

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

**Química e atividades antioxidante e anticolinesterásica
de espécies de *Huperzia* e *Lycopodium***

EDUARDO LUIS KONRATH

Porto Alegre, fevereiro de 2011.

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

**Química e atividades antioxidante e anticolinesterásica
de espécies de *Huperzia* e *Lycopodium***

Tese apresentada por **Eduardo Luis
Konrath** para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Amélia T. Henriques
Co-orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dra. Amélia Henriques no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia e co-orientação do Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira no Departamento de Bioquímica, ambos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Parte fundamental foi realizada no laboratório de Farmacognosia da Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, sob a supervisão da Prof^a. Dra María Gabriela Ortega e do Prof. Dr José Luis Cabrera. A pesquisa foi financiada pelo CNPq e CAPES.

“Mesmo que a rota da minha vida conduza a uma estrela, nem por isso fui dispensado de percorrer os caminhos do mundo”

JOSÉ SARAMAGO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Amélia Henriques pela orientação, estímulo e por acreditar no meu potencial durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira por disponibilizar o ambiente necessário para a realização deste trabalho e ao Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves pela gentileza e grande auxílio extraoficial em meus experimentos.

Ao Prof. Dr. José Luis Cabrera, pela confiança depositada em meu trabalho e pela acolhida em seu laboratório na Universidad Nacional de Córdoba.

À Profa Dra. Alícia Mariel Agnese pelo carinho e estímulo depositado em meu trabalho e em minha pessoa.

A Profa. Dra. María Gabriela Ortega pela paciência com o meu espanhol terrível, pela ajuda essencial na supervisão deste trabalho desde o início e por compartilhar comigo, além de seu carinho, sua amizade.

Às minhas amigas Rafaela, Carolina, Marina e Raquel, agradeço pelo apoio e incentivo constantes e pela paciência nos momentos mais difíceis, com a certeza de que além de companheiras de laboratório são também amigas para toda a vida.

Aos colegas e amigos do laboratório de Farmacognosia no Brasil: Aline, Cláudia, Cristiano, Douglas, Grazielle, Júlia, Juliana, Leandro, Melissa, Miriam, Patrícia, Renata, Roger, Tiago pelos momentos quando era necessário descontrair e pela contribuição na realização do meu trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório de Farmacognosia na Argentina: Brenda, Daniela, Jéssica, Laura, Marcela, Mariana Peralta, Mariana Romero, Mariana Vallejo, Matias, Micaela, Pamela, Sergio, Suzy agradeço pela boa convivência, pelos ensinamentos de espanhol e pela acolhida neste país hermano.

Às amigas e colegas do Departamento de Bioquímica Daniela, Marina, Patrícia e Paula pela grande ajuda em meu trabalho e por serem tão especiais.

À minha família, pelo apoio e incentivo, por terem partilhado comigo cada dificuldade deste trabalho e por serem os responsáveis por mais essa conquista.

A Deus, que me dá forças para acreditar a cada dia, que sempre posso cada vez alcançar e conseguir mais, e por ter me proporcionado conhecer e viver tanto.

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram e que me amam.

RESUMO

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que causa perdas de memória, danos cognitivos e no comportamento, sendo considerada uma das causas principais de demência entre a população. Esta doença é caracterizada por uma intensa perda neuronal colinérgica, de forma que tanto os inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) quanto compostos antioxidantes possam ser empregados como neuroprotetores. Nesse sentido, plantas da família Lycopodiaceae vêm sendo estudadas como fonte de novos alcalóides anticolinesterásicos desde a descoberta da huperzina A, isolada a partir da planta chinesa *Huperzia serrata*. Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar e isolar os alcalóides majoritários de *Huperzia acerosa*, *H. heterocarpon*, *H. quadrifariata*, *H. reflexa*, *Lycopodiella cernua*, *Lycopodium clavatum* e *L. thyoides*, de ocorrência no estado do Rio Grande do Sul, bem como avaliar as atividades anticolinesterásicas e antioxidantes *in vitro* e *in vivo* para os extratos. Extratos de alcalóides totais de espécies de *L. clavatum* e *L. thyoides* ocorrentes no Brasil e Argentina foram comparados quanto ao seu conteúdo químico, aliado à atividade anticolinesterásica. A atividade inibitória para AChE e butirilcolinesterase (BuChE) dos alcalóides isolados também foi ensaiada, juntamente com a determinação das propriedades citotóxicas exercidas pelos extratos sobre uma linhagem de gliomas C6. Todos os extratos de alcalóides foram analisados através de CG-EM, sendo os perfis de fragmentação dos compostos comparados através de dados da literatura. *L. clavatum* e *L. thyoides* possuem perfil químico similar, com licopodina e acetildiidrolicopodina como alcalóides principais, enquanto que *L. cernua* possui apenas dois alcalóides, cernuína e licocernuína. Os extratos de alcalóides de *H. acerosa*, *H. quadrifariata* e *H. reflexa* também foram analisados, sendo detectados tanto compostos do grupo licopodano quanto do grupo flabelidano, juntamente com outros alcalóides cujas estruturas ainda são desconhecidas. Os alcalóides encontrados em *H. heterocarpon* não puderam ser elucidados a partir de dados de fragmentação, uma vez que eles não coincidiram com nenhum perfil da literatura. Nesse estudo verificamos que dentre

os extratos analisados, *H. quadrifariata* e *H. reflexa* promoveram a maior inibição para a enzima AChE obtida de eritrócitos humanos, com IC₅₀ de 2,0 e 0,11 µg/mL, respectivamente, enquanto que *H. heterocarpon* foi o único extrato com maior seletividade para a BuChE (IC₅₀ = 8,3 µg/mL). Além disso, dentre os alcalóides isolados licopodina, acetildiidroliscopodina, cernuína, licocernuína e clavolonina, apenas acetildiidroliscopodina e cernuína possuem inibição importante, sendo que nenhum deles possui efeito butirilcolinesterásico significativo. Também foi estimada a atividade anticolinesterásica para os extratos de alcalóides totais de *L. clavatum* e *L. thyoides* empregando-se homogenatos de córtex, hipocampo e estriato de ratos como fonte enzimática, sendo determinadas suas curvas de inibição com distintos tempos de incubação em uma faixa de concentrações. Também foi verificada para os dois extratos uma inibição do tipo competitiva/não-competitiva, bem como seu perfil antioxidante *in vitro* pelos métodos de descoloração do radical DPPH, degradação da 2-deoxirribose, TRAP e óxido nítrico. Após um tratamento agudo em camundongos de 14 meses com os extratos, foram verificados os efeitos antioxidantes através do método de TBA-RS, e para as enzimas catalase e superóxido dismutase. Do mesmo modo, verificamos que os mesmos extratos promoveram uma diminuição na atividade da acetilcolinesterase, quando administrados por via intraperitoneal. Nessa metodologia, os extratos mais potentes foram *H. quadrifariata* e *H. reflexa*, corroborando o efeito *in vitro* encontrado para os mesmos. Os extratos purificados de alcalóides de *L. clavatum* e *L. thyoides* com habitat no Brasil e Argentina foram comparados quanto ao seu perfil químico e biológico. Nesse estudo, foi verificado que os alcalóides licopodina e acetildiidroliscopodina são os compostos majoritários para todas as espécies, tendo *L. clavatum* maior atividade anticolinesterásica em relação a *L. thyoides*, tanto a espécie brasileira quanto a espécie argentina.

Palavras chave: doença de Alzheimer, Lycopodiaceae, alcalóides, atividade antioxidante, atividade anticolinesterásica.

ABSTRACT

Chemistry, antioxidant and anticholinesterasic activities of Huperzia and Lycopodium species

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease which causes memory loss, cognitive and behavioral damages, considered to be the leading cause of dementia among the elderly. This disease is characterized for an intense cholinergic loss, and the use of acetylcholinesterase (AChE) inhibitors together with antioxidant compounds as neuroprotectors is a strategy for the treatment. In this sense, Lycopodiaceae plants are well studied as a source of new anticholinesterasic alkaloids since the discovery of huperzine A, isolated from Chinese *Huperzia serrata*. This work was conducted with the objective of characterize and isolate the main alkaloids from *Huperzia acerosa*, *H. heterocarpon*, *H. quadrifariata*, *H. reflexa*, *Lycopodiella cernua*, *Lycopodium clavatum* and *L. thyoides*, with occurrence in Rio Grande do Sul state, and also evaluate the anticholinesterasic and antioxidant activities *in vitro* and *in vivo* for the extracts. Alkaloidal extracts from *L. clavatum* and *L. thyoides* species with habitat in Brazil and Argentina were compared to their chemical content, together with their anticholinesterasic activity. The inhibitory effect for AChE and butyrylcholinesterase (BuChE) for the isolated alkaloids was also evaluated, together with the determination of the cytotoxic properties exerced by the extracts in a gliome C6 cell line. Every alkaloidal extract was analyzed by means of GC-MS, and the fragmentation patterns for the compounds were compared with those from literature. *L. clavatum* and *L. thyoides* have similar chemical profile, with lycopodine and acetyldihydrolycopodine as main alkaloids, while *L. cernua* has only two alkaloids, cernuine and lycocernuine. The alkaloidal extracts of *H. acerosa*, *H. quadrifariata* e *H. reflexa* were also analyzed, and compounds from lycopodane and flabellidane groups were detected, along with other alkaloids whose structures are still unknown. The alkaloids found in *H. heterocarpon* could not be elucidated with fragmentation dates so far, since

they did not coincide with those found in literature. We also verified that among the extracts, *H. quadrifariata* and *H. reflexa* promoted a higher inhibition for AChE obtained from human erythrocytes, with a IC_{50} value of 2,0 e 0,11 $\mu\text{g/mL}$, respectively, while *H. heterocarpon* extract was the only more selective for BuChE ($IC_{50} = 8,3 \mu\text{g/mL}$). Moreover, among the isolated alkaloid lycopodine, acetyldihydrolycopodine, cernuine, lycocernuine and clavolonine, only acetyldihydrolycopodine and cernuine possess an important inhibition, and none significantly inhibited butyrylcholinesterase. It was also assessed the anticholinesterase effect for the alkaloidal extracts of *L. clavatum* and *L. thyoides* employing cortex, hippocampus and striatum rat brain homogenates as enzymatic sources, being determined the incubