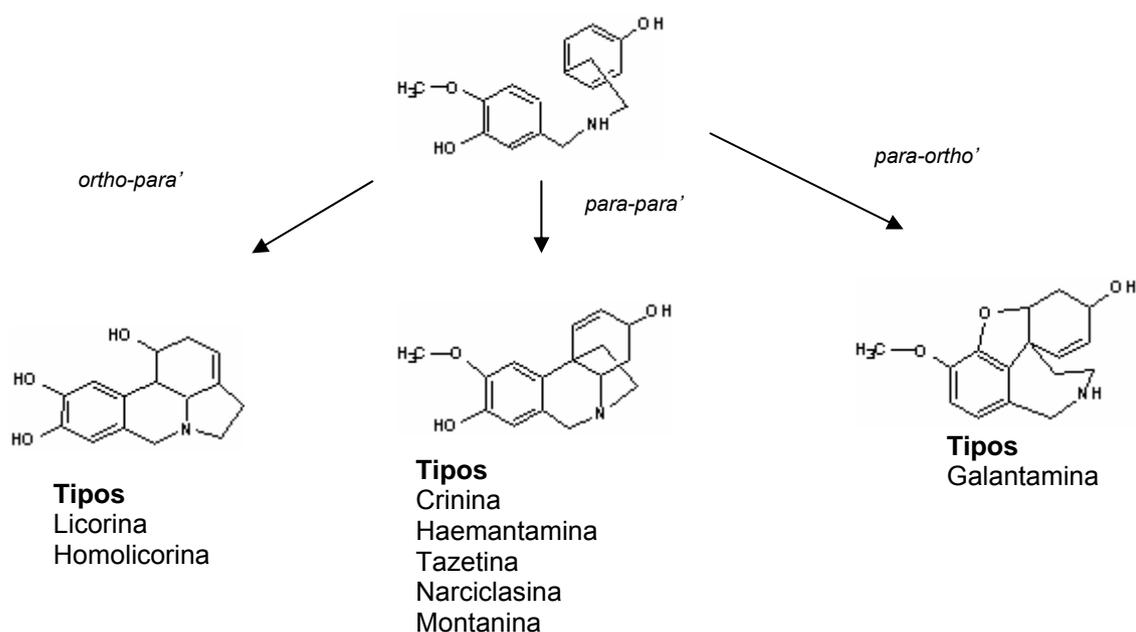


Figura 5. Formação dos variados tipos de núcleos dos alcalóides de Amaryllidaceae, por acoplamento oxidativo. (Adaptado BASTIDA, 2006).

I.2.3 Estudos químicos do gênero *Hippeastrum*

Há cerca de duas décadas os alcalóides de Amaryllidaceae constituem um grande grupo de substâncias extensivamente estudadas (WENIGER *et al.*, 1995). Com relação ao gênero *Hippeastrum*, existem estudos químicos em alcalóides desde a década de 50, sendo que mais de 50 alcalóides diferentes já foram isolados de espécies deste gênero (**Tabela 1**).

Tabela 1: Estudos químicos em alcalóides de espécies do gênero *Hippeastrum* (alcalóides isolados) e respectiva referência.

ESPÉCIE	ALCALÓIDE	REFERÊNCIA
<i>Hippeastrum ananuca</i> Phil	licorina, homolicorina, maritidina, hipeastidina e epi-homolicorina	PACHECO et al., 1982
<i>Hippeastrum aulicum</i> Herb. var. robustum	licorina, montanina, 2-O-acetillicorina, ambelina, clidantina, galantina, narcissidina, desoxilicorenina, norpluvina e pseudolicorina	WILDMAN, 1968
<i>Hippeastrum bifidum</i> Herb.	licorina	WILDMAN, 1960
<i>Hippeastrum bicolor</i> Baker	licorina e haemantamina	MARTIN, 1987
<i>Hippeastrum candidum</i> Herb	licorina e candimina	WILDMAN, 1968
<i>Hippeastrum brachyandrum</i> Baker	licorina, licorenina, ambelina, crinamidina, narcissidina e undulatina	WILDMAN, 1968
<i>Hippeastrum rutilum</i> Herb.	licorina, homolicorina, haemantamina, hipeastrina e galantamina	WILDMAN, 1960
<i>Hippeastrum equestre</i> Herb	licorina, tazetina, psudolicorina, famina, hipeastrina, N-metilcrinasiadina, 8,9-metilenodioxifenantridina, ismina, 11-hidroxitatina, 9-O-demetilhomolicorina, pretazetina, 3-epimacronina, 3-O-demetiltazetina e egonina	GANGULI et al., 1967; RAO e VIMALADEVI, 1972; VENKATARAO e NAGESWARA, apud RAO e VIMALADEVI, 1972 ⁴ ; DÖPKE, 1995; DÖPKE, et al., apud PHAM et al., 1997 ⁵ ; PHAM et al., 1997; PHAM, et al., 1999;
<i>Hippeastrum glaucescens</i> (Martius) Herbert	licorina, tazetina e pretazetina	HOFMANN et al., 2003;
<i>Hippeastrum breviflorum</i> Herb.	licorina, breviflorina-A e breviflorina-B	SEBBEN, 2005
<i>Hippeastrum puniceum</i> (Lam.) Urb.	vitatina, 11-hidroxitatina, 3-O-acetilnarcissidina	QUIRION e HUSSON, 1991
<i>Hippeastrum solandriflorum</i> Herb	licorina, hamaína, vitatina, ismina e ungeremina	BASTIDA et al., 1996
<i>Hippeastrum striatum</i> (L'Hér.) Herbert	licorina	SILVA, 2005
<i>Hippeastrum vittatum</i> (L'Hér.) Herbert	tazetina, licorina, homolicorina, haemantamina, hipeastrina, vitatina, odulina, hipacina, hipadina, pancracina, hipafina, vitacarbolina, O-metilismina, ismina e montanina	BOIT, 1954; BOIT 1956; DÖPKE e BIENERT, 1966; MOHGAZI et al., 1975; ALI et al., 1984; DIAA, 2001; SILVA, 2005; SILVA et al., 2007;

⁴ VENKATARAO, E., E NAGESWARA, R. M., **Current Science**, n. 12, v.38, p.291, 1969 apud RAO, K. R. V.; VIMALADEVI, R. Crystalline alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. **Planta Medica**, v. 21, n. 2, p. 142-143, 1972

⁵ DÖPKE, W.; PHAM, L. H.; GRÜNDEMANN, E.; BARTOSZEK, M.; FLATAU, S. **Pharmazie** 50, p. 511 (1995) apud PHAM, L. H.; GRÜNDEMANN, E.; DÖPKE, W. Alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. (Amaryllidaceae) Part III. **Pharmazie**, v. 52, n. 2, p. 160-163, 1997

I.2.4 Estudos químicos recentes com outros gêneros da família Amaryllidaceae

Existem vários trabalhos, envolvendo outros gêneros da família Amaryllidaceae. CABEZAS e colaboradores (2003) isolaram dos bulbos e folhas da espécie *Eucharis amazonica*, treze alcalóides. Destes, os alcalóides 7-metoxioxoassoanina, 6-O-metilpretazetina e a apohaemantamina foram relatados pela primeira vez de uma fonte de origem natural. Além destes, se destaca no isolamento, o alcalóide galantamina.

A espécie *Crinum moorei* também foi investigada (ELGORASHI, *et al.*, 2001), na qual foram isolados também treze alcalóides, dentre os quais duas bases novas: a 3-[4'-(8'-aminoetil) fenoxi] bulbispermina e a mooreina. Alguns anos depois (2003) foi publicado um estudo quimiotaxonômico, em análise por cromatografia gasosa, dos constituintes alcaloídicos das espécies do gênero *Crinum*, que foram a *C. bulbispermun*, *C. macowanii* e *C. moorei*. Os resultados mostraram que a distinção de *C. moorei* das espécies *C. bulbispermun* e *C. macowanii*, baseados em características morfológicas, confirmou a utilização de alcalóides como marcadores taxonômicos. Além disso o trabalho ainda indicou uma forte correlação entre as espécies *C. bulbispermun* e *C. macowanii* (ELGORASHI, *et al.*, 2003).

Os bulbos frescos da espécie *Nerine filifolia* também foi investigado quanto ao seu conteúdo em alcalóides (NAIR *et al.*, 2005). Foram obtidos três novos compostos: *N*-dimetilbeladina, 6 α -metoxibufanidrina e filifolina; além de cinco já conhecidos alcalóides de Amaryllidaceae. Também foi encontrada pequena quantidade de galantamina (4x10⁻³%, peso seco) utilizando técnicas de radioimunoensaio.

Com relação à espécie *Narcissus angustifolius* subesp. *transcarpathicus*, foram isolados, também dos bulbos frescos, sete alcalóides, sendo que os alcalóides minoritários cherilina e ungeremina foram relatados pela primeira vez no gênero *Narcissus* (LABRAÑA *et al.*, 2002).

Um trabalho envolvendo várias espécies, algumas não pertencendo às Amaryllidaceae, foi desenvolvido por TSAKADZE e colaboradores (2005). A única representante de Amaryllidaceae era a espécie *Galanthus caucasicus*, coletada no

estado da Geórgia (EUA). Nesta espécie foram encontrados cinco alcalóides conhecidos (galantina, licorina, tazetina, galantamina e dimetilhomolicorina) e um alcalóide novo, denominado galantusina.

Da espécie *Amaryllis belladonna*, crescida no Egito, foi isolado dos bulbos, além de cinco alcalóides já conhecidos, uma nova base, com núcleo tipo licorina, denominada amarbelisina, que também demonstrou importantes atividades antibacterianas (bactérias gram positivas e gram negativas) além de atividade antifúngica frente a (EVIDENTE *et al.*, 2004).

As espécies e também foram frutos de investigação pelo nosso grupo de pesquisa, no trabalho de CASTILHOS (2004) e CASTILHOS e colaboradores (2007). Da espécie *Rhodophiala bifida* foram isolados dois alcalóides já conhecidos: a nangustina e a montanina. Montanina, assim como para *Hippeastrum vittatum*, foi o alcalóide majoritário encontrado nos bulbos da espécie. Foram realizados também ensaios biológicos com o alcalóide montanina, apresentando ação inibitória frente ao crescimento de culturas de bactérias, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, além de demonstrar significativa atividade citostática sobre todas as linhagens celulares tumorais testadas.

I.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS

I.3.1 Usos populares

A família Amaryllidaceae, como dito anteriormente, é conhecida desde a antigüidade. Existem relatos do uso popular de espécies desta família pelo médico grego Hipócrates, para tratamento de câncer uterino (PETTIT *et al.*, 1986). Na medicina tradicional chinesa, o vegetal *Narcissus tazetta* é citado para uso em picadas de insetos, furúnculos e carbúnculos (HSU *et al.*, 1999) além de já conhecido uso no tratamento de tumores (HARTWELL, 1967).

No continente africano, berço de diversificação primária da família, um excelente exemplo de espécies utilizadas na medicina popular são as do gênero *Crinum*. Existem relatos de uso como analgésico (ELLIOT e BRIMACOMBE, 1987), antimalárico (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; FENNEL e STADEN, 2001),

antiespasmódico (OKPO e ADEYEME, 1998), antitumoral, antiinflamatório, antirreumático e até para tratamento de doenças sexualmente transmissíveis (LOUW *et al.*, 2002). De algumas espécies, utilizam-se os bulbos *in natura* ou na forma de decocção, para combater doenças do trato urinário e como vermífugo (AMOS *et al.*, 2003). *C. bulbispermum* é utilizado para alívio de dores de ouvido, sob a forma de suco das folhas, na Índia (RATNASOORIYA *et al.*, 2005).

Espécies do gênero *Cyrtanthus* e *Gethyllis* são amplamente utilizadas na medicina popular, principalmente na África do Sul. *Cyrtanthus* é utilizada para dores de cabeça (cefaléia), tosse crônica, cistite e até lepra. O gênero *Gethyllis* é utilizado para cólicas, flatulência e indigestão. Os frutos deste gênero têm uso sob forma de infusão alcoólica ou decocção, para tratar distúrbios estomacais, enquanto que o decocto das flores é empregado para dor de dente (ELGORASHI e VAN STADEN, 2004). Além do uso das espécies com finalidade curativa, muitas são utilizadas como venenos ou alucinógenos poderosos, como é o caso da espécie *Boopane disticha*, na qual se utiliza os bulbos para envenenar a ponta das flechas indígenas, além de ser utilizada em vários rituais místicos para afastar “maus olhados”, trazer “boa sorte” e chuva (KOORBANALLY *et al.*, 2000; LOUW *et al.*, 2002; BOTHA *et al.*, 2005).

Outras espécies, principalmente as do gênero *Galanthus* eram utilizadas para dores de cabeça e nevralgias (HEIRICH e TEOH, 2004), além de que *Galanthus nivalis*, na medicina tradicional turca, é utilizada como cardiotônico, emenagogo e para outras distúrbios estomacais (KAYA *et al.*, 2004). Curiosamente, é um dos gêneros clássicos de utilização como fonte de galantamina.

No Brasil, o gênero *Hippeastrum* é popularmente utilizado, sob forma de suco obtido de seus bulbos, como purgativo, emético e para doenças respiratórias (CORRÊA, 1984; LORENZI e MATOS, 2002).

I.3.2 Atividades biológicas relatadas

Os mais variados relatos de atividades biológicas demonstrados pelos alcalóides de Amaryllidaceae, justificam cada vez mais o crescente estudo a respeito destas bases. Estes alcalóides já demonstraram atividade antimalárica (SENER *et al.*, 2003), antibacteriana (TRAM *et al.*, 2002; ELGORASHI e VAN STADEN, 2004),

antifúngica, antiviral, antiparasitária (GHOSAL *et al.*, 1985; SENER *et al.*, 1998, MACHOCHO *et al.*, 2004), citotóxica, antitumoral e imunoestimulante (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; WENIGER *et al.*, 1995), hipotensiva (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2000), antiplaquetária (SENER *et al.*, 1998) e variadas atividades sobre o sistema nervoso central (SNC), destacando-se atividade analgésica (OKPO *et al.*, 2001), anticonvulsivante, ansiolítica e antidepressiva (SILVA *et al.*, 2006) e uma das atividades mais estudadas destes alcalóides, a atividade anticolinesterásica (HARVEY, 1995; LÓPEZ *et al.*, 2002; HOUGHTON *et al.*, 2004; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006; ELGORASHI *et al.*, 2006).

I.3.3 Atividade sobre o SNC e Doença de Alzheimer (DA)

As plantas pertencentes à família Amaryllidaceae geralmente demonstram algum tipo de efeito biológico sobre o SNC. Isto foi observado em muitos relatos etnofarmacológicos, alguns já comentados, tais como utilização de algumas espécies em rituais religiosos, na qual condiciona o usuário da preparação a ter alucinações, inconsciência e alterações de comportamento (KOORBANALLY *et al.*, 2000; DU PLOOY *et al.*, 2001; LOUW *et al.*, 2002; BOTHA *et al.*, 2005). Estas atividades centrais, das mais variadas, são bem características do grupo dos alcalóides, de uma maneira geral (BRUNETON, 2001). Não apenas por isso, atualmente os alcalóides têm ocupado uma posição de destaque em algumas estratégias terapêuticas relacionadas ao SNC (CARLINI, 2003).

No que diz respeito especificamente aos alcalóides de Amaryllidaceae, estes têm demonstrado potencial atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase. Isso ficou mais evidenciado com o emprego do alcalóide galantamina para o tratamento da doença de Alzheimer, com grandes vantagens sobre outros medicamentos da mesma classe (HARVEY, 1995; HOWES *et al.*, 2003; HEINRICH e TEOH, 2004). Esta estratégia colinérgica é ainda o eixo central do tratamento da DA (WANNMACHER, 2005; FARLOW e CUMMINGS, 2007).

A DA pode ser definida como a perda insidiosa, lenta e progressiva da memória que abrange áreas da fala, motricidade, comportamento e de função operativa (WARNER *et al.*, 2004). É caracterizada por uma série de lesões, que envolvem uma hipersecreção de uma proteína, chamada *substância β -amilóide*,

pelas células afetadas. Esta proteína é produzida normalmente pelas células nervosas, porém na DA essa produção ocorre de maneira exagerada, causando vacúolos de tamanho crescente que, ao se juntarem, acabam determinando a morte de todos os neurônios que as rodeiam (IZQUIERDO, 2002). Ocorre também a formação de *emaranhados neurofibrilares*, produto de anomalias protéicas nas neurofibrilas de axônios, que da mesma forma, pelo volume e pela interrupção do trânsito de potenciais de ação pelos axônios afetados, causam a morte celular e disfunção (IZQUIERDO, 2002).

A perda neuronal que é ocasionada por essas lesões, como afeta as funções superiores, os quadros clínicos que se manifestam são chamados de *demências* (*de*: partícula privativa; *mência*: derivado de *mens*, mente). Literalmente, ao se perder neurônios, perdem-se as funções mentais, entre elas, as memórias (IZQUIERDO, 2002).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 37 milhões de pessoas em todo o mundo vivem com demência, sendo que a DA é a responsável pela maioria dos casos. A taxa de ocorrência da doença dobra a cada 5 anos para aquelas idades entre 65 e 85 anos (WHO, 2001). Dados apontam para uma prevalência da doença em valores de 0,7% (entre 60 e 64 anos), podendo chegar até 38,6% (de 90 a 94 anos), com resultados semelhantes para o Brasil (BRUCKI, 2006).

De fato, a DA é a forma mais freqüente de demência no envelhecimento (WHO, 2001; IZQUIERDO, 2002; WARNER *et al.*, 2004). O aumento da longevidade do ser humano, fenômeno este fruto dos avanços científicos contemporâneos, parece que não foi acompanhado dos mesmos avanços que garantam uma melhor qualidade de vida, numa faixa etária praticamente inexistente em outras épocas (WANNMACHER, 2005). Em 1970, os idosos constituíam 3,1% da população brasileira, subindo para 4,9% em 1995. Estimam-se índices de 8,8% e 18,4% em 2020 e 2050, respectivamente, abrangendo todas as classes sociais e todas as regiões do Brasil (WANNMACHER, 2005).

Por este motivo é crescente os estudos que buscam estratégias terapêuticas que propiciem melhora na qualidade de vida e cura das doenças associadas com a

idade. A DA é considerada um problema de saúde pública, pelo fato de que a população mundial, cada vez mais, aumenta sua expectativa de vida (WANNMACHER, 2005).

I.3.4 Memória e estratégias terapêuticas para a DA

“Memória” é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações. O acervo de nossas memórias faz com que cada um de nós seja o que é, cada um, um indivíduo, um ser para o qual não existe outro idêntico (IZQUIERDO, 2002). Para que uma memória se forme, primeiramente precisa haver a *aquisição* da informação relativa a ela, etapa que corresponde ao aprendizado. Dependendo do tipo de informação, esta pode ser esquecida, mantida por um pequeno intervalo de tempo, ou ainda retida por períodos longos para posterior acesso. A este último processo, dá-se o nome de *consolidação*, através do qual uma informação muito relevante é retida prolongada ou permanentemente. Finalmente, o acesso posterior à informação caracteriza a *evocação*, ou lembrança; processo por meio do qual uma informação armazenada pode ser requisitada para uso na cognição, na emoção e/ou na expressão de um comportamento (IZQUIERDO, 2002).

As memórias podem ser classificadas quanto à sua natureza em explícita ou declarativa e implícita ou não-declarativa. A *memória explícita* reúne tudo o que podemos evocar (lembrar) por meio de palavras (por isso o termo “declarativa”), sendo esta feita de modo consciente. A *memória implícita* refere-se àquelas memórias que não conseguimos verbalizar e não envolve evocação consciente (LEES e JONES, 2000; KANDEL, 2001; BEAR *et al.*, 2002). Esses dois tipos de memória dependem de estruturas cerebrais diferentes. As memórias explícitas requerem o lobo temporal medial e o hipocampo, e as memórias implícitas envolvem diferentes estruturas como a amígdala, gânglio basal e o cerebelo (LEES e JONES, 2000).

Outra classificação das memórias diz respeito ao tempo de retenção da informação armazenada (IZQUIERDO e McGAUGH, 2000). Memória denominada *ultra-rápida* dura frações de segundos a alguns segundos, também chamada de memória sensorial. A *memória de curta duração* dura minutos ou horas e garante o sentido de continuidade do presente. A *memória de longa duração* dura horas, dias

ou anos, garante registros do passado autobiográfico e dos conhecimentos do indivíduo (IZQUIERDO e McGAUGH, 2000; IZQUIERDO, 2002).

A grande relação existente entre os déficits de memória, no qual representa a queixa mais comum dos pacientes com a DA, está de fato relacionada com a perda das funções colinérgicas, principalmente no hipocampo. Acredita-se que o déficit mnemônico observado nos pacientes com a DA resulte de uma alteração no sistema colinérgico hipocampal (MAELIKE, 2001; THOMPSON, 2001). Clinicamente, isso é ainda mais confirmado, pelo fato de que a principal estratégia terapêutica para a DA ainda é a terapia com inibidores de colinesterases (MAELIKE, 2001; THOMPSON, 2001; GIACOBINI, 2003).

Até a década de 80, esta premissa era ainda mais reforçada, pela observação de lesões cerebrais e da conseqüente hipoatividade do núcleo basal de Meynert em pacientes que sofriam da DA; ora, este núcleo é sede do maior sistema colinérgico do cérebro, no qual até postulou-se que a acetilcolina seria o “principal neurotransmissor envolvido com a memória”. No entanto, na metade da mesma década, observou-se déficits semelhantes para outros sistemas neurotransmissores, como o dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico central, além do papel primordial do sistema hipocampal na formação e evocação das memórias. Isto relegou a “hipótese colinérgica” a um papel, no máximo, secundário na patogenia da DA e das demências em geral (IZQUIERDO, 2002).

Uma outra evidência que condiciona a busca de novas estratégias biológicas para a terapia da DA, e não apenas a inibição de colinesterases, é o mais novo fármaco para o tratamento de Alzheimer, e o único que possui indicação para estágios severos da doença, que é a memantina, um antagonista não-competitivo do receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), capaz de manter o bloqueio do canal NMDA na presença de liberação sustentada de glutamato, impedindo o fluxo de cálcio intracelular (FARLOW e CUMMINGS, 2007; MASSOUD, 2007). Além disso, a busca de fármacos com novo ou diferenciado mecanismo de ação, permite utilização de terapia combinada, como é o caso da própria memantina, que nos casos de DA leve à moderada, pode ser usado em combinação com inibidores de colinesterases (FARLOW e CUMMINGS, 2007).

A própria galantamina, além da já conhecida inibição da enzima acetilcolinesterase, possui a capacidade de modulação alostérica positiva em receptores nicotínicos pré-sinápticos, aumentando ainda mais a concentração de acetilcolina na fenda, observando-se melhora na transmissão sináptica (MAELICKE *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2002), visto que sua capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase é bem inferior, comparada ao donepezil (GEERTS *et al.*, 2005), por exemplo.

Portanto, a pesquisa de substâncias biologicamente ativas para a DA, somado à busca de novas estratégias terapêuticas para a doença (principalmente que melhorem o perfil pró-cognitivo dos pacientes), parece ser de grande relevância.

I.3.5 História da galantamina

O alcalóide e fármaco galantamina (**Tabela 2**), foi extraído inicialmente do gênero *Galanthus*. Na verdade, não existem fortes relatos da utilização deste gênero, e de outros dois gêneros que possuem galantamina (*Narcissus* e *Leucojum*) de uso corrente na medicina popular. O que existe são poucos relatos de utilização, apenas do gênero *Galanthus*, com a finalidade de combater nevralgias e dores de cabeça (HEINRICH e TEOH, 2004).

O relato mais fidedigno parece ser o do farmacognosista londrino E. J. Shellard, em 1965, no qual faz referência a um farmacognosista russo, que relata o caso de uma moradora (vivendo na região serrana da Cadeia de montanhas do Cáucaso, provavelmente na Geórgia, sul da Rússia) na qual descreve ao editor do *Pharmaceutical Journal* (UK): "... quando sua jovem criança desenvolve sintomas clássicos de poliomielite, ela então recebe uma decocção dos bulbos de um galanto caucasiano (*Galanthus woronowii*) e a criança se recupera completamente, sem apresentar nenhum sinal da paralisia" (SHELLARD, 2000). Este parece ser mais um caso no qual o conhecimento etnofarmacológico deu a linha de atividade biológica da droga vegetal (no caso, os bulbos da espécie, que depois isolou-se a galantamina) mas que a principal indicação da substância em questão, nos dias atuais, é para a DA. A galantamina foi primeiramente indicada para poliomielite, principalmente nos países do antigo bloco socialista, visto que os estudos iniciaram na antiga União Soviética (URSS), sob o nome de "Nivalin".

Tabela 2: História da galantamina (JANSSEN PHARMACEUTICA, 1998, 1999, 2000; HEINRICH e TEOH, 2004).

Ano	Desenvolvimento da galantamina
Início da década de 50	De acordo com dados não confirmados, farmacognosistas russos descobriram que moradores vivendo em vilarejos nas encostas dos Montes Urais, faziam uso de galanto selvagem para tratamento, do que era considerado ser, poliomielite em crianças.
1951	Pesquisadores demonstram as propriedades de inibição da acetilcolinesterase da galantamina e seus efeitos de reversão da ação do curare.
1952	Primeiro isolamento da galantamina, isolada de <i>Galanthus woronowii</i> .
1956/1957	Sugestão de fontes alternativas da galantamina (folhas de <i>Narcissus</i> spp. e <i>Galanthus nivalis</i> , bem como de <i>Leucojum aestivum</i>) como fontes principais de galantamina – pelo menos até a sua comercialização farmacêutica ocidental.
Final da década de 50	Vários estudos farmacológicos pré-clínicos da galantamina: galantamina antagonizou os efeito de bloqueadores neuromusculares não despolarizantes; vários estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> em ratos, demonstrando efeitos da galantamina no cérebro. Galantamina foi registrada sob o nome comercial “Nivalin” (Sanochemia Group), e disponibilizada comercialmente na Bulgária.
Início da década de 60	Primeiros relatos da atividade anticolinesterásica da galantamina em estudos <i>in vivo</i> , em gatos anestesiados.
1970	Galantamina comercializada por Waldheim (Sanochemia Group) como Nivalin na Alemanha e Áustria, com indicações como neuralgia facial
Década de 80	Desenvolvimento pré-clínico: pesquisadores iniciam os estudos dos efeitos terapêuticos da galantamina na DA.
Década de 90	Desenvolvimento clínico da galantamina como medicação para a DA.
1996	Sanochemia Pharmazeutika obtém a primeira patente do processo de síntese da galantamina.
1997	Sanochemia inicia colaboração com companhia situada na Bélgica (Janssen Pharmaceutica) e uma companhia emergente da Inglaterra (Shire Pharmaceuticals Group).
1998	A empresa Janssen Pharmaceutica deposita patente no Brasil, de comprimidos de liberação prolongada de galantamina, bem como da forma de obtenção dos mesmos.
1999	A empresa Janssen Pharmaceutica deposita patente no Brasil, de solução oral de galantamina, ou do seu sal, patenteando o seu uso e o processo de preparação do mesmo.
2000	Galantamina liberada em alguns países para tratamento da DA (Irlanda, Suécia, Grã-Bretanha), inclusive Brasil. Depósito de patente no Brasil, pela empresa Janssen Pharmaceutica, para tratamento de comportamento neuropsiquiátrico associado a DA.
2003/2004	Galantamina aprovada para uso nos Estados Unidos, vários países europeus e alguns países asiáticos para o tratamento da DA.

I.3.6 Alcalóide Montanina

Os primeiros trabalhos envolvendo o alcalóide montanina foram da investigação de espécies do gênero *Haemanthus*. No primeiro trabalho que foi possível caracterizar sua estrutura, ela foi isolada de *Haemanthus tigrinus*, mas já havia sido isolada anteriormente de *Haemanthus amarylloides* (INUBUSHI *et al.*, 1960). No mesmo ano, foi relatado o isolamento do alcalóide da espécie *Hippeastrum aulicum*, assim como de outros 11 alcalóides (BOIT e DÖPKE, 1960). Os trabalhos com os alcalóides de Amaryllidaceae continuaram, assim como com a montanina, e em 1976, no trabalho de WILDMAN e OLESEN, comprovou-se que a montanina era originária do mesmo precursor (O-metilnorbeladina).

Após isso, o isolamento de montanina a partir de plantas da família Amaryllidaceae ocorreu somente em 1994, de uma espécie híbrida do gênero *Hippeastrum*, também isolada dos bulbos (MUGGE *et al.*, 1994). Novamente o alcalóide foi isolado de espécies do gênero *Haemanthus*, mais especificamente das espécies *H. paucifolius* e *H. deformis* (CROUCH *et al.*, 2005), no entanto, os únicos trabalhos que envolvem isolamento químico e avaliação de atividade biológica, foram realizados pelo nosso grupo de pesquisa na Faculdade de Farmácia (UFRGS).

Realizou-se um trabalho de investigação com a espécie *Hippeastrum vittatum* (SILVA, 2005; SILVA *et al.*, 2006), e após também se trabalhou com uma espécie de outro gênero, a espécie *Rodophiala bifida* (CASTILHOS *et al.*, 2007). De ambas espécies foi isolado o alcalóide montanina, como alcalóide majoritário. A montanina isolada da espécie *Rodophiala bifida*, apresentou, como já mencionado anteriormente, atividade inibitória frente ao crescimento de culturas de bactérias, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, além de demonstrar significativa atividade citostática sobre todas as linhagens celulares tumorais testadas (CASTILHOS *et al.*, 2007).

O alcalóide montanina isolado de *Hippeastrum vittatum* também demonstrou importantes atividades de inibição de crescimento de várias linhagens tumorais, com valores de IC₅₀ bem inferiores ao preconizado pelo INC (Instituto Nacional do Câncer – Estados Unidos da América) para ser considerado ativo (PISHA *et al.*, 1995), além

de atividades semelhantes para os extratos enriquecidos em alcalóides, no qual a montanina era o composto majoritário (SILVA *et al.*, 2007). No entanto, as atividades mais interessantes, pelo menos no que tange o escopo deste trabalho, referem-se às atividades via sistema nervoso central.

Para esta avaliação, inicialmente objetivamos observar a montanina em testes comportamentais, com administração via intraperitoneal. Na avaliação de atividades psicofarmacológicas, a montanina apresentou interessantes atividades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes, demonstrando, portanto, atividade via sistema nervoso central (SILVA *et al.*, 2006).

Após este resultado, nosso grupo começou a avaliar a atividade frente à inibição da enzima acetilcolinesterase, visto que esta é uma característica muito comum em vários alcalóides de Amaryllidaceae (HARVEY, 1995; RHEE *et al.*, 2001; LÓPEZ *et al.*, 2002; LAMIRAULT *et al.*, 2003, ELGORASHI *et al.*, 2004). Para isto fizemos uso do método descrito por MARSTON e colaboradores (2002), que corresponde a uma avaliação *in vitro* da atividade de inibição. Os resultados foram interessantes, com inibição enzimática em quantidades de 2 a 8 µg de alcalóide (SILVA, 2005). Com a demonstração de um bom perfil de inibição da acetilcolinesterase, passou a ser interessante estudar o alcalóide na modulação de proteínas envolvidas com a formação de memória.

Existem várias enzimas e fatores de transcrição importantes envolvidos com os processos de formação de memória (IZQUIERDO, 2002). Dentre estes, a via de sinalização das MAPKs (“mitogen-activated protein kinases”) e a ativação do fator de transcrição CREB (“cyclic AMP responsive”), estão muito relacionados com estes processos e com a chamada *plasticidade sináptica* do SNC (BEAR, 2002).

O termo *plasticidade sináptica*, na verdade, é um termo que, de uma certa forma, tenta definir uma característica intrínseca do SNC. Como dito anteriormente, a formação de memórias constitui, na verdade, um aprendizado. Um aprendizado pode ser considerado associativo ou não-associativo (IZQUIERDO, 2002). O exemplo paradigmático dos aprendizados associativos é o condicionamento clássico, que consiste em apresentar o animal a um estímulo incapaz de provocar, por si só, uma resposta comportamental detectável (estímulo condicionado). A

apresentação repetida do estímulo condicionado é acompanhada, sucessiva e repetidamente, pela apresentação de outro estímulo, denominado incondicionado, o qual é capaz de gerar uma resposta quantificável. Após a apresentação pareada dos estímulos condicionado e incondicionado, o animal aprende a emitir a resposta incondicionada ante a apresentação única do estímulo condicionante (BEVILAQUA, 2000).

Com os estudos relacionando mecanismos envolvidos com a formação de memória, utilizando-se de tarefas comportamentais, tais como a muito utilizada “esquiva inibitória” ou “esquiva passiva”, até as mais variadas formas de “medo condicionado”, ou a família de “aprendizagens espaciais”, pode-se entender que a forma de aprendizado nestas mais diversas tarefas corresponde ao fato de que as células nervosas, e em geral, as células piramidais da região CA1 do hipocampo, possuem um conjunto de mecanismos que lhes permite desempenhar *funções plásticas*. Denomina-se, portanto, *plasticidade sináptica*, a este conjunto de processos fisiológicos, no nível celular e molecular, que explicam a capacidade das células nervosas de mudar suas respostas a determinados estímulos como função da experiência (IZQUIERDO, 2002).

Um exemplo dessa capacidade de plasticidade das sinapses pode ser exemplificado, a nível molecular, pelo papel do fator de transcrição CREB. Está muito bem documentado que o fator CREB está ativado (fosforilado – pCREB) nos processos de formação de memória, nas mais diversificadas tarefas (BERNABEU *et al.*, 1997; IZQUIERDO e MEDINA, 1997; CAMMAROTA *et al.*, 2000; IZQUIERDO, 2002). Na verdade, a ativação de CREB leva o núcleo das células pós-sinápticas a produzir RNAs mensageiros que desempenham a função de “ordenar” a síntese de novas proteínas. Muitas dessas proteínas são outros fatores de transcrição, que voltam para o núcleo. Outras são proteínas de adesão celular, que são transportadas às sinapses dessas células, alterando sua superfície e portanto, aumentando ou diminuindo sua função (IZQUIERDO, 2002).

As descobertas que permitem estabelecer um verdadeiro entendimento de como os processos envolvidos com a memória, seja a consolidação, a aquisição ou a evocação são formados pelo nosso SNC, na verdade, estão baseadas nos estudos comportamentais. Impossível de se negar a longa tradição de estudos sobre

o comportamento dos animais ou de pessoas com lesões em diferentes regiões do SNC; experimentais, as primeiras, e secundárias a tumores, cirurgias malsucedidas ou acidentes, as segundas (IZQUIERDO, 2002), que nos fazem observar as mais diferentes formas de seqüelas patológicas remanescentes, e dentre elas, perdas cognitivas. De fato, a farmacologia comportamental tem contribuído e muito, através da injeção de drogas em regiões específicas do cérebro, com capacidade agonista, antagonista ou moduladores de receptores específicos, e têm permitido uma verdadeira dissecação dos processos bioquímicos e de sistemas neurotransmissores envolvidos com os mais variados tipos de memória (IZQUIERDO e McCAUGH, 2000, IZQUIERDO, 2002).

Atualmente, está muito bem documentado que para a formação de memória de longa duração, a ativação de vias mediadas por Ca^{2+} e AMPc são extremamente necessárias para o aprendizado, pois estimulam cascatas de sinalização capazes de induzir a expressão de genes responsáveis pela plasticidade sináptica, agindo principalmente através da coincidente ativação de várias proteínas-quinases, incluindo proteínas-quinase dependentes de AMPc (PKA), proteínas-quinase dependentes de cálcio (PKC), proteínas-quinase dependentes de GMPc (PKG), proteínas-quinases cálcio-calmodulina dependentes (CAMKII), e proteínas-quinases ativáveis por agentes mitógenos (MAPK) (BERNABEU *et al.*, 1997, ATKINS *et al.*, 1998; CAMMAROTA *et al.*, 2000; BEAR, 2002; IZQUIERDO, 2002), além da ativação de CREB (CAMMAROTA *et al.*, 2000; IZQUIERDO, 2002). A cascata de sinalização da MAPK e PKA, fosforilam também receptores glutamatérgicos, todavia seu papel crucial consiste na fosforilação de fatores de transcrição de DNA presente no núcleo das células, dentre eles, o CREB (CAMMAROTA *et al.*, 2000; IZQUIERDO, 2002).

O alcalóide montanina, avaliado utilizando-se fatias hipocâmpais de ratos, foi capaz de modular as vias de sinalização das MAPKs, aumentando o grau de fosforilação/ativação destas proteínas (pRaf/pMEK/pERK), além do fator de transcrição CREB (pCREB), indicando um possível papel deste alcalóide nos processos plásticos relacionados com a formação das memórias (SILVA, 2005). Não existe nenhum outro trabalho na literatura avaliando qualquer atividade de modulação de proteínas envolvidas com processos cognitivos; portanto, sendo uma substância inibidora da enzima acetilcolinesterase, e com um resultado bioquímico

demonstrando ativação de proteínas envolvidas com a formação de memórias, uma avaliação comportamental deste alcalóide em tarefas que evidenciem atividade pró-cognitiva se torna relevante.

Baseado nas observações de como são adquiridas as memórias, um tipo de tarefa que vem sendo muito utilizada, principalmente para avaliação de drogas com potencial pró-cognitivo (PRICKAERTS *et al.*, 2002, 2005), mas também nos mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (REED *et al.*, 1999; MANDOLESI *et al.*, 2003) é a tarefa de reconhecimento de objetos. Esta tarefa está baseada na capacidade de exploração dos roedores, quando são colocados na presença de objetos novos e familiares (ENNACEUR e DELACOUR, 1988). Roedores, quando são treinados com algum objeto, tornando-lhes familiar, se expostos a um objeto novo, tendem a gastar a maior parte do tempo explorando este objeto novo.

Este tipo de tarefa tem muitas características interessantes. É uma tarefa que simula um reconhecimento visual, muito utilizado por primatas, na comparação entre espécies. Também é considerado um tipo de "memória pura", livre de qualquer componente referencial, baseado simplesmente num comportamento espontâneo dos roedores, além de não envolver qualquer tipo de reforço ou estímulo incondicionado, por exemplo, como choque nas patas ou pistas olfativas, sendo um tipo de tarefa que simula uma memória declarativa (ENNACEUR e DELACOUR, 1988).

CAPÍTULO II

MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 MATERIAIS

II.1.1 Solventes em geral

Os solventes utilizados para este trabalho foram de procedência Merck, Nuclear, Vetec, Quimex e Synth. Dentre os solventes utilizados destaca-se etanol, metanol, clorofórmio, diclorometano, ácidos (acético, clorídrico, trifluoroacético e sulfúrico), éter etílico, éter de petróleo, hidróxido de amônio, *n*-butanol, acetato de etila, sulfato de sódio anidro, entre outros, todos de grau analítico.

II.1.2 Reagentes específicos

Foram empregados reagentes específicos para alcalóides: Reativo de Mayer (tetraiodomercurato), Bertrand (ácido sílico-túngstico) e Dragendorff (tetraiodobismutato de potássio).

II.1.3 Vidraria

Balões para evaporadores rotatórios, béqueres, capilares para aplicação em cromatografia em camada delgada (CCD), colunas de vidro para cromatografia, cuba para cromatografia, erlenmeyer, funil de Büchner, funil de separação, funil de vidro sinterizado (G3 e G4), kitasato, pipetas Pauster, placas de vidro (10 x 10 cm, 10 x 20 cm e 20 x 20 cm) para CCD analítica, bastão de vidro, vidros de relógio, vidros para fracionamento e armazenamento das frações.

II.1.4 Cromatografia

II.1.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck e em placas de vidro, com medidas variando de 10 x 10 cm, 10 x 20 cm e 20 x 20 cm, preparadas manualmente utilizando-se do conjunto Desaga, tendo como sistema adsorvente gel de sílica GF254 Merck, com espessura de 0,25 mm.

II.1.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a obtenção dos cromatogramas, foram utilizados dois cromatógrafos diferentes. A diferença entre ambos está relacionada ao detector, no qual um deles apresenta o detector de ultravioleta (UV de diodos em série) e o outro com lâmpada de ultravioleta/visível (UV/VIS), conforme apresentado a seguir.

II.1.4.2.1 Equipamento Alliance 2695 (Waters) utilizando-se software gerenciador Empower (Waters) e detector de Ultravioleta (UV) de diodos em série (sigla em inglês *Photo-diode Array - PDA*) Waters 996, com acumulação ente 200 a 400 nm, cada 4,8 nm e 1 espectro/segundo.

A coluna utilizada para obtenção dos cromatogramas foi coluna cromatográfica Symmetry (Waters) contendo fase reversa C₁₈ (3,5 µm) com dimensões 4,6 x 75 mm protegida por pré-coluna Lichrospher (10 x 4 mm d.i.) empacotada com fase reversa C₁₈ Bondapack (Waters, 10 µm). O volume de injeção foi de 10 µl. Todas as amostras foram previamente filtradas em membrana filtrante hidrofílica (HV-Durapore, Millipore; 0,45; 13 mm).

II.1.4.2.2 Equipamento Alliance 2695, utilizando-se software gerenciador Empower (Waters) e detector de Ultravioleta/Visível (UV/Vis 2487). A coluna utilizada na análise foi a mesma apresentada no item acima, bem como com todas as características também apresentadas (pré-coluna, membrana filtrante, etc.).

Para obtenção dos cromatogramas, foi utilizado sistema gradiente linear, com tempo de análise cromatográfica final de 32 minutos, fluxo de 0,7 ml/min, tal como representado na **Tabela 3**.

II.1.4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE - EM)

Equipamento de CLAE-EM Shimadzu, acoplado a detector de massas Micromass Quattro II, sendo os espectros obtidos no modo *elétron-spray positivo* (ES+), com análise de massas entre os valores de 100 a 400.

O Sistema cromatográfico utilizado na análise por CLAE-EM está apresentado na **Tabela 4**.

Tabela 3. Sistema gradiente utilizado para análise dos extratos e alcalóides isolados de *Hippeastrum papilio*.

TEMPO (minutos)	FASE A (%)	FASE B (%)
0	100	0
20	80	20
21	0	100
25	0	100
25,5	100	0
32,0	100	0

FASE A: Acetonitrila : Água : Ácido trifluoroacético (95:05:0,5)
FASE B: Acetonitrila : Ácido trifluoroacético (100:0,5)

Tabela 4: Sistema cromatográfico utilizado para análise por CLAE-EM

TEMPO	FLUXO (ml/min)	FASE A%
25 (sistema isocrático)	0,1	100

FASE A: Acetonitrila : Água : Ácido fórmico (30:70:0,05)

II.1.4.2.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Os extratos enriquecidos em alcalóides foram analisados por CG-EM, em parceria desenvolvida com o professor Jaume Bastida, do *Departament de Productes Naturals* da *Facultat de Farmàcia* da *Universitat de Barcelona*, que desenvolve esta técnica já bem documentada em vários trabalhos, e compara os resultados obtidos com uma biblioteca digital de alcalóides de *Amaryllidaceae*.

As frações analisadas por CG-EM foram as frações CH₂Cl₂A e CH₂Cl₂B de bulbos e partes aéreas (da extração com HCl) e extrato bruto liofilizado de raízes, na concentração de 5 mg/ml.

O equipamento utilizado para o CG-EM, foi HP 6890 N, com detector Agilent MSD 5975 Inert XL e coluna HP- 5 MS (30 m x 0,25 mm). A temperatura do injetor foi de 250 °C, pressão de 10,3 psi e fluxo de 1ml/min (gás Hélio). A coluna capilar está diretamente acoplada ao detector de massa quadrupólo (45 eV). O programa de temperatura utilizado foi: 100 – 180°C (15°C/min), 1 min de aquecimento em 180°C e 180 – 300°C (5°C/min) e 1 min de aquecimento em 300°C.

II.1.5 Balança de infravermelho

A balança utilizada foi da marca Bel Mark Top Ray Page, com temperatura programada para 105°C, variação de 0,20 e tempo de 10 segundos. Empregando-se as diferentes partes do vegetal grosseiramente trituradas, sendo cada análise realizada em triplicata, e calculando-se a média entre as leituras como resultado final da análise.

II.1.6 Liofilização

O equipamento utilizado para liofilização foi o Liofilizador Savant MicroModulyo Boc Edwards.

II.1.7 Materiais auxiliares

Fita indicadora de pH, papel alumínio, papel filtro.

II.2 MÉTODOS

II.2.1 Extração, isolamento e identificação dos alcalóides de *Hippeastrum papilio*

II.2.1.1 Coleta das amostras

As amostras de *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen foram coletadas no estado do Rio Grande do Sul, em Caxias do Sul, no período de floração (novembro). Foram coletados bulbos, raízes e partes aéreas. O vegetal foi identificado pela botânica Julie Dutilh (UNICAMP), e está depositada exsicata no Herbário ICN (UFRGS), sob o número 149428.

II.2.1.2 Preparação do material vegetal

O vegetal fresco foi dividido em raízes, bulbos e partes aéreas, sendo posteriormente triturado em moinho de facas. Cada parte da planta foi submetida à maceração exaustiva com etanol sendo posteriormente eliminado o solvente por

evaporador rotatório sob pressão reduzida (etanol) e liofilização (água). Após esse processo, o extrato concentrado foi ressuspensionado em uma solução de HCl 10% para iniciar a obtenção das frações enriquecidas de alcalóides, através da extração ácido-base. O extrato bruto acidificado foi lavado com éter de petróleo (para remover substâncias lipofílicas) e após realizou-se a extração com diclorometano (até reação negativa para alcalóides) fornecendo a primeira fração, denominada CH₂Cl₂A. Em seguida, a fração aquosa foi alcalinizada com hidróxido de amônio 25% e extraída novamente com diclorometano (até reação negativa para alcalóides, novamente), fornecendo a fração denominada CH₂Cl₂B. Por fim, esta mesma fração aquosa alcalina remanescente foi submetida à nova extração com *n*-butanol, (objetivando extração de alcalóides de maior polaridade). A fração denominada “alcalóides totais” foi composta pelos conteúdos dos extratos obtidos com diclorometano e *n*-butanol. Este mesmo processo também foi repetido com a substituição do HCl pelo H₂SO₄ (somente para bulbos) e realizado apenas com H₂SO₄ para raízes (**Figura 6**).

II.2.1.3 Isolamento dos alcalóides

Os alcalóides foram isolados a partir das frações enriquecidas do extrato diclorometano (de bulbos) ou por precipitação na obtenção dos extratos, utilizando-se principalmente as técnicas de cromatografia em coluna.

II.2.1.4 Identificação dos alcalóides

Para iniciar a elucidação estrutural das bases isoladas, foi realizado cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM), espectrometria no ultravioleta, ponto de fusão e ressonância magnética nuclear. Os resultados obtidos por CG-EM foram confrontados com dados disponíveis na literatura.

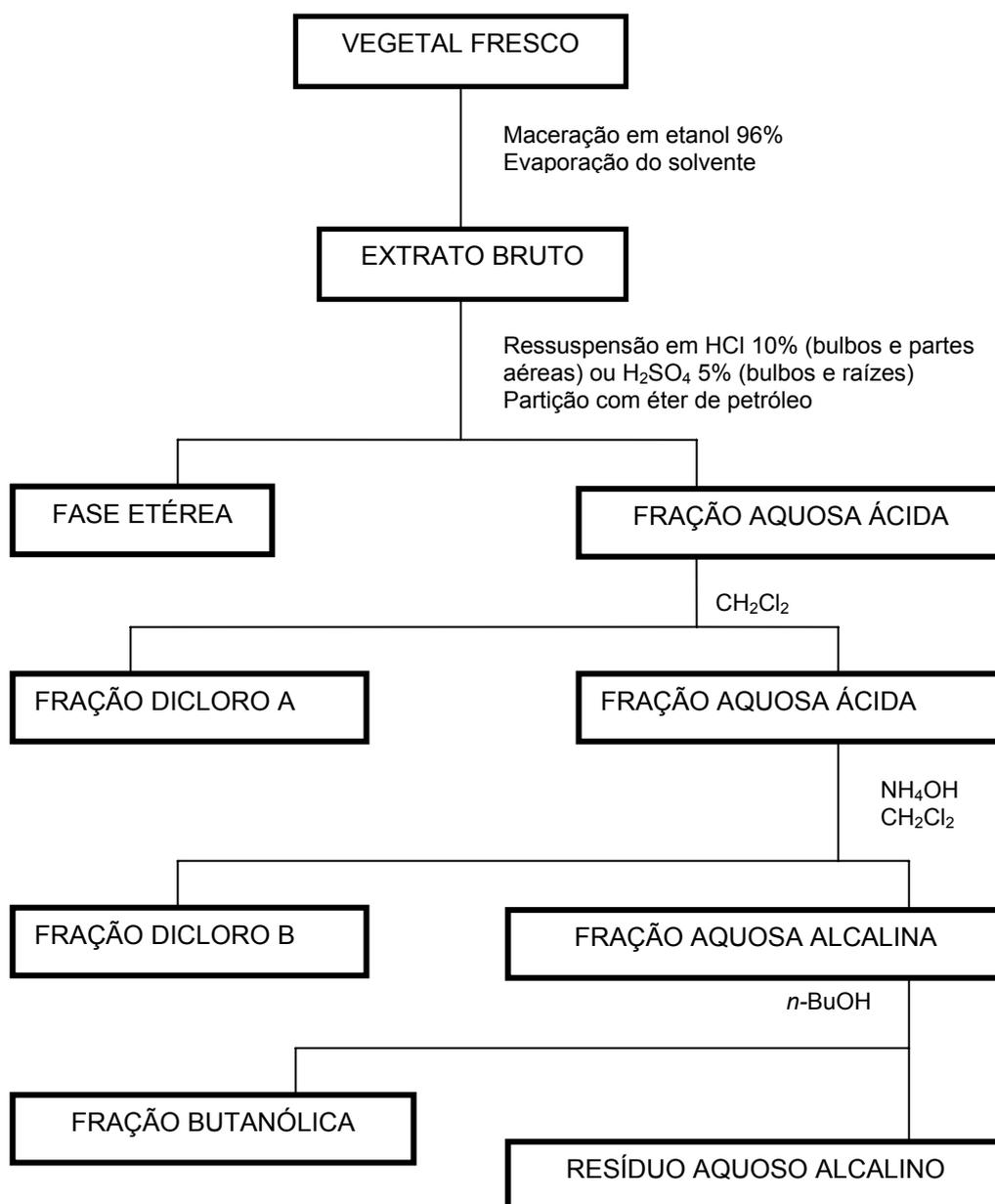


Figura 6: Esquema para obtenção dos extratos enriquecidos em alcalóides da espécie *Hippeastrum papilio*.

II.2.2 Detecção de inibidores da enzima acetilcolinesterase

II.2.2.1 Método descrito por MARSTON e colaboradores (2002).

O método consiste em dissolver a enzima acetilcolinesterase (1000 U) em 150 ml de tampão Tris-ácido clorídrico 0,05 M em pH 7,8. Albumina de soro bovino (150 mg) é adicionada à solução para estabilização da enzima. Solução estoque é mantida a 4 °C. As placas para CCD foram eluídas com solvente apropriado (acetona ou isopropanol) com intuito de limpezas das mesmas, e secas

imediatamente antes seu uso. Após a aplicação direta dos extratos enriquecidos em alcalóides, a placa foi seca, nebulizada com a solução estoque e seca novamente. Para incubação da enzima, a placa foi colocada na horizontal, sobre plataforma suspensa em um tanque contendo água (manutenção da umidade). A tampa foi mantida a 37 °C por 20 minutos. A enzima apresenta estabilidade satisfatória nestas condições.

Para detecção da enzima, após a incubação, as soluções de 1-naftil acetato (250 mg) em etanol (100 ml) e de “Fast Blue B salt” (400 mg) em água destilada (160 ml) foram preparadas imediatamente antes do uso (prevenir decomposição). Foram utilizados na mistura aproximadamente 10 ml da solução de naftil acetato e 40 ml da solução de “Fast Blue B salt” e, em seguida, nebulizadas na placa, ocorrendo desenvolvimento de coloração púrpura após 1 a 2 minutos (MARSTON *et al.*, 2002).

II.2.2.2 Método descrito por ELLMAN e colaboradores (1961) e modificado por LASSITER e colaboradores (2003).

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi determinada pela hidrólise do substrato sintético iodeto de acetilticolina (substrato) a uma concentração de 0,8 mM em 1mL de solução contendo 30 mM de tampão fosfato com Triton X-100 1% (pH 7,5) e 1,0 mM de DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic Acid), a 25°C. O homogeneizado de hipocampo de rato (50 µl) foi adicionado a mistura e pré-incubado por 3 min. A hidrólise da acetilcolina foi monitorada pela formação do diânion tiolato de DTNB de coloração amarela, em espectrofotômetro a 412 nm por 2 minutos (em intervalos de 30 segundos). A atividade enzimática foi expressa como µmol de acetilcolina por hora por grama de proteína.

II.2.3 Estudo comportamental

II.2.3.1 Animais Experimentais

Para a realização dos estudos comportamentais foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso entre 250-300 g, tendo-se um número mínimo de 10 animais

para cada parâmetro experimental. Os animais foram provenientes do biotério da Fundação Estadual para Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). A adaptação dos animais ocorreu por 72 horas no Biotério do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas – PUCRS. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas, forradas com maravalha, com capacidade máxima de cinco animais para cada caixa. Os animais tiveram livre acesso à comida e água e foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 h e escuro a partir das 19:00 h), a uma temperatura ambiente mantida em torno de 22° C e umidade monitorada. Após os experimentos, o sacrifício dos animais foi realizado em guilhotina, mantendo-se sempre o máximo de cuidado e precaução com o intuito de minimizar o sofrimento dos mesmos. Este protocolo está de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996), e está cadastrado no Comitê de Ética e Pesquisa (CEPE-UFRGS) sob o número 2007702.

II.2.3.2 Procedimento Cirúrgico

Pelo fato de, neste trabalho, objetivar-se a ação comportamental do alcalóide montanina diretamente na região de interesse, no nosso caso, a camada piramidal da região CA1 do hipocampo dorsal, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia de 0,2 mm de diâmetro e 9,0 mm de comprimento, posicionadas a 1,0 mm da região alvo. As coordenadas utilizadas para a cirurgia estereotáxica foram adaptadas do Atlas anatômico (PAXINOS e WATSON, 1986), e foram as seguintes: Antero posterior (AP) = - 4,2mm; Médio Lateral (MD) = \pm 3,0mm; Dorso Ventral (DV) = - 1,3mm; Inclinação Latero-lateral (INCL LL) = 0°. Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina (“Francotar”; Virba, ou “Vetanarcol”; König) juntamente com Xilazina, que é um sedativo/miorrelaxante/analgésico (“Coopazine”; Coopers), administrados intra-peritonealmente (*i.p.*), nas doses de 75mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. As cânulas-guia descritas acima foram fixadas com acrílico junto ao osso parietal do crânio dos ratos. As cânulas possuem 0,05 mm de diâmetro e 10,0 mm de comprimento, de modo que sua extremidade dirige-se para 1,0 mm além das cânulas-guia, quando introduzidas no interior destas, permitindo a infusão dos

fármacos exatamente na região desejada, com o mínimo possível de danos mecânicos (**Figura 7**).

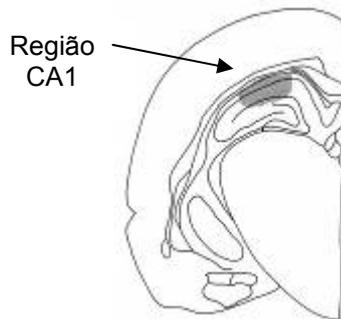


Figura 7: Desenho esquemático de um dos hemisférios do cérebro de rato, mostrando a região CA1 do hipocampo dorsal (região alvo).

II.2.3.3 Manipulação dos animais

Dois a quatro dias depois da cirurgia, os animais passaram por duas a três sessões de manipulação. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde o experimento foi conduzido, retirados de suas caixas e manuseados durante aproximadamente 2 minutos, de um modo parecido com os movimentos que foram realizados durante o experimento.

II.2.3.4 Substância teste

A substância teste utilizada na tarefa de reconhecimento de objetos foi o alcalóide montanina, que foi isolada, purificada e identificada da espécie *Hippeastrum vitattum*, nos padrões descritos no trabalho de SILVA (2005).

II.2.3.5 Tarefa de Reconhecimento de Objetos

II.2.3.5.1 Aparato de reconhecimento

O aparato para estudar reconhecimento de objetos consiste de um campo aberto retangular com 60 cm de comprimento por 40 cm de profundidade e 50 cm de altura o qual se encontra em uma sala com baixa luminosidade e isolada

acusticamente. A parte frontal do campo aberto é constituída de vidro, para a melhor visualização do animal. Antes de serem submetidos à tarefa de reconhecimento, os animais passaram por um processo de habituação ao dispositivo experimental (campo aberto sem os objetos) durante 4 dias, na qual se constituía de uma sessão comportamental diária de 20 min na qual os animais eram colocados individualmente no campo aberto para que o explorassem livremente (KELLY *et al.*, 2003; AKIRAV e MAROUN, 2006). Após a passagem de cada animal, o campo aberto era limpo com solução etanólica (30 %), para evitarem-se pistas olfativas entre os animais. Os objetos utilizados na tarefa de reconhecimento foram confeccionados em metal, vidro ou cerâmica. Nenhum dos objetos possui significância comportamental para os animais experimentais, os quais não demonstram nenhuma preferência por qualquer um deles, observado por estudos *piloto* realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa. Cada objeto foi preso ao assoalho do campo aberto pela base, estando aproximadamente 20 cm de distância um do outro, e das paredes laterais do campo aberto. Tanto a arena do campo aberto como os objetos estímulo também eram limpos com solução etanólica (30 %) entre a passagem de cada animal, garantindo-se novamente ausência de pistas olfativas. A exploração foi definida como cheirar ou tocar os objetos, com o focinho ou as patas dianteiras. Sentar-se no objeto, apoiar-se nas patas dianteiras em cima do objeto para visualizar do campo além do objeto ou permanecer ao redor dele não foram considerados comportamento exploratório. O tempo gasto explorando cada objeto foi medido por um observador.

A tarefa consiste na medição do tempo gasto pelo animal explorando cada objeto. Na sessão de treino (*T1*), após os quatro dias de habituação, o animal é largado na caixa de campo aberto na presença de dois objetos idênticos (objeto *a*), exatamente no meio dos objetos, permitindo-os um tempo máximo de exploração dentro do campo aberto de cinco minutos. Durante este período, foi medido o tempo de exploração gasto pelos animais nos dois objetos (*a1* e *a2*). A substância teste (montanina) foi administrada imediatamente pós-treino para o grupo experimental, e administrado veículo (solução salina) para o grupo controle. Na sessão de teste (*T2* - realizada 24 horas após *T1*), os animais foram colocados no mesmo campo aberto, porém na presença de um novo objeto (objeto *b*), no lugar de um dos objetos da sessão treino (troca aleatória), sendo que, novamente, por um tempo máximo de

cinco minutos, foi medido o tempo gasto de exploração em ambos os objetos (*a* e *b*) (PRICKAERTS *et al.*, 2004).

II.2.3.5.2 Análise estatística dos resultados

A medida básica utilizada nesta tarefa de reconhecimento de objetos foi dada pelo tempo de exploração em cada objeto, em *T1* e *T2* (**Tabela 5**). As siglas *e1* e *e2* foram as medidas do tempo de exploração total em *T1* e *T2*, respectivamente. O índice *h1* foi considerado uma medida de habituação global do comportamento exploratório em *T1* e *T2*. O índice *d2* foi considerado como uma medida da discriminação entre o objeto familiar (objeto *a*) e o objeto novo (objeto *b*).

Para a avaliação estatística foi utilizado o teste-t não pareado das doses individuais comparadas ao grupo controle, baseado no trabalho de PRICKAERTZ e colaboradores (2004). Na obtenção da curva dose resposta nós utilizamos ANOVA de UMA VIA seguida do Tukey's Multiple Comparison test. Valores de *p* menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Para a análise dos dados, utilizamos o software Graph-Pad Prism.

Tabela 5: Medidas envolvendo o teste de reconhecimento de objetos. *E1* é o tempo gasto na exploração dos objetos idênticos (*a1* e *a2*) em *T1*, e *e2* é o tempo gasto de exploração do objeto familiar (*a*) e do objeto novo (*b*) em *T2*. *h1* é a medida de habituação global em *T1* e *T2*. *d2* é uma medida relativa da discriminação entre o objeto novo e o familiar, no qual é dada pela discriminação absoluta (*b - a*) dividido pela atividade exploratória (*e2*).

EXPLORAÇÃO	HABITUAÇÃO	DISCRIMINAÇÃO
$e1 = a1 + a2$ $e2 = a + b$	$h1 = e1 - e2$	$d2 = (b - a)/e2$

II.2.3.5.3 Tratamentos e obtenção da curva dose-resposta

A substância teste (alcalóide (-)-montanina) foi administrada nas doses de 1 µg/µl/lado, 0,1 µg/µl/lado e 0,01 µg/µl/lado, utilizando-se soro fisiológico como veículo de dissolução, imediatamente após o treino, na tarefa de reconhecimento de

objetos. O teste foi realizado 24 horas após o final da sessão de treino, e as três doses administradas permitiram a obtenção da curva-dose resposta.

II.2.3.5.4 Tratamentos e obtenção da curva temporal

Após o resultado da curva dose-resposta, o alcalóide montanina foi administrado na dose em que foi observada atividade pró-cognitiva (no caso, 1 µg/µl/lado), na mesma tarefa de reconhecimento de objeto, mas com intervalos de administração pós-treino de 180 e 360 min. O teste foi realizado 24 horas pós-treino.

II.2.3.5.5 Controle histológico da localização das cânulas-guia e do local de infusão

A verificação anatômica do posicionamento das cânulas-guia e local atingido pela infusão foi realizada *post mortem*. Após a realização da tarefa de reconhecimento de objeto os animais receberam 0,8µl de uma solução de azul de metileno 0,1% através das cânulas como descrito acima. Aproximadamente quinze minutos depois foram sacrificados, seus cérebros removidos e colocados numa solução de formol 4% por um período de 4 a 7 dias. Na análise histológica, somente os animais que apresentaram a mancha azul de metileno num raio de 2 mm do local desejado foram considerados na análise estatística dos dados.

II.2.3.6 Descarte dos resíduos biológicos

Os resíduos biológicos remanescentes dos experimentos foram acondicionados em sacos plásticos brancos leitosos e armazenados em “freezer” (temperatura entre -10 e -20°C) específico para este fim, até o seu recolhimento semanal realizado pela coleta especial de resíduos biológicos do biotério em questão.

O descarte dos materiais perfurocortantes foi realizado através do acondicionamento destes em recipientes rígidos (que não permite rupturas), sendo este armazenado e recolhido semanalmente pela coleta especial do mesmo biotério.

CAPÍTULO III
RESULTADOS

III.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

III.1.1 Coleta

Foram coletados bulbos, raízes e partes aéreas, os quais foram submetidos ao processo de maceração, conforme método apresentado no item 4.2.1.2. O primeiro dado experimental realizado foi o teor de umidade, sendo que, os valores em gramas da quantidade do material coletado e do extrato bruto liofilizado, e em porcentagem do teor de umidade das respectivas partes do vegetal, estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Resultados iniciais da análise fitoquímica (quantidade de material vegetal) da espécie *Hippeastrum papilio*.

Parte do vegetal	Material fresco (g)	Extrato bruto liofilizado (g)	Teor de umidade (%)
Partes aéreas	4926	227,80	89,64
Bulbos	4101	291,87	79,75
Raízes	564	13,13	86,78

III.1.2 Rendimento dos extratos

Empregando-se método de extração ácido-base, e apresentado no item 4.2.1.2., o rendimento das frações referentes a bulbos e partes aéreas (em gramas e em porcentagem) está mostrado na **Tabela 7**, para a extração utilizando HCl como reagente ácido.

Tabela 7: Rendimento das frações enriquecidas em alcalóides da espécie *Hippeastrum papilio*, dos bulbos e partes aéreas, em extração utilizando HCl como solvente ácido.

Frações	Bulbos		Partes aéreas	
	Massa (g)	%	Massa (g)	%
CH ₂ Cl ₂ A	0,633	1,05	1,61	2,30
CH ₂ Cl ₂ B	2,716	4,49	1,58	2,26
<i>n</i> -butanol	18,90*	31,26	30,11*	43,06
Extrato bruto liofilizado utilizado	60,45		69,93	

* as amostras das frações *n*-butanol de ambas as partes secam parcialmente por liofilização.

Os rendimentos das frações da extração ácido-base, referentes à utilização de H₂SO₄ como solvente ácido, estão apresentados na **Tabela 8**. Esses dados referem-se a raízes e bulbos novamente, para comparação do perfil alcaloídico de ambas extrações.

Tabela 8: Rendimento das frações enriquecidas em alcalóides da espécie *Hippeastrum papilio*, de raízes e bulbos, em extração utilizando H₂SO₄ como solvente ácido.

Frações	Bulbos		Raízes	
	Massa (g)	%	Massa (g)	%
CH ₂ Cl ₂ A	0,32	0,53	0,07	0,88
CH ₂ Cl ₂ B	1,65	2,74	0,27	3,38
<i>n</i> -butanol	3,68	6,12	0,561	7,01
Extrato bruto liofilizado utilizado	60,09		8,0	

Obtidos as frações enriquecidas em alcalóides, da extração ácido-base de bulbos, utilizando HCl como solvente ácido, os mesmos foram analisados por CLAE (item 4.1.4.2.1), e obtidos os perfis cromatográficos apresentados na **Figura 8**.

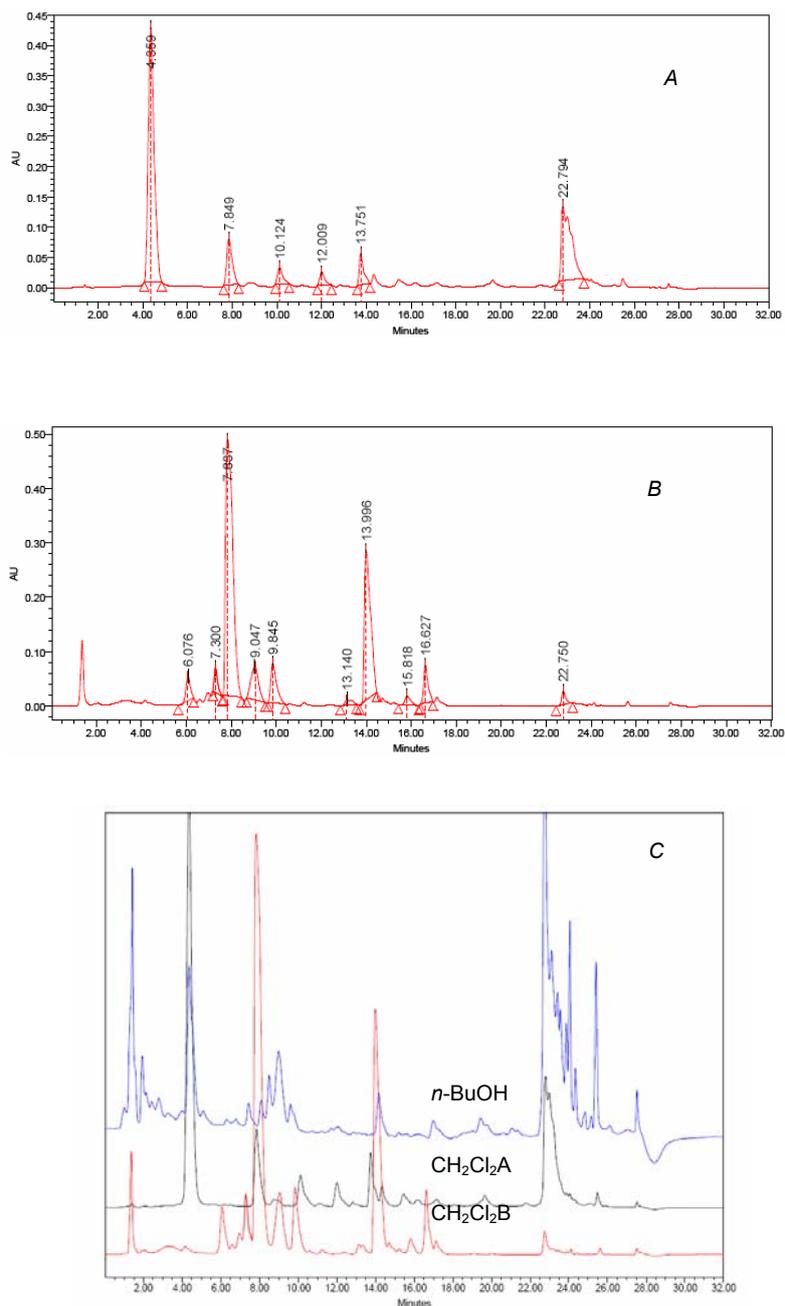


Figura 8: Perfil cromatográfico a 290 nm dos extratos obtidos da extração ácido-base de bulbos. Em A, perfil cromatográfico de extrato CH₂Cl₂A. Em B, perfil cromatográfico do extrato CH₂Cl₂B. Em C, sobreposição de ambos perfis (CH₂Cl₂A e CH₂Cl₂B), juntamente com fração *n*-butanólica (*n*-BuOH) de bulbos.

Com relação a partes aéreas, da mesma forma, foi analisado o perfil cromatográfico por CLAE (item 4.1.4.2.1), das frações obtidas da extração ácido-

base, utilizando HCl como solvente ácido, e os resultados se encontram mostrados na **Figura 9**.

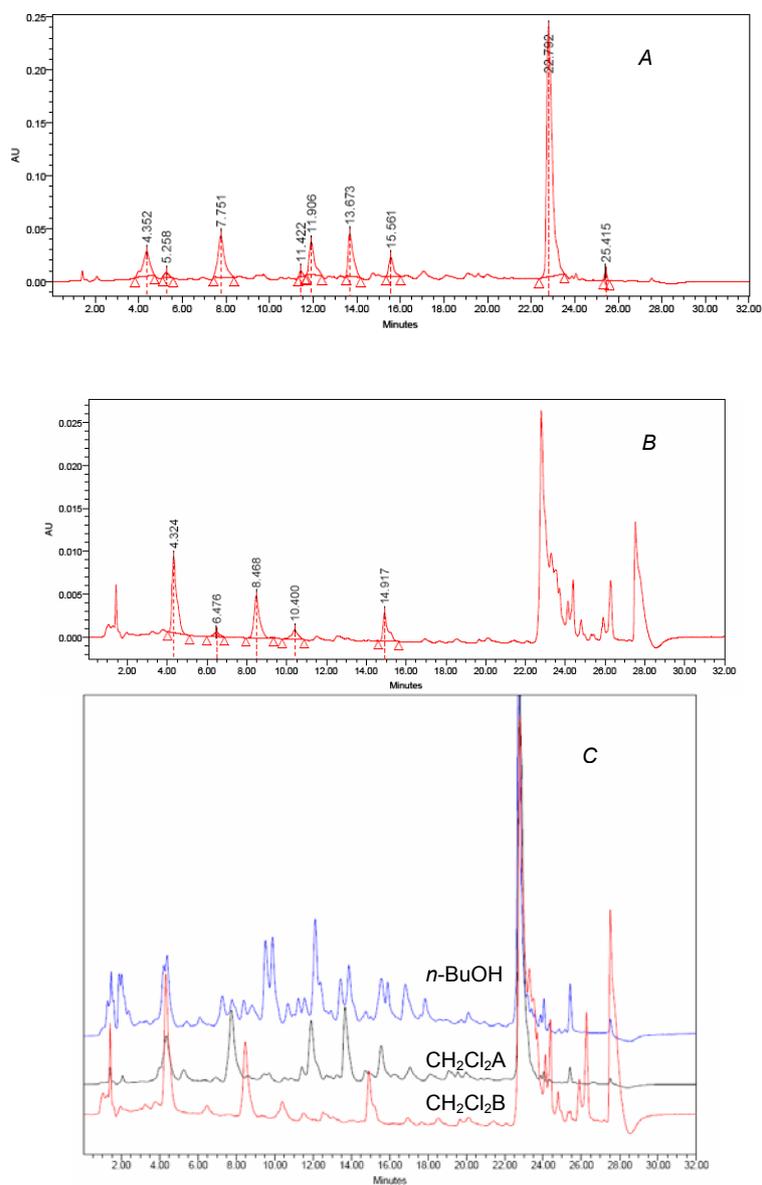


Figura 9: Perfil cromatográfico a 290 nm dos extratos obtidos da extração ácido-base de partes aéreas. Em A, perfil cromatográfico de extrato CH₂Cl₂A. Em B, perfil cromatográfico do extrato CH₂Cl₂B. Em C, sobreposição de ambos perfis (CH₂Cl₂A e CH₂Cl₂B), juntamente com fração *n*-butanólica (*n*-BuOH) de partes aéreas.

Para fins de comparação, analisamos por CLAE, ambos os extratos de bulbos (CH₂Cl₂B - extração com HCl e CH₂Cl₂B - extração com H₂SO₄) empregando-se

método descrito no item 4.1.4.2.1, e os cromatogramas estão representados na **Figura 10**.

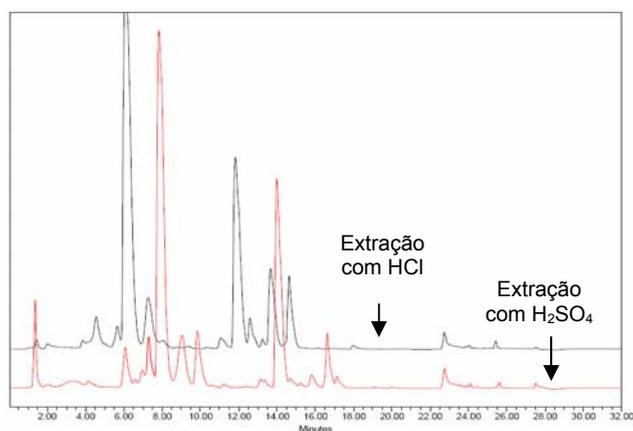


Figura 10: Cromatogramas obtidos a 290 nm, em comparação entre as frações enriquecidas em alcalóides CH₂Cl₂ B (extração com HCl) e CH₂Cl₂ B (extração com H₂SO₄), conforme indicado na figura.

Obtendo-se, portanto, todos os extratos enriquecidos em alcalóides, e com o objetivo de investigação preliminar de seu perfil alcaloídico, foi empregada técnica de CG-EM (apresentada no item 4.1.5).

Para tanto, foi submetido a análise por CG-EM as frações enriquecidas em alcalóides CH₂Cl₂A e CH₂Cl₂B de bulbos e partes aéreas, da extração com solvente ácido HCl, e extrato bruto liofilizado de raízes.

A análise de nossos extratos informa a existência de alcalóides pertencentes principalmente de núcleos licorina e haemantamina (**Figura 11**). Foi possível realizar a identificação de vários alcalóides (**Tabela 9**), através de comparação dos perfis de fragmentação das bases separadas com biblioteca digital de padrões. Quando ocorria co-eluição dos compostos, estes eram submetidos ao sistema “*deconvolution*” em software AMDIS 2.640. Pode-se observar a existência de núcleo licorina e haemantamina principalmente, e galantamina em menor quantidade. O composto majoritário, que representa 50 a 75%, aproximadamente, do conteúdo de alcalóides em todas as frações, trata-se de alcalóide do núcleo tipo licorina, porém não identificado pela biblioteca de fragmentação que temos disponível.

Possivelmente trata-se de uma base nova. O segundo composto majoritário foi identificado como o alcalóide haemantamina (**Figuras 12**) e representa aproximadamente 15 a 25% do conteúdo de alcalóides em todas as frações.

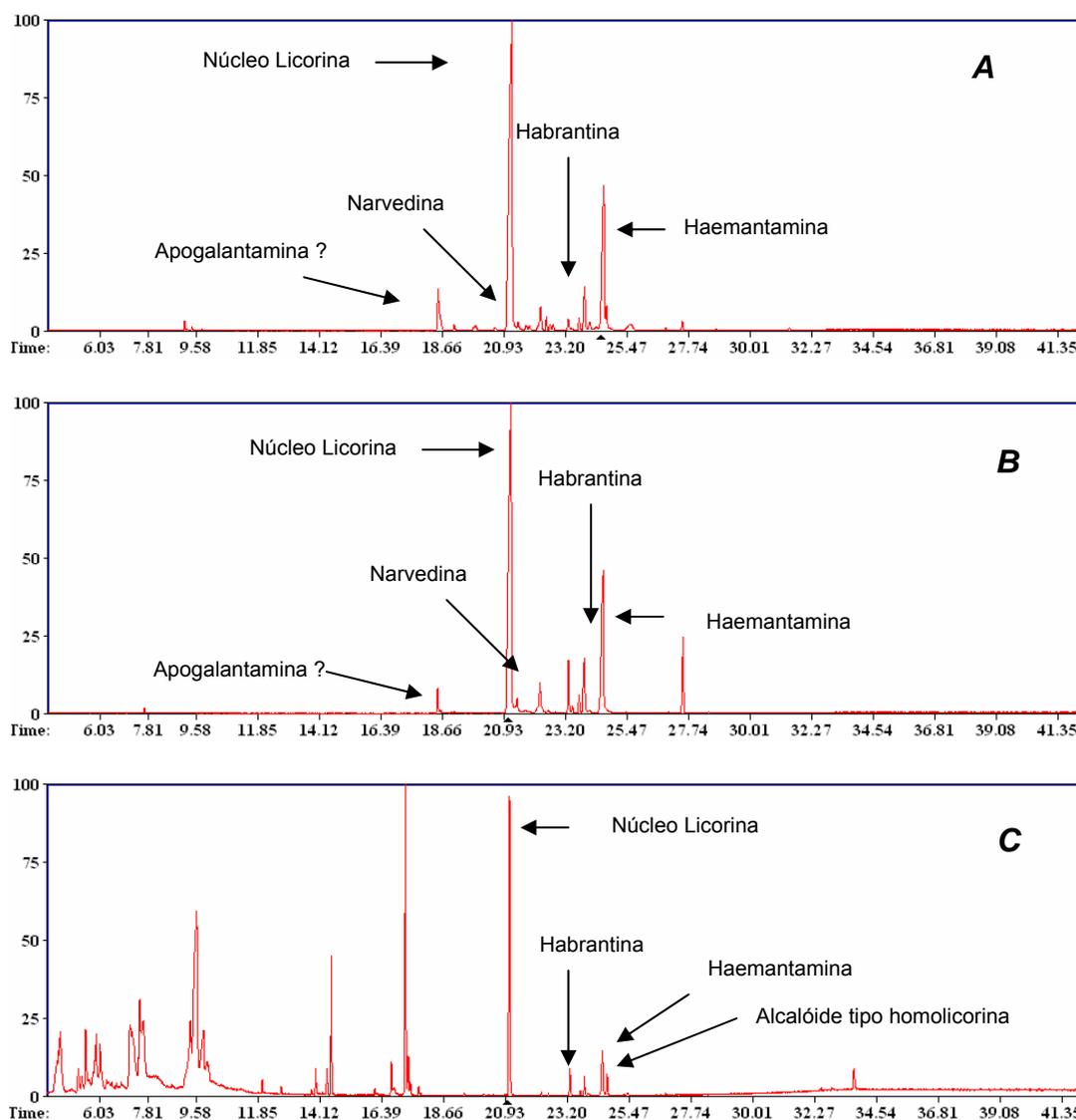


Figura 11: Cromatograma obtido por CG-EM, com as respectivas bases indentificadas indicadas. Em **A**, fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$ de bulbos; em **B**, fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$ de partes aéreas e em **C**, extrato bruto de raízes.

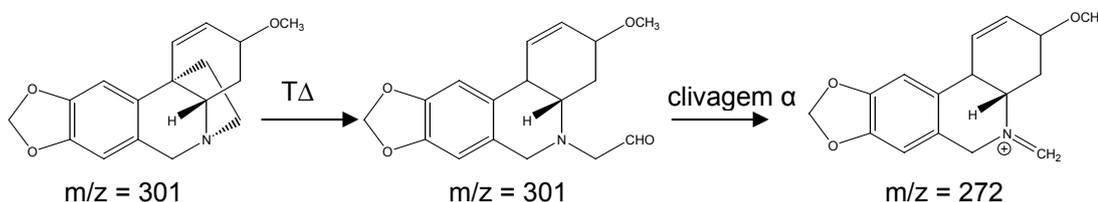
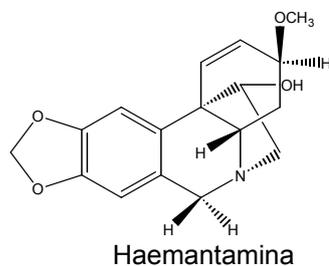
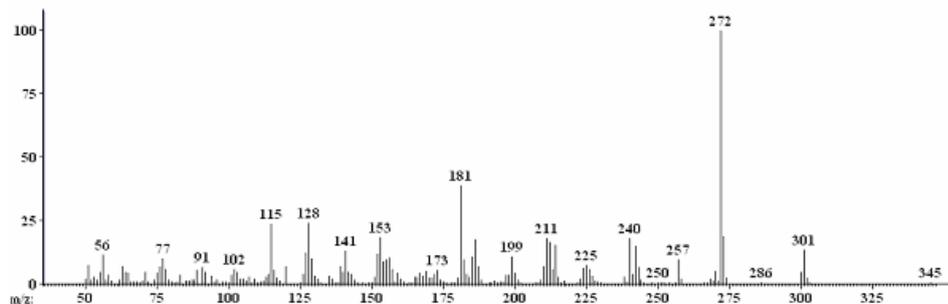


Figura 12: Espectro de massas obtido por técnica de CG-EM do alcalóide haemantamina e proposta de fragmentação por CG-EM (KREH *et al.*, 1994).

Pelos resultados mostrados também se observa a presença de bases não identificadas, que está ao redor de 5% nas frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$ de partes aéreas e bulbos, e no extrato bruto de raízes. Este resultado motiva a continuação dos estudos químicos da espécie, para a tentativa de isolamento, purificação e identificação destas bases. Outro dado interessante é a presença de núcleos tipo galantamina, com alcalóides identificados como sanguinina e narvedina, que igualmente possuem excelentes perfis de inibição da enzima acetilcolinesterase,

sendo que o alcalóide sanguinina, por exemplo, tem atividade inibidora da enzima superior a da própria galantamina (LOPEZ *et al.*, 2002).

Uma informação de grande importância que nos trouxe esta análise por CG-EM, foi a de que o extrato *n*-butanólico é muito pobre em alcalóides, observação esta também evidente em análise por CCD com reativo de Dragendorff.

Tabela 9: Resultados da análise por CG-EM das frações enriquecidas em alcalóides, das diferentes partes (bulbos, raízes e partes aéreas) da espécie *Hippeastrum papilio*.

COMPOSTO	PARTES AÉREAS		BULBOS		RAÍZES
	CH ₂ Cl ₂ A (%)	CH ₂ Cl ₂ B (%)	CH ₂ Cl ₂ A (%)	CH ₂ Cl ₂ B (%)	Extrato Bruto (%)
Possivelmente núcleo licorina	69,69	55,79	50,75	58,97	74,84
Haemantamina	26,33	22,53	20,76	20,93	16,41
Habrantina	-	6,09	-	4,26	3,87
Narvedina	3,07	4,12	6,53	2,57	Traços
Vitatina	-	-	2,58	Traços	-
Sanguinina	-	2,15	-	0,82	-
Possivelmente apogalantamina	-	-	-	0,82	-
Bases não identificadas	Traços	± 5	Traços	± 5	± 5

III.1.3 Isolamento dos alcalóides

III.1.3.1 Raízes:

Durante o processo de extração, quando se estava realizando a secagem sob pressão reduzida da fração CH₂Cl₂B, em equipamento evaporador rotatório, ocorreu intensa precipitação que se acumulou nas paredes do balão, visíveis a olho nu. Havia a formação de cristais, os quais foram separados do restante da fração por lavagem com metanol, que solubilizava o sobrenadante, porém não os cristais. Após esta separação, calculou-se o rendimento deste precipitado, que forneceu 178,3 mg de massa e foi chamado de **JP1**.

III.1.3.1.1 JP1

Este precipitado foi submetido à CLAE, empregando-se método apresentado no item 4.1.4.2.1, para se avaliar a pureza do cristal. Podemos observar que este

isolado, apesar de ter sido separado por precipitação, não se apresentava puro. A análise por espectroscopia na região do UV que o detector PDA nos permite observar mostra que existem pelo menos três substâncias, como está representado na **Figura 13**.

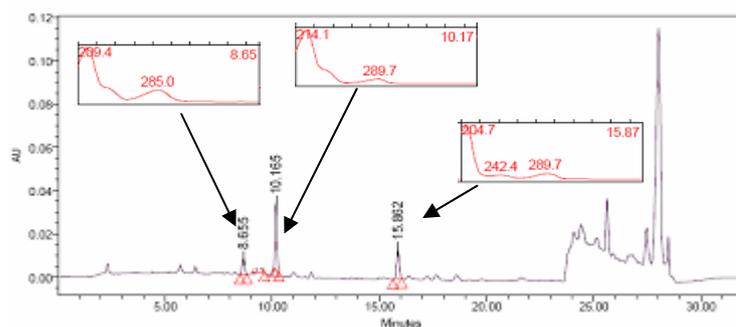


Figura 13: Perfil cromatográfico de **JP1**, a 290 nm, apresentando três substâncias, com respectivos espectros de UV.

Com a observação de que este precipitado não se encontrava puro, este precipitado foi submetido à análise utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM). Este ensaio foi realizado no Centro de Bioequivalência de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia desta Universidade. Para tanto, foi necessário testar um novo sistema cromatográfico para a análise por CLAE-EM, principalmente pelo fato de que, na interface entre o sistema cromatógrafo e o detector por espectrometria de massas, deve haver, no mínimo, 30% de solvente orgânico, para que seja possível a detecção no espectrômetro de massas. Com isso, foram testados outros sistemas eluentes, contemplando no mínimo 30% de solvente orgânico (neste caso, melhor perfil com solvente orgânico acetonitrila) e, além disso, o sistema deve ser isocrático, pois em sistema gradiente, a análise por CLAE-EM fica dificultada, e seu resultado duvidoso.

Na análise por CLAE-EM, foi utilizado sistema apresentado no item 4.1.4.3.2, e obtido o perfil cromatográfico apresentado na **Figura 14**.

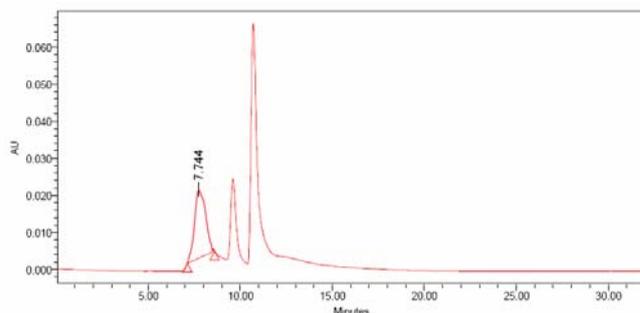


Figura 14: Cromatograma a 290 nm obtido de **JP1** (com sistema cromatográfico do item 4.1.4.3.2 e equipamento do item 4.1.4.2)

O espectro de massas de **JP1**, obtido na análise por injeção direta do analito no detector (concentração 20 µg/ml), na qual o equipamento detecta os picos de íons moleculares está apresentado na **Figura 15**, por *elétron-spray positivo* com energia de impacto de $7,69 \times 10^6$.

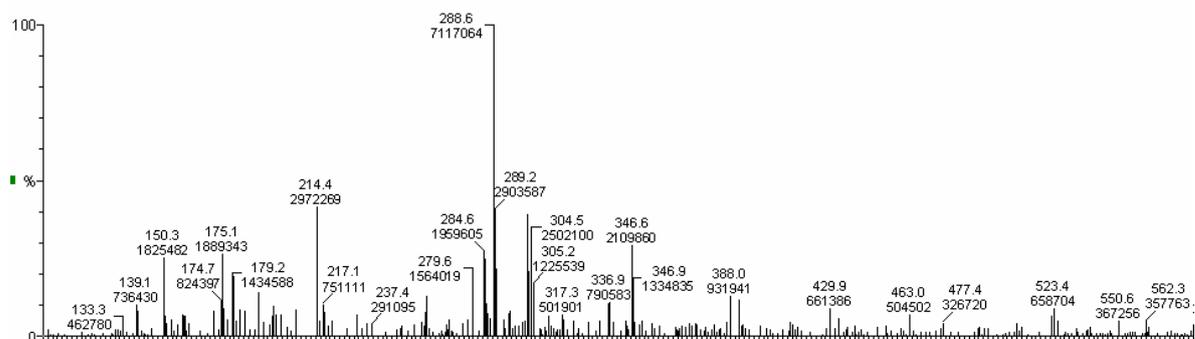


Figura 15: Espectro obtido por injeção direta no detector de massas de **JP1**.

Na análise em CLAE-EM, foram obtidos os seguintes cromatogramas, representando os picos de íons moleculares obtidos no método de injeção direta, que são $E+1 = 288$ e $E+1 = 302$ (no espectro acima, mostrado pelo sinal em 304,5). Os cromatogramas estão apresentados na **Figura 16**.

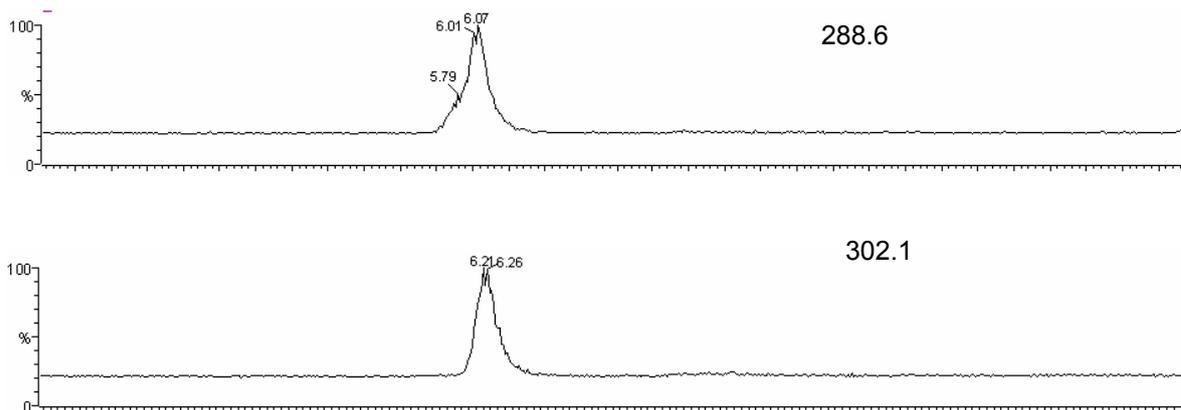


Figura 16: Cromatogramas obtidos por CLAE-EM mostrando dois sinais de E+1 (288,6 e 302,1) e seus respectivos t_r .

A existência destes dois sinais de íons moleculares aponta para o mesmo resultado mostrado no CG-EM. Com um pico de íon molecular de 287 (E+1 = 288,6) pode estar sugerindo moléculas de núcleo tipo licorina (como a própria licorina) tal como observado para o alcalóide majoritário na análise por CG-EM. Um pico de íon molecular de 301 (E+1 = 302,1), também sugere de que se trata do alcalóide haemantamina, tal como observado por CG-EM.

III.1.3.2 Bulbos

Os extratos $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$ (extração HCl) e $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$ (extração H_2SO_4) quando ressuspendidos em metanol, afim de realização de CCD analítica, apresentaram intensa precipitação. Assim, foi separado o precipitado por centrifugação, porém, na tentativa de lavagem do precipitado utilizando metanol, cada vez mais diminuía a quantidade de precipitado, indicando que possivelmente, deva ocorrer uma nova solubilização do mesmo, com a adição de metanol. No entanto, foi separado o precipitado e analisado por CLAE, no qual se mostrou solúvel na FASE A do método gradiente utilizado no CLAE, utilizando-se detector apresentado no item 4.1.4.2.2. O perfil cromatográfico está apresentado na **Figura 17**.

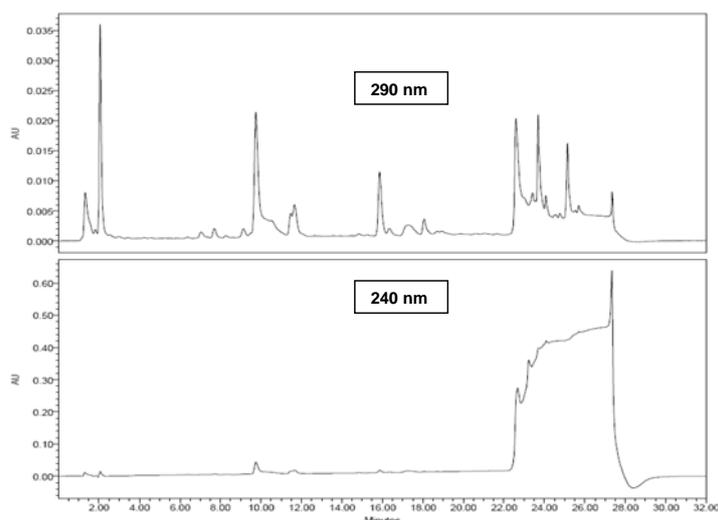


Figura 17: Cromatograma a 290 nm do precipitado de CH₂Cl₂B (extração HCl)

Para os isolamentos dos alcalóides, o sobrenadante da fração CH₂Cl₂B, obtida pela extração utilizando HCl como reagente ácido, foi submetido à cromatografia em coluna (coluna 1), em sistema gradiente, iniciando-se com mistura de 50:50 de CH₂Cl₂:MeOH e aumentando-se gradualmente a polaridade do sistema, conforme apresentado na **Tabela 10**, finalizando-se com adição de ácido trifluoroacético (TFA), afim de retirar possíveis substâncias aderidas à sílica, e obtendo-se 100 frações no total.

Tabela 10: Sistema gradiente de solventes CH₂Cl₂ e MeOH utilizado na coluna 1.

FRAÇÕES	PROPORÇÃO CH ₂ Cl ₂ :MeOH
01 a 10	50:50
10 a 23	48:52
24 a 26	44:56
27 a 34	40:60
35 a 41	30:70
42 a 50	20:80
51 a 54	10:90
55 a 59	10:90 (0,1% TFA)
60 a 63	10:90 (0,2% TFA)
64 a 71	05:95 (0,3% TFA)
71 a 85	05:95 (0,3% TFA)
85 a 100	00:100 (0,4% TFA)

Foi utilizado cerca de 60 g de sílica e a massa de amostra utilizada foi de 440 mg. Após a realização da coluna, as frações foram analisadas por CCD e aquelas

que apresentaram perfil semelhante foram reunidas. As frações na qual houve dúvidas quanto a sua pureza por CCD (**JP2** e **JP3**), foram analisadas em CLAE, conforme método apresentado no item 4.1.4.2. As frações com perfil semelhante estão apresentadas a seguir, na **Tabela 11**.

Tabela 11: Frações obtidas da coluna 1, reunidas após análise de seu perfil cromatográfico por CCD e/ou CLAE.

AMOSTRA	FRAÇÕES	RENDIMENTO (mg)
JP2	68 a 74	8,36
JP3	28 a 30	10,0
JP4	81 a 87	55,6
JP5	88 a 99	22,3

As amostras **JP2** e **JP3**, na análise por CCD, revelaram cromatograficamente com reativo clássico de Dragendorff, indicando que possivelmente se tratavam de alcalóides. No entanto, apenas **JP3** apresentou um grau de pureza necessário para elucidação estrutural (**Figura 18**).

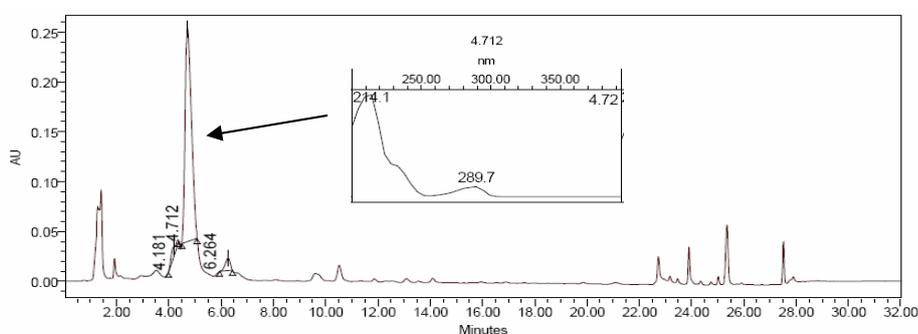


Figura 18: Perfil cromatográfico a 290 nm da amostra **JP3**, e análise em UV do sinal com tempo de retenção 4,71 minutos.

Também foi observada a existência de frações nesta coluna, na qual apresentaram relativa pureza na análise por CCD, no entanto com muito baixo rendimento. Para tanto, foram isolados em uma segunda coluna cromatográfica (coluna 2), com o objetivo de aumentar o rendimento das frações, com a adição de mais quantidade de extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{B}$ (sobrenadante), e também maior quantidade de

sílica, afim de também aumentar a resolução cromatográfica e a capacidade da coluna. Foram empregados, então, 95 g de sílica e massa de amostra de 525 mg. Iniciou-se, novamente, com mistura de 50:50 de CH₂Cl₂:MeOH, sendo aumentada gradualmente a polaridade do sistema, conforme apresentado na **Tabela 12**.

Da mesma forma, os perfis semelhantes foram reunidos, após análise por CCD. As frações reunidas estão apresentadas na **Tabela 13**. A amostra **JP9**, após a união das frações correspondentes apresentou um precipitado, sendo separado por centrifugação, correspondente a amostra **JP7**.

Tabela 12: Sistema gradiente utilizado na coluna 2.

FRAÇÕES	PROPORÇÃO CH ₂ Cl ₂ :MeOH
01 a 18	50:50
19 a 40	48:52
41 a 52	44:56
53 a 66	40:60
67 a 79	35:65
80 a 88	75:25
89 a 95	10:90
95 a 100	00:100
100 a 110	00:100 (0,2% TFA)
110 a 140	00:100 (0,3% TFA)
140 a 190	00:100 (0,4% TFA)
100 a 190	00:100 (0,4% TFA)

Tabela 13 : Amostras obtidas a partir da coluna 2.

AMOSTRA	FRAÇÕES	RENDIMENTO (mg)
JP7	16 a 29 (precipitado)	13,3
JP9	16 a 29 (sobrenadante)	14,3
JP10	179 a 183	7,3
JP11	150 a 158	16,9
JP12	50 a 80	116,3

Todas as amostras, exceção feita apenas a **JP9**, revelam com reativo de Dragendorff, em CCD analítica. A seguir, é mostrado o perfil cromatográfico de **JP7**, **JP11** e **JP12**, nas **Figuras 19, 20 e 21**, respectivamente.

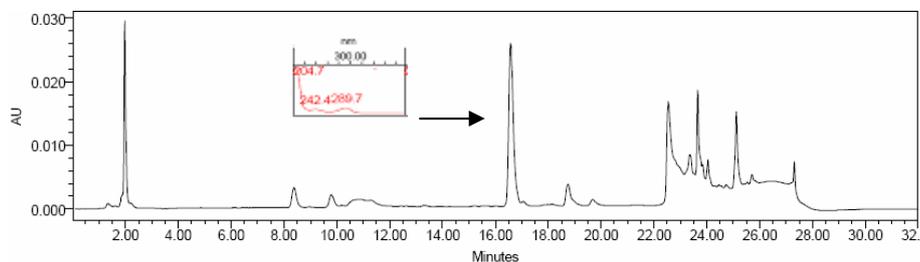


Figura 19: Cromatograma de **JP7** a 290 nm, e análise do sinal por UV

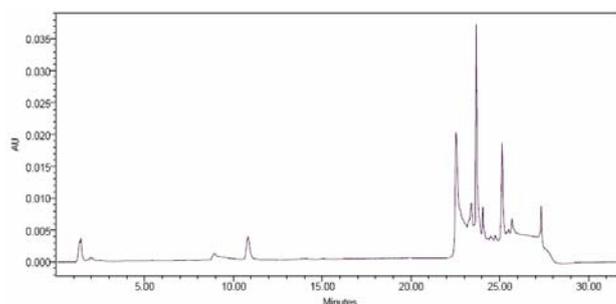


Figura 20: Cromatograma de **JP11** a 290 nm, obtido por CLAE, em equipamento com detector UV-VIS.

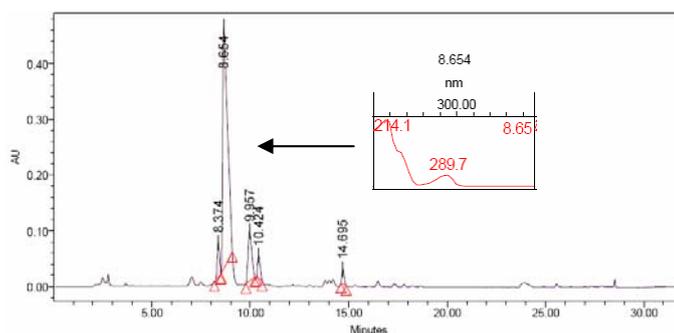


Figura 21: Perfil cromatográfico a 290 nm de **JP11**, no qual apresenta um composto majoritário, (t_r 8,654 min).

Todos estes compostos isolados que apresentam um relativo grau de pureza foram submetidos a elucidação estrutural através de técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), sendo que, como o objetivo da presente dissertação era

o de iniciar a investigação fitoquímica da espécie em questão, estes resultados não estão apresentados.

III.2 ANÁLISE BIOLÓGICA

III.2.1 Atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase

III.2.1.1 Avaliação dos extratos de *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen.

Foram analisados os extratos enriquecidos em alcalóides da espécie *Hippeastrum papilio*, quanto sua atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, pelo método descrito por MARSTON e colaboradores (2002), e que está apresentado no item II.2.2.1. A formação do halo na cromatoplaça, evidencia a atividade de inibição da enzima. Os extratos enriquecidos em alcalóides apresentaram inibição da enzima (**Figura 22**).

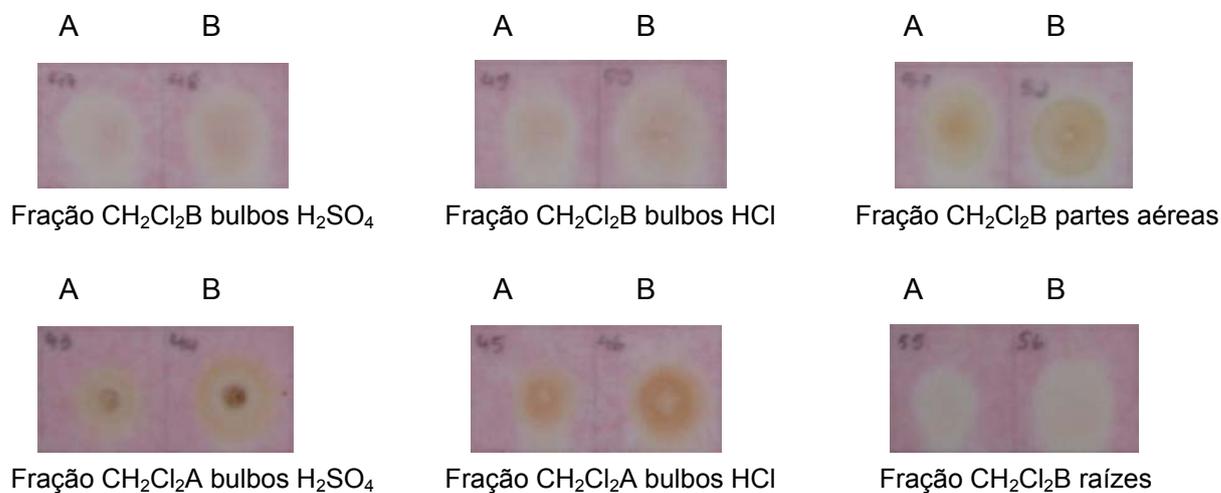


Figura 22: Seções das cromatoplaças da atividade anti-acetilcolinesterase (MARSTON *et al.*, 2002). As letras A e B se relacionam as quantidades de 10 e 20 µl, respectivamente, na concentração de 5 µg/µl, para todos os extratos.

III.2.2 Tarefa de reconhecimento de objetos

O alcalóide montanina já demonstrou importantes atividades no SNC, administrada intraperitonealmente tais como atividade ansiolítica, anticonvulsivante, sedativa e também antidepressiva (SILVA *et al.*, 2006). Entretanto, neste mesmo trabalho, foi observado que este alcalóide não alterou significativamente a memória de ratos na tarefa de esquila inibitória, visto que não houve mudança significativa no tempo de permanência dos ratos sobre a plataforma, na sessão de teste realizada 24 horas após o treino.

No entanto, devido este alcalóide apresentar um bom potencial inibidor da enzima acetilcolinesterase pelo método descrito por MARSTON e colaboradores (2002) e ter apresentado potencial de fosforilação (ativação) de enzimas relacionadas com a plasticidade sináptica no SNC (SILVA, 2005) foi estudado seu potencial pró-cognitivo, com injeção intra-hipocampal, a fim de obter-se um dado comportamental (tarefa de reconhecimento de objetos) de sua possível atividade mnemônica, visto que, a administração deste alcalóide via intra-peritoneal se torna de difícil interpretação relacionada à memória, sob pena de que seu aparentemente não efeito neste processo resulte do desconhecimento de seu perfil farmacocinético.

Para tanto, foi realizada a tarefa de reconhecimento de objetos, adaptada de PRICKAERTS e colaboradores (2004), que estudou o perfil pró-mnésico de inibidores da enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) e de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), dentre eles o fármaco clássico utilizado para a DA, donepezil.

III.2.2.1 Curva dose-resposta

Foi realizada a administração do alcalóide (-)-montanina imediatamente pós-treino, nas dosagens de 0,01 µg/µl, 0,1 µg/µl e 1 µg/µl, obtendo a curva dose-resposta representada abaixo (**Figura 23**). O teste foi realizado 24 horas pós-treino.

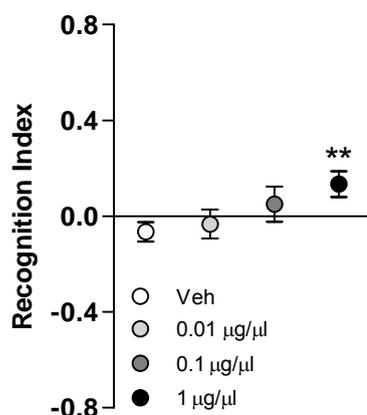


Figura 23: Curva dose-resposta do alcalóide montanina na tarefa de reconhecimento de objetos, nas doses de 1µg/µl (1), 0,1µg/µl (0,1) e 0,01µg/µl (0,01), administrada imediatamente pós-treino. Utilizado teste *t* não pareado na comparação entre as doses individuais e controle. Utilizado ANOVA de UMA VIA seguido de Tukey's Multiple Comparison test, para obtenção da curva dose-resposta. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente estatísticos. Para a análise dos dados, utilizamos o software Graph-Pad Prism ($n=10-15$).

III.2.2.2 Curva temporal

Com o resultado da curva dose-resposta, observando valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de atividade pró-cognitiva, comparada ao grupo controle, somente na dose de 1µg/µl do alcalóide montanina, foi construída a curva temporal, para esta mesma tarefa, com administração nesta mesma dose (1µg/µl) em intervalos pós-treino de 180 e 360 min. Da mesma forma, o teste foi realizado 24 horas pós-treino, e a curva temporal esta representada na **Figura 24**.

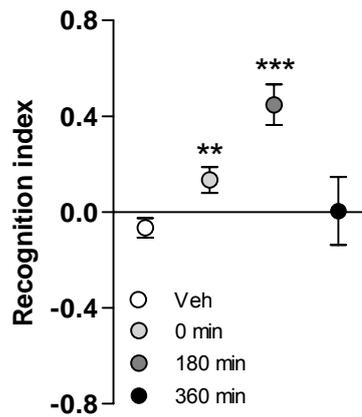


Figura 24: Curva temporal do alcalóide montanina na tarefa de reconhecimento de objeto, na dose de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, administrada em intervalos de tempo de 0 min, 180 min e 360 min, pós-treino. Utilizado teste *t* não pareado na comparação entre os tempos e grupo controle. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise dos dados, utilizamos o software Graph-Pad Prism ($n=8-15$).

III.2.3 Detecção inibição da enzima acetilcolinesterase do alcalóide montanina

A **Figura 25** mostra os resultados da inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase, obtida pelo método de ELLMAN e colaboradores (1961), modificado por LASSITER e colaboradores (2003) para o alcalóide montanina. Na **Figura 26**, demonstrado o mesmo resultado, porém comparado com valores de porcentagem de atividade enzimática.

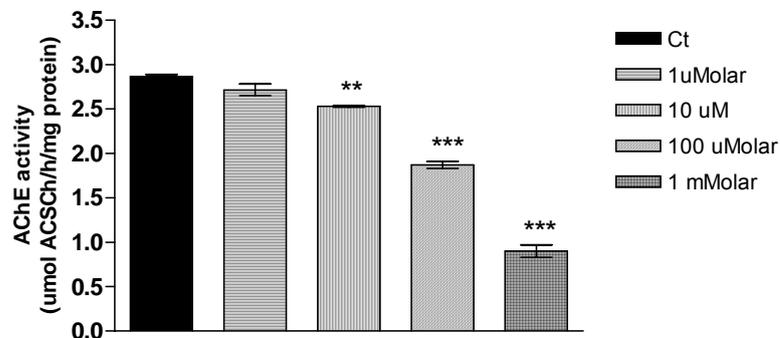


Figura 25: Inibição da enzima acetilcolinesterase pelo alcalóide montanina. Utilizado ANOVA seguido de Newman-keuls Multiple Comparison test.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para análise dos dados, foi utilizado software Graph-Pad Prism.

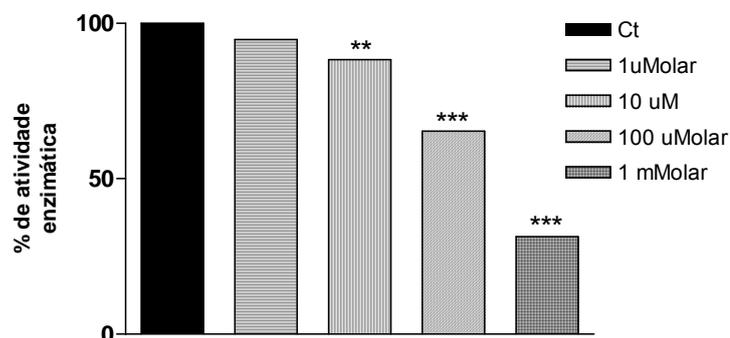


Figura 26: Inibição da enzima acetilcolinesterase, pelo alcalóide montanina, em relação à porcentagem de inibição enzimática

O alcalóide montanina demonstrou melhora significativa da memória em ratos, na tarefa de reconhecimento de objetos, administrada na região CA1 do hipocampo dorsal de roedores, na dose de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. O teste foi realizado 24 horas pós-treino, e a atividade observada está modulando memórias de longa duração.

Esta atividade diz respeito a uma administração do alcalóide imediatamente pós-treino. O passo seguinte foi observar se, a atividade de melhora na formação de memória continuava sendo observada com administrações do alcalóide em intervalos maiores, tais como 180, 360 ou 540 min. Com este intuito, foi realizado o mesmo teste, na mesma tarefa, na mesma via de administração, em intervalos de 180 e 360 min. Foi observado que a atividade de melhora na formação de memória também ocorre em intervalo de 180 min pós-treino, além do já observado imediatamente pós-treino. No entanto, em 360 min, o resultado não foi estatisticamente diferente do grupo controle.

Em se tratando de um alcalóide de Amaryllidaceae, tal como o fármaco galantamina, realizamos o ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase, pelo método de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961 modificado por LASSITER *et al.*, 2003), para observar se ocorre inibição da enzima, visto que, em trabalho anterior, o alcalóide inibiu a enzima acetilcolinesterase, pelo método de MARSTON e colaboradores (2002), no trabalho de SILVA (2005). Porém, esta metodologia possui uma grande probabilidade de resultados falso-positivos.

Pela metodologia de Ellman, observamos que ocorre inibição da enzima nas concentrações de 10 μM , 100 μM e 1 mM (**Figuras 25 e 26**). Portanto, tanto pela metodologia de Marston (SILVA, 2005) quanto pelo método de Ellman, para inibição da enzima acetilcolinesterase, o alcalóide montanina apresentou um bom perfil de inibição da enzima.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que os alcalóides de Amaryllidaceae continuam sendo substâncias de grande interesse para a área farmacêutica. Uma das razões mais fortes para isso, já mencionada anteriormente, refere-se principalmente a diversidade estrutural destes alcalóides e suas promissoras atividades biológicas (HARVEY, WENINGER *et al.*, 1995; AMOS *et al.*, 2003; BASTIDA *et al.*, 1996; BASTIDA, 2006; ELGORASHI *et al.*, 2001, 2003; BERKOV *et al.*, 2007; CASTILHOS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2006, 2007; ZHONG, 2003).

Para fazer referências mais pontuais de alcalóides representantes desta classe, para atividade antitumoral, a pancratistatina tem se destacado, com acentuada ação citotóxica, podendo ser um agente antitumoral em potencial (MUTSUGA *et al.*, 2002). Para atividade no SNC, a galantamina desponta como uma das melhores terapias para a Doença de Alzheimer, pela capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase e por seu efeito alostérico positivo em receptores nicotínicos pré-sinápticos (MAELICKE *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2002). No entanto, outros alcalóides do mesmo núcleo galantamina, como a sanguinina, apresentaram capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase superior a da galatamina (LÓPEZ *et al.*, 2002), o que aumenta o interesse na investigação química de espécies de Amaryllidaceae, associado a avaliações de suas atividades biológicas.

Trabalhos envolvendo investigação química e biológica de espécies do gênero *Hippeastrum* são bem menos numerosas do que os trabalhos envolvendo outros gêneros, como *Crinum* e *Narcissus*, por exemplo. Numerosos estudos com o gênero *Crinum* pode ser atribuído a grande utilização deste gênero na medicina popular africana (ELGORASHI *et al.*, 2001, 2003). Os estudos com *Narcissus* estão diretamente ligados a presença de galantamina nestas espécies (LABRAÑA *et al.*, 2002; BASTIDA e VILADOMAT, 2002; HEINRICH e TEOH, 2004; BASTIDA, 2006).

Os alcalóides encontrados com maior frequência no gênero *Hippeastrum*, geralmente pertencem aos núcleos licorina, crinina e tazetina. Alcalóides com núcleo galantamina são os de menor frequência. Da espécie *Hippeastrum vittatum*, o núcleo

majoritário encontrado foi o da montanina, com o isolamento do próprio alcalóide montanina (SILVA, 2005; SILVA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

Em trabalhos encontrados na literatura verifica-se a extração dos alcalóides empregando-se ácido sulfúrico, em oposição à utilização de ácido clorídrico, justificado pela menor possibilidade de formação de artefatos (BASTIDA *et al.*, 1996; ELGORASHI *et al.*, 2001, 2003). Desta forma, neste trabalho, foi realizado a extração ácido-base com HCl e com H₂SO₄, com o intuito de comparação de seus perfis cromatográficos, utilizando metodologia de CLAE já otimizada para a análise destes alcalóides.

O resultado desta comparação demonstra que o perfil alcaloídico de ambas as extrações, aparentemente, se mantém o mesmo. A comparação apresentada na **Figura 10** demonstra praticamente o mesmo perfil de alcalóides, com a diferença de pequeno desvio para tempos de retenção maiores, na extração com H₂SO₄. Até o presente momento não há sugestões para essa mudança nos tempos de retenção, proporcionalmente maiores para todo o extrato. Contudo, a possível formação de sal com HCl, além da conhecida reatividade do íon cloreto, pode estar relacionada com o emprego de H₂SO₄ para a extração ácido-base (BASTIDA *et al.*, 1996; ELGORASHI *et al.*, 2001, 2003).

Além disso, os perfis cromatográfico das frações CH₂Cl₂A e CH₂Cl₂B não diferem muito com relação ao perfil de alcalóides, e a fração CH₂Cl₂A, em geral, tem um rendimento bem inferior à fração CH₂Cl₂B. Outro dado interessante, já observado por CCD, e confirmado por CG-EM, é de que o extrato *n*-butanólico é pobre em alcalóides.

Observando o perfil cromatográfico das frações, principalmente as frações CH₂Cl₂B, os resultados parciais apontam para a existência de dois grandes grupos de alcalóides. Um deles, observado por CLAE, em tempos de retenção entre 8 e 10 minutos, e outro grupo existente entre 14 e 16 minutos.

A análise de seu perfil de absorção na região de ultravioleta nos informa que as bases isoladas em tempo de retenção de 8 e 10 minutos apresentam perfis semelhantes de absorção, com máximos de absorção em comprimentos de onda (λ) de 289 e 214 nm. Isto é bem demonstrado pelo precipitado JP1, no qual a base com

tempo de retenção 10,65 apresenta exatamente este perfil de absorção. O mesmo é observado para alcalóides de núcleo licorina (GHOSAL *et al.*, 1983; HOFFMANN JÚNIOR, 2002; SEBEN, 2005). Este perfil cromatográfico de JP1 é muito semelhante ao perfil do precipitado da fração CH₂Cl₂B de bulbos.

Com relação aos dados de espectroscopia na região do ultravioleta dos compostos que apresentam tempo de retenção entre 14 e 16 minutos, o perfil de absorção parece ser bem diferente, e mais condizente com os máximos de absorções clássicos de alcalóides de Amaryllidaceae, que são próximos de 240 e próximos de 290 nm. Analisando a absorção de JP7, por exemplo, e do composto presente no precipitado de raízes (JP1), fica evidenciado a presença de absorções máximas em 242 e 289 nm, clássicas do grupo metileno-dioxifenila, presentes em vários núcleos fundamentais dos alcalóides de Amaryllidaceae, e tendo como exemplo os alcalóides pseudolicorina, narcissidina, tazetina, pretazetina, montanina, pancracina, haemantamina, entre outros. No entanto, a análise por CG-EM aponta para existência do alcalóide haemantamina, que, portanto, também é condizente com este perfil de absorção.

A análise por CLAE-EM nos foi de grande utilidade. Os resultados de CG-EM apontam para a existência de núcleos tipo licorina e tipo haemantamina, além de outros núcleos em menor quantidade. Submetendo, portanto, o precipitado JP1 à análise por CLAE-EM, foi possível observar um sinal, com altíssima porcentagem relativa (próximo a 100%), apresentando E+1 = 288,6. Além disso, apresenta um segundo sinal, observado no cromatograma da análise, com E+1 = 302,1. Estes dois sinais representam massa molecular de 287 e 301, respectivamente, na qual são massas iguais aos alcalóides licorina e haemantamina, respectivamente. Estas duas análises, utilizando cromatografia de alta eficiência, estão convergindo para estes dois alcalóides, ou para alcalóides de estrutura semelhante.

Além disso, mais indícios mostravam que o precipitado JP1 não estava totalmente puro. Foi realizado o ponto de fusão do precipitado JP1, pelo método de Kopfler, e o que foi observado é que a faixa de fusão iniciava em 281,6 °C, mas não foi possível observar o final da fusão e o precipitado JP1 demonstrava alta solubilidade em água, o que está mais de acordo com a precipitação conjunta do alcalóide na forma de sal, ou concomitantemente na forma de heterosídeo.

Somado a isto, foi realizada espectroscopia de ressonância magnética nuclear para o precipitado, e foi observado um espectro muito pouco resolvido, com presença de alguns sinais condizentes com grupos osídicos, o que pode, mais uma vez, estar indicando que existe a presença de açúcares ligados ao alcalóide (heterosídeos), o que também explicaria a franca solubilização em água. Pelo objetivo da presente dissertação de realizar investigação preliminar das frações enriquecidas da espécie em questão, podemos ter a certeza, pelas técnicas analíticas utilizadas, de que o vegetal apresenta como alcalóide majoritário uma base de núcleo licorina, e o alcalóide haemantamina, como identificado por CG-EM.

A análise química do vegetal em questão (*Hippeastrum papilio*), portanto, aponta para a existência de alcalóides dos núcleos licorina e haemantamina, e que podem estar sob a forma de heterosídeos. Além disso, a análise por CG-EM também indica a existência de núcleos galantamina nos extratos, indicando a presença de narvedina e sanguinina, esta com capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase superior a da galantamina (LOPEZ *et al.*, 2002) (**Figura 27**). Uma das perspectivas deste trabalho é dar continuidade a investigação química dos extratos ainda não estudados da planta, e a elucidação estrutural destas bases, pois podemos estar diante de estruturas novas, ou de grande complexidade, que até o momento não foi possível sua correta caracterização.

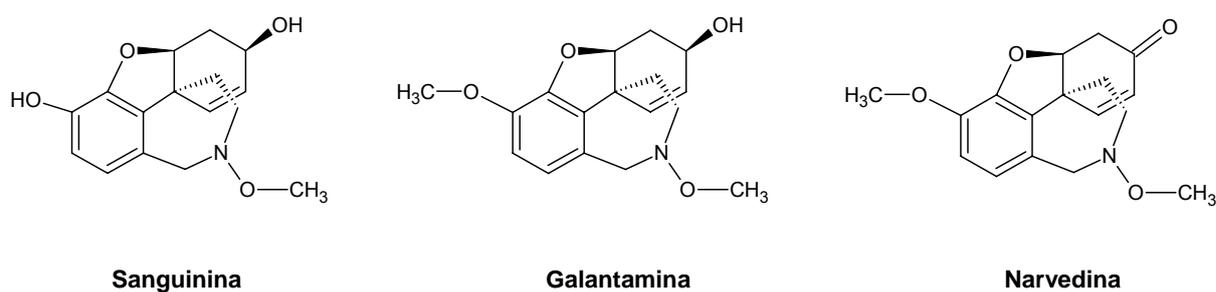


Figura 27: Estrutura do alcalóides sanguinina, galantamina e narvedina.

A investigação da estrutura química destes alcalóides se torna pertinente pelo resultado da inibição da enzima acetilcolinesterase, utilizando método de MARSTON e colaboradores (2002). Mesmo sendo este um método de *screening in vitro*, e com alguma possibilidade de resultados falso-positivos, este método é muito utilizado

como *screening* inicial de extratos vegetais, como possíveis fontes de inibidores da acetilcolinesterase (KISSLING *et al.*, 2005; BORLOZ *et al.*, 2006; HOSTETTMANN *et al.*, 2006).

Os resultados para *Hippeastrum papilio* demonstram que os extratos enriquecidos em alcalóides apresentam proeminente halo de inibição, evidenciando inibição da enzima. Todos os extratos apresentaram inibição da enzima, justificando a continuação da tentativa de elucidação dos alcalóides presentes nestes extratos.

Com relação aos resultados de avaliação comportamental obtidos para o alcalóide montanina, estes demonstraram ser muito interessantes. Em investigação prévia, o alcalóide montanina apresentou inibição da enzima acetilcolinesterase (SILVA, 2005), pelo método descrito por MARSTON e colaboradores (2002). Com a continuação dos estudos com este alcalóide, foi possível observar sua capacidade de modulação/ativação de vias enzimáticas relacionadas com os processos de memória (SILVA, 2005). O objetivo da presente investigação foi avaliar se, comportamentalmente, o alcalóide montanina apresenta efeito pró-mnésico.

O estudo comportamental da montanina demonstrou que, de fato, este alcalóide possui capacidade pró-cognitiva, na tarefa de reconhecimento de objetos, pois melhorou a formação de memória de ratos, comparados com o controle não tratado. Além disso, a administração de uma substância imediatamente pós-treino, tal como foi realizado nesta tarefa, infere que esta droga possa ter uma atividade na consolidação de memória (IZQUIERDO, 1989; PRICKAERTS *et al.*, 1997; ABEL e LATTAL, 2001). Até o momento do presente estudo, não existe nenhum dado comportamental, em paradigmas de memória, para este alcalóide. Na tarefa de reconhecimento de objetos, foi demonstrado comportamentalmente uma efetiva melhora na consolidação de memória, na dose de 1µg/µl, obtendo-se a curva dose-resposta para este alcalóide (**Figura 23**).

A obtenção deste efeito pró-cognitivo torna-se bastante interessante. No trabalho de PRICKAERTS e colaboradores (2005), do qual foi baseada o método do teste de reconhecimento, foram estudados outros inibidores da enzima acetilcolinesterase, tais como donepezil e metrifonato. Para ambos inibidores, não foi observado melhora nos processos de formação de memória, somente nos

processo de aquisição de informação, ou seja, com o fármaco administrado antes da aquisição da tarefa (PRICKAERTS *et al.*, 2005).

Obtendo-se um resultado de efeito pró-cognitivo para este alcalóide, foi realizada a análise de seu perfil de inibição da enzima acetilcolinesterase, utilizando método descrito por ELLMAN e colaboradores (1961) modificado por LASSITER e colaboradores (2003). Nesta análise foi possível observar que o alcalóide montanina possui capacidade de inibição da enzima, em concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM.

A partir da curva dose-resposta, foi construída uma curva temporal, para a mesma tarefa, na mesma via de administração (via intrahipocampal). O alcalóide montanina demonstrou efeito pró-mnésico nos tempos 0 min (imediatamente pós-treino), 180min, mas não em 360min pós-treino (**Figura 24**). Este resultado demonstra comportamentalmente que a montanina pode estar ativando a cascata enzimática MAPK. A ativação da MAPK, na formação de memória de longa duração, intervém 180 min ou mais após a aquisição da tarefa (IZQUIERDO e MEDINA, 1997; IZQUIERDO, 2002).

Além disso, como obtemos efeitos pró-cognitivos do alcalóide montanina imediatamente pós-treino e 180 min pós-treino, o mecanismo de formação de memória que está sendo modulado pode ser via PKA. Os picos de ativação de PKA são observados duas vezes na formação de memória: a primeira, nos primeiros minutos após a aquisição; e a segunda, 2 a 6 horas mais tarde (BERNABEU *et al.*, 1997, IZQUIERDO, 2002).

Esta hipótese é ainda reforçada pelo fato de que ambos os picos de PKA são acompanhados de um aumento simultâneo de pCREB nuclear (CAMMAROTA *et al.*, 2000; IZQUIERDO, 2002), sendo que o segundo pico de PKA é acompanhado também de um aumento de pCREB nas mitocôndrias pós sinápticas (IZQUIERDO, 2002). O aumento pelo alcalóide montanina da fosforilação/ativação de pCREB, já foi demonstrado bioquimicamente, em fatias hipocampais por SILVA (2005).

O alcalóide montanina demonstra ser uma substância muito interessante nos processos relacionados com atividade mnemônica. O efeito pró-cognitivo observado na tarefa de reconhecimento de objetos, além da capacidade de modulação de vias

enzimáticas envolvidas com os processos plásticos do SNC, faz da montanina uma substância promissora para a investigação de sua atividade biológica em outras tarefas, tais como as aversivas (esquiva inibitória) ou as espaciais (labirinto aquático de Morris). A obtenção da curva dose-resposta, além de ter demonstrado uma capacidade pró-mnésica do alcalóide montanina, nos permite conhecer a dose efetiva que, injetada intra-hipocampal tem efeito pró-mnésico, possibilitando uma dose referência para outros paradigmas, tais como esquiva inibitória e labirinto aquático de Morris.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO

As frações CH₂Cl₂B de bulbos, obtidas com diferentes reagentes ácidos (HCl e H₂SO₄) durante o processo de extração ácido-base, não apresentam diferenças no seu perfil cromatográfico, apenas com deslocamento proporcional dos sinais para tempos de retenção maiores, para a fração obtida com extração utilizando H₂SO₄.

Os dados de CG-EM e CLAE-EM apontam para a existência de alcalóides com núcleo licorina, e de alcalóides semelhantes à haemantamina. Com a continuação da investigação química, poderemos chegar à elucidação estrutural destas bases.

Os extratos enriquecidos em alcalóides apresentaram grande perfil de inibição da enzima acetilcolinesterase, pelo método de MARSTON e colaboradores (2002), evidenciando o papel dos alcalóides neste tipo de atividade.

O alcalóide montanina demonstrou capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase, pelo método de ELLMAN e colaboradores (1961) modificado por LASSITER e colaboradores (2003). Isto demonstra a sua atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase em dois métodos diferentes, – já foi demonstrado pelo método de MARSTON e colaboradores (2002) –, apontando esta molécula como uma substância muito promissora para continuação de estudo de seu potencial em atividades mnemônicas.

A montanina demonstrou efeito pró-cognitivo, comportamentalmente, na tarefa de reconhecimento de objetos, administrada pós-treino. Foi obtida a curva dose-resposta para este alcalóide.

A montanina também demonstrou efeito pró-cognitivo administrada imediatamente pós-treino e 180 min pós-treino, mas não em 360 min pós-treino.

REFERÊNCIAS

ABEL, T.; LATTAL, K.M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Curret Opinion of Neurobiology**, v.11, p.180–187, 2001.

AKIRAV, I.; MAROUN, M. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Cerebral Cortex**, v.18, 2006.

ALI, A. A.; MESBAH, M. K.; FRAHM, A. W. Phytochemical investigation of *Hippeastrum vittatum* growing in Egypt. Part IV: Stereochemistry of pancracine, the first 5,11-methanomorphantidine alkaloid from *Hippeastrum* – structure of hipagine. **Planta Medica**, v.50, n.2, p.188-189, 1984.

AMOS, S.; BINDA, L.; AKAH, P.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Central inhibitory activity of the aqueous extract of *Crinum giganteum*. **Fitoterapia**, v.74, p.23-28, 2003.

ATKINS, C. M.; SELCHER, J. C.; PETRITIS, J. J.; TRZASKOV, J. M.; SWEATT, J. D. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. **Nature Neuroscience**, v.1, p.602-609, 1998.

BARBOSA FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.2, p.258-285, 2006.

BASTIDA, J.; CODINA, C.; PORRAS, C. L.; PAIZ, L. Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum*. **Planta Medica**, v. 62, p.74-75, 1996.

BASTIDA, J.; VILADOMAT, F. **Alkaloids of Narcissus**. In: HANKS. G. editor. **Medicinal and Aromatic plants – Industrial Profiles. Narcissus and Daffodil. The Genus Narcissus**, London Taylor and Francis, v.21, p.141-213, 2002.

BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. **Chemical and biological aspects of Narcissus alkaloids** In: CORDELL, G. A. (Ed). **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. San Diego: Academic Press INC., 2006, v.63, cap.3, p.87-179

BATTERSBY, A. R.; BINKS, R. Biosynthesis of lycorine. **Proceedings of the Chemical Society**, p.410, 1960.

BATTERSBY, A. R.; BINKS, R.; BREUER, S. W. Biosynthesis in the Amaryllidaceae: Incorporation of Norbelladine into lycorine and norpluvine. **Proceedings of the Chemical Society**, p.243, 1961.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurosciências: desvendando o sistema nervosa**. Artmed, 2 ed. Porto Alegre, p. 855, 2002.

BERKOV, S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Galanthus nivalis*. **Phytochemistry**, 2007, doi: 10.1016/ j.phytochem. 2007.03.025 (in press).

- BERNABEU, R.; BEVILAQUA, L.; ARDENGHI, P.; BROMBERG, E.; SCHMITZ, P.; BIANCHIN, M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.7041-7046, 1997.
- BEVILAQUA, L. R. M. Envolvimento das vias bioquímicas AMPc/PKA/Pcreb e MAPK/ELK-1 na formação da memória. Porto Alegre: UFRGS. Departamento de Bioquímica, 2000 (Tese de Doutorado).
- BOIT, H.G. Alkaloids of the Amaryllidaceae. VI. The alkaloids of *Nerine sarniensis*, *Crinum moorei*, *Hippeastrum vittatum* and *Clivia miniata*. **Chemical Berichte**, v. 87, p.1704-1707, 1954.
- BOIT, H.G. Amaryllidaceus Alkaloids. XI. Alkaloids of *Chilidanthus fragrans*, *Valotta purpurea*, *Nerine undulata*, and *Hippeastrum vittatum*. **Chemical Berichte**, v. 89, p.1129-1134, 1956.
- BORLOZ, A. MARSTON, A. HOSTETTMANN, K. Acetylcholinesterase inhibitors from *Huperzia selago*. **Planta Medica**, v.72, n.11, p1002, 2006.
- BOTHA, E. W.; KAHLERA, C. P.; DU PLOOY, W. J.; DU PLOOY, S. H.; MATHIBE, L. Effect of *Boophone disticha* on human neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.385-388, 2005.
- BRUCKI, S. M. D. Doença de Alzheimer: diagnóstico, características e estratégias de tratamento. Revista Racine, ano16, n.95, p.30-43, nov./dez., 2006.
- BRUNETON, J. **Farmacognosia: Fitoquímica – Plantas Medicinales**. ed.2, Zaragoza: Acribia S.A., 2001. 1099p.
- CABEZAS, F.; RAMIREZ, A.; VILADOMAT, F.; CODINA, C; BASTIDA, J. Alkaloids from *Eucharis amazônica* (Amaryllidaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.51, n.3. p.315-317, 2003.
- CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L. R.; ARDENGHI, P.; PARATCHA, G.; STEIN, M. L.; IZQUIERDO, I. MEDINA, J. H.; Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Molecular Brain Research**, v.76, p.36-46, 2000.
- CAMPBELL, W. E.; NAIR, J. J.; GAMMON, D. W.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; SMITH, P. J.; ALBRECHT, C. F. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. **Planta Medica**, v.64, p.91-93, 1998.
- CARLINI, E. A. Plants and central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v.75, p.501-512, 2003.
- CASTILHOS, R. S. Investigação química em *Habranthus erectus* Ravenna e *Rhodophiala bifida* (Herb) Traub (Amaryllidaceae) e avaliação biológica *in vitro* do alcalóide montanina. Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2004 (Dissertação de Mestrado).

CASTILHOS, R. S.; GIORDANI, R. B.; HENRIQUES, A. T.; MENEZES, F. S.; ZUANAZZI, J. A. Avaliação *in vitro* das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n. 2, p. 209-214, 2007.

COOK, J. W.; LOUDON, J. D. **The Alkaloids**. Manske R. H. F. e Holmes H. L. (ed), New York: Academic Press, v. 2, 1952, p. 331.

CORDELL, G. A.; QUINN-BESTTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v.15, p.183-205, 2001.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.4, 1984.

CHUNG, J. A.; CUMMINGS, J. L. Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment. **Neurologic Clinics**, v.18, p.829-846, 2000.

CROUCH, N. R.; POHL, T. L.; MULHOLLAND, D. A.; NDLOVU, E. Alkaloids from three ethnomedicinal *Haemanthus* species: *H. albiflos*, *H. deformis* and *H. paucifolius* (Amaryllidaceae). **South African Journal of Botany**, v.71, n.1, p.49-52, 2005.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the Monocotyledons: Structure, evolution, and taxonomy**. Berlin: Springer-Verlag, 1985, p.199-206.

DIAA, T. A. Y. Alkaloids of the flowers of *Hippeastrum vittatum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n.6, p.839-841, 2001.

DÖPKE, W.; PHAM, L. H.; GRÜNDEMANN, E.; BARTOSZEK, M.; FLATAU, S. Alkaloids from *Hippeastrum equestre*; Part I: Phamine, a new phenanthridone alkaloid. **Planta Medica**, v. 61, p.564-566, 1995.

DÖPKE, W.; BIENERT, M. Alkaloids from Amaryllidaceae; the structure of oduline. **Pharmazie**, v. 21, n. 5, p. 323-324, 1966.

DU PLOOY, W. J.; SWART, L.; HUUSTEEN, G. W. Poisoning with *Boopane disticha*: A forensic case. **Human & Experimental Toxicology**, v.20, p.277-278, 2001.

DUTILH, J. H. A.; Investigações citotaxonômicas em populações brasileiras de *Hippeastrum* Herb. Campinas: UNICAMP. Instituto de Biologia, 1987 (Dissertação de Mestrado).

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

ELGORASHI, E.E., DREWES, S. E., STADEN, J. van. Alkaloids from *Crinum moorei*. **Phytochemistry**, v.56, p.637-640, 2001.

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

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

ELGORASHI, E.E.; MALAN, S. F.; STAFFORD, G. I.; STADEN, J. van. Quantitative structure-activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. **South African Journal of Botany**, v.72, p.224-231, 2006.

ELLIOT, S.; BRIMACOMBE, J. The medicinal plants of Gunung Leuser National Park, Indonesia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.19, p.285-317, 1987.

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

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: **Behavioral data. Behavioral Brain Research**, v.31, p.47-59, 1988.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; ABOU-DONIA, A. H.; TOUEMA, S. M.; HAMMODA, H. M.; SHAWKY, E.; MOTTA, A. (-)-Amarbelisina, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. **Phytochemistry**, v.65, p.2113-2118, 2004.

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

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

GANGULI, S. N.; BHATACHARYA, A. K.; GANGULI, G. Isolation and characterization of lycorine from *H. equestre* bulbs. **Indian Journal Chemical**, v.5, n. 12, p.654, 1967.

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

GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; FRAHM, A. W. Alkaloids of *Crinum latifolium*. **Phytochemistry**, v.22, p.2305-2309, 1983.

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

GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; KUMAR, Y.; UNNIKRIISHNAN, S.; CHATTOPADHYAY, S. The role of ungeremine in the growth-inhibition and cytotoxic effects of lycorine: evidence and speculation. **Planta Medica**, v.54, p.114-116, 1988.

GIACOBINI, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's Disease. **Neurochemical Research**, v.28, n.3/4, p.515-522, 2003

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos** In: Simões, C. M. O. (org), et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS e Editora da UFSC, p.13-28, 2003.

HARTWELL, J. L. Plants used against cancer. A Survey. **Lloydia**, v.30, p.379-393, 1967.

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

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

HENDRICKSON, J. B. **The molecules of nature: a survey of biosynthesis and chemistry of natural products**. Nova Iorque: W. A. Benjamin, 1965. cap.5, p.143-177

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. **Alcalóides: generalidades e aspectos básicos** In: Simões, C. M. O. (org), et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS e Editora da UFSC, p.765-791, 2003.

HERDEGEN, T.; SANDKUHLER, J.; GASS, P.; KIESSLING, M.; BRAVO, R.; ZIMMERMANN, M. JUN, FOS, KROX, and CREB, transcription factor protein in the rat cortex: basal expression and induction by spreading depression and epileptic seizures. **Journal of Comparative Neurology**, v.333, p.271-288, 1993.

HOFMANN JUNIOR, A. E. Análise química e biológica de alcalóides em *Hippeastrum glaucescens* (Martius) Herbert, 2002. 76p. Porto Alegre. UFRGS. Faculdade de Farmácia (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

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

HOSHINO, O. The Amaryllidaceae alkaloids. In: CORDELL, G. A. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. Londres: Academic Press INC., 1998. v.51, cap.4, p.323-417.

HOSTETTMANN, K.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A. Natural products inhibitors acetylcholinesterase. **Current Organic Chemistry**, v.10, n.8, p.825-847, 2006.

HOUGHTON, P. J.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEGBULUGBE, A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. **Phytochemistry**, v.65, n.21, p.2893-2896, 2004.

- HOWES, M. J. R.; PERRY, N. S. L.; HOUGHTON, P. J. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's Disease and other cognitive disorders. **Phytotherapy Research**, v.17, p.1-18, 2003.
- HSU, H. Y.; CHEN, Y. P.; HSU, C. S.; SHEN, S. J.; CHEN, C. C.; CHANG, H. C. **Matéria médica oriental: um guia conciso**. São Paulo:Editora Roca, 1999. 774p.
- INUBUSHI, Y.; FALES, H. M.; WARSHOFF, E. W.; WILDMAN W. C.; Structures of montanine, coccinine and manthine. **Journal Organic Chemistry**, v. 25, n.12, p. 2153-2164, 1960.
- ITO, M.; KAWAMOTO, A.; KITA, Y.; YUKAWA, T.; KURITA, S. Phylogenetic relationships of Amaryllidaceae based on *matK* sequence data. **Journal of Plant Research**, v.112, p.207-216, 1999.
- IZQUIERDO, I. Different forms of posttraining memory processing. **Behavioral and Neural Biology**, v.51, p171-202, 1989.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology Learning and Memory**, v.68 (3), p. 285-316, 1997, Review.
- IZQUIERDO, I.; MACGAUGH, J.L. Correlation between the pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural Pharmacology**. V.11 (7-8), p. 517-534, 2000, Review.
- IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 95 p.
- JANSSEN PHARMACEUTICA. **Controlled release galantamine composition**. WO0038686, 1998.
- JANSSEN PHARMACEUTICA. **Oral solution containing galanthamine and a sweetening agent**. WO0130318, 1999.
- JANSSEN PHARMACEUTICA. **A use of galantamine for the treatment of neuropsychiatric behaviour associated with Alzheimer's Disease**. WO0174339, 2000.
- JEFFS, P. W. The alkaloids of the Amaryllidaceae, Part X. Biosynthesis of haemantamina. **Proceeding of the Chemical Society**, p.80-81, 1962.
- JUDD, W, S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A phylogenic approach**. Sunderland & Sinauer, 1999.
- JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. ed.13. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999.
- KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, v.294, p.1030-1038, 2001.

KARTSEV, V. G. Natural compounds and drug discovery. Biological activity and new trends in the chemistry of isoquinoline alkaloids. **Medicinal Chemistry Research**, v.13, n.6/7, p.325-336, 2004.

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

KELLY, A.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. **Journal of Neuroscience**, v.23, p.5354-5360, 2003.

KISSLING, J.; IOSET, J. R.; MARSTON, A. HOSTETTMANN, A. Bio-guided isolation of cholinesterase inhibitors from the bulbs. **Phytoterapy Research**, v.19, n.11, p.984-987, 2005.

KOORBANALLY, N.; MULHOLLAND, D. A.; CROUCH, N. Alkaloids and triterpenoids from *Amnocharis coranica* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry**, v.54, p.93-97, 2000.

KREH, M.; MATUSCH, R.; WITTE, L. Cappillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. **Phytochemistry**, v.38 (3), p.773-776, 1995.

KRISHNA RAO, R. V.; VIMALADEVI, R. Crystalline alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. **Planta Medica**, v.21, p.142-143, 1972.

LABRAÑA, J.; MACHOCHO, A. K.; KRICSFALUSY, V.; BRUN, R.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry**, v.60, p.847-852, 2002.

LAMIRAULT, L.; GUILLOU, C.; THAL, C.; SIMON, H. (-)-9-dehydrogalanthaminium bromide, a new cholinesterase inhibitor, enhanced place and object recognition memory in young and old rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.80, p.113-122, 2003.

LASSITER, T. L.; MARSHALL, R. S.; JACKSON, L. C.; HUNTER, D. L.; VU, J. T.; PADILLA, S. Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. **Toxicology**, v.186, p.241-253, 2003.

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

LEWIS, J. R. Amaryllidaceae and *Scelletium* alkaloids. **Natural Products Reports**, v. 13, p.171-176, 1994.

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

LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A.; RUANGRUNGSI, N. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. **Journal of Natural Products**, v.56, p.1331-1338, 1993

- LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Science**, n.71, p.2521-2529, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002. 512p.
- LOUW, C. A. M.; REGNIER, T. J. C.; KORSTEN, L. Medicinal bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in the control of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.82, p.147-154, 2002.
- MACHOCHO, A. K.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BRUN, R.; CHHABRA, S. C. Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*. **Phytochemistry**, v.65, p.3143-3149, 2004.
- MAELIKE, A. The pharmacological rationale for treating vascular dementia with galantamine (Reminyl). **International Journal of Clinical Practice**, v.120, p.24-28, 2001.
- MAELIKE, A.; SAMOCHOCKI, M.; JOSTOCK, R.; FEHRENBACHER, A.; LUDWIG J.; ALBUQUERQUE, E. X.; ZERLIN, M. Allosteric sensitization of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's Disease. **Biological Psychiatry**, v.49, p.279-288. 2001
- MANDOLESI, L.; LEGGIO, M. G.; SPIRITO, F.; PETROSINI, L. Cerebellar contribution to spatial event processing: do spatial procedures contribute to formation of spatial declarative knowledge? **European Journal of Neuroscience**, v. 18, p.2618-2626, 2003.
- MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautography method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v.13, p.51-54, 2002.
- MARTIN, S. F. **The Amaryllidaceae Alkaloids**. In: BROSSI, A. (Ed). **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. San Diego: Academic Press INC., 1987. v.30. cap.3, p.251-376.
- MASHKOVSKY e KRUGLIKOVA-LVOVA. On the pharmacology of new alkaloid galantamine. **Farmakologia Toxicologia**, Moskow, v.14, p. 27-30, 1951 (in Russian)
- MASSOUD, F. Alzheimer Disease. **Canadian family physician Médecin de famille canadien**, v.53, n.1, p.50-54, 2007.
- MEEROW, A. W.; SCHEEPEN, J. van.; DUTILH, J. H. A.; Transfer from *Amaryllis* to *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Taxon**, v.46, p.15-19, 1997.
- MERROW, A. W.; FAY, M. F.; GUY, C. L.; LI, Q.; ZAMAN, F.Q.; CHASE, M. W. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 9, p.1325-1345, 1999.

- MEEROW, A. W.; GUY, C. L.; LI, Q.; YANG, S. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. **Systematic Botany**, v.25, n.4, p.708-726, 2000.
- MOHGAZI, A. M.; ALI, A. A.; MESBAH, M. K. Phytochemical investigation of *Hippeastrum vittatum* growing in Egypt. Part II: Isolation and Identification of New Alkaloid. **Planta Medica**, v.28, p.337-342, 1975.
- MUGGE, C.; SCHABLINSKI, B.; OBST, K.; DOPKE, W. Alkaloids from *Hippeastrum* hybrids. **Pharmazie**, v.49, n.6, p.444-447, 1994.
- MULHOLLAND, D. A.; CROUCH, N.; DECKER, B.; SMITH, M. T. The isolation of the Amaryllidaceae alkaloid crinamine from *Dioscorea dregeana* (Dioscoriaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.30, p.183-185, 2002.
- MUTSUGA, M.; KOJIMA, K.; YAMASHITA, M.; OHNO, T.; OGIHARA, Y.; INOUE, M. Inhibition of cell cycle progression through specific phase by pancratistatin derivatives. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.25, p.223-228, 2002.
- NAIR, J. J., CAMPBELL, W. E., BRUN, R., VILADOMAT, F., CODINA, C., BASTIDA, J. Alkaloids from *Nerine filifolia*. **Phytochemistry**, v.66, p.373-382, 2005.
- OKPO, S. O.; ADEYEMI, O. O. Effects of *Crinum glaucum* aqueous extract on intestinal smooth muscle activity. **Phytotherapy Research**, v.12, p.413-416, 1998.
- OKPO, S. O.; FATOKUN, F.; ADEYEMI, O. O. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.207-211, 2001.
- PACHECO, G. R.; DEL, C. P.; SILVA, M. J.; SAMMES, P.G.; WATSON, W. H. Chemical study of Chilean Amaryllidaceae. II. New alkaloids from *Hippeastrum ananuca* Phil. **Boletín Sociedad Chilean Química**, v.27, n.2, p.289-290, 1982.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2^a ed., Academic Press, San Diego, 1986.
- PETTIT, G. R.; GADDAMIDI, V.; HERALD, D. L.; SINGH, S. B.; CRAGG, G. M.; SCHIMIDT, J. M. Antineoplastic agents, 120. *Pancratium littorale*. **Journal of Natural Products**, v.49, n.6, p.995-1002, 1986.
- PHAM, L. H.; GRÜNDEMANN, E.; DÖPKE, W. Alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. (Amaryllidaceae) Part III. **Pharmazie**, v.52, n.2, p.160-163, 1997.
- PHAM, L. H.; GRÜNDEMANN, E.; WAGNER, J.; BARTOSZEK, M.; DÖPKE, W. Two novel Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb.: 3-O-demethyltazettine and egonine. **Phytochemistry**, v.51, p.327-332, 1999.
- PISHA, E. CHAI, H.; LEE, I. S.; CHAGWEDERA, T. E.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W. W.; FONG, H. S.; KINGHORN, A. D.; BROWN, D. M.; WANI, M. C.; WALL, M. E.; HIEKEN, T. J.; DASGUPTA, T. K.; PEZZUTO, J. M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction on apoptosis. **Nature Medicine**, v.1, p.1046-1051, 1995.

PRICKAERTS, J., STEINBUSCH, H.W.M., SMITS, J.F.M., De VENTE, J. Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effects of 7-nitroindazole and zaprinast. **European Journal of Pharmacology** v.337, p.125136, 1997.

PRICKAERTS, J.; STAVAREN, W. C. G. van.; SIK, A.; INTTERSUM, M. M-van.; NIEWOHRER, U.; STAAY, F. J. van der.; BLOKLAND, A.; De VENTE, J. Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat. **Neuroscience**, v.113, n.2, p.351-361, 2002.

PRICKAERTS, J.; SIK, A.; STAAY, F. J. van der.; De VENTE, J.; BLOKLAND, A. Dissociable effects of acetylcholinesterase inhibitors and phosphodiesterase type 5 inhibitors on object recognition memory: acquisition versus consolidation. **Psychopharmacology**, v.177, p. 381-390, 2005.

QUIRION, J.; HUSSON, H. (-)-3-O-acetylnarcissidine, a new alkaloid from *Hippeastrum puniceum*. **Journal of Natural Products**, v.54, n.4, p.1112-1114, 1991.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703 p.

RAO, K. R. V.; NAZAR, A.; VIMALADEVI, R. Phytochemical studies from *Hippeastrum johnsonii* bulbs. **Indian Journal Pharmacology**, v.33, n.3, p.56-58, 1971.

RAO, K. R. V.; VIMALADEVI, R. Crystalline alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. **Planta Medica**, v.21, n.2, p.142-143, 1972.

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

REED, J. M.; SQUIRE, L. R.; PATALANO, A. L.; SMITH, E. E.; JONIDES J. Learning about categories that are defined by object-like stimuli despite impaired declarative memory. **Behaviour Neuroscience**, v. 113, p. 411-419, 1999.

RHEE, I. K.; MEENT, M. van de.; INGGANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitory from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v.915, p.217-223, 2001.

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

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J. A.; LOYOLA, J. I.; ASTUDILLO, L.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Activity of Amaryllidaceae alkaloids on the blood pressure of normotensive rats. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v.6, p.309-312, 2000.

SEBBEN, C. Investigação química e biológica em *Hippeastrum breviflorum* Herb (Amaryllidaceae). Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Farm cia, 2005 (Disserta o de Mestrado).

SENNER, B.; KOYUNCU, M.; BING L, F.; MUHTAR, F. Production of bioactive alkaloids from Turkish. **Pure and Applied Chemistry**, v.70, p.2131-2136, 1998.

SENNER, B.; ORHAN, I.; SATAYAVIVAD, J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. **Phytoterapy Research**, v.17, p.1220-1223, 2003.

SHELLARD, E. J. Alkaloids from snowdrops. **The Pharamceutical Journal**, v.264, p.883, 2000.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, A. F. S. *Hippeastrum vittatum* (L'H rb) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avalia o biológica dos alcalóides isolados. Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Farmácia, 2005 (Tese de Doutorado).

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

SILVA, A. F. S.; MACHADO, K. R. B.; ROCHA, A. B.; APEL, M. A.; SOBRAL, M. E. G.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. **Phytomedicine**, aceito.

SUHADOLNIK, R. J.; FISCHER, A. G.; ZULALIAN, J. The biogenetic origin of the C₆-C₁ unit of lycorine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 22, 1962.

TANI, Y.; SAITO, K.; IMOTO, M.; OHNO, T. Pharmacological characterization of nicotinic receptor-mediated acetylcholine release in rat brain – an *in vivo* microdialysis study. **European Journal of Pharmacology**, v.351, p.181-188, 1998.

THOMPSON, C. A.; FDA approves galantamine for Alzheimer disease. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v.58, n.8, p.649, 2001.

TRAM, N. T. N.; TITORENKOVA, T. V.; BANKOVA, V. S.; HANDJIEVA, N. V.; POPOV, S. S. *Crinum* L. Amaryllidaceae. **Fitoterapia**, v.73, p.83-208, 2002.

TSAKADZE, D. M.; SAMSONIYA, S. A.; ZIAEV, R.; ABDUSAMATOV, A. Alkaloid and phenolic compounds of *Galanthus caucasicus*, *Magnolia obovata*, *Cocculus laurifolius*, and *Veratrum lobelianum* grown in Georgia. **Molecular Diversity**, v.9, p.41-44, 2005.

 NVER, N.; GÖZLER, T.; WALCH, N.; GÖZLER, B.; HESSE, M. Two novel dinitrogenous alkaloids from *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry**, v.50, p.1255-1261, 1999.

ÜNVER, N.; KAYA, G. I.; WERNER, C.; VERPOORTE, R.; GÖZLER, T. Galanthindole: a new indole alkaloid from *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus*. **Planta Medica**, v.69, p.869-871, 2003.

VALJENT, E.; PAGES, C.; HERVE, D.; GIRAULT, J. A.; CABOCHE, J. Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. **European Journal of Neuroscience**, v.19, p.1826-1836, 2004.

WANG, J.; CHEN, Y. B.; ZHU, X. N.; CHEN, R. Z. Activation of p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway in long-term potentiation induced by nicotine in hippocampal CA1 region in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.22, p. 685-690, 2001.

WANNMACHER, L. **Demência: evidências contemporâneas sobre a eficácia dos tratamentos** In: OPAS (Ed.) **Uso racional dos medicamentos: temas selecionados**, v.2, n.4, 2005.

WARNER, J.; BUTLER, R.; ARYA, P. Dementia. **Clinical Evidence**, n.12, 2004.

WENINGER, B.; ITALIANO, L.; BECK, J. P.; BASTIDA, J.; BERGOÑON, S.; CODINA, C.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. **Planta Medica**, v.61, p.77-79, 1995.

WHO. World Health Organization. Whem old age becomes a disease. In: VAS, C. J. org. Alzheimer Disease: The brain killer, 2001, disponível em http://www.searo.who.int/LinkFiles/Health_and_Behaviour_alzheimers.pdf, acessado em 19/08/2007.

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

WILDMAN, W. C.; FALES, H. M.; BATTERSBY, A. R. Biosynthesis in the Amaryllidaceae. The incorporation of 3-C¹⁴-tyrosine in *Sprekelia formosissima*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 20, n. 4, p. 681-682, 1962.

WILDMAN, W. C. Alkaloids of the Amaryllidaceae. In: MANSKE, R. H. F. **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. New York: Academic Press INC., 1968. v.11, cap.10, p.307-404.

WILDMAN, W. C.; OLESEN, B. Biosynthesis of montanine. **Journal of the Chemical Society. Chemical Communication**, april, p.551, 1976.

ZHONG, J. Amaryllidaceae and *sceletium* alkaloids. **Natural Products Reporter**, v.20, p.606-614, 2003.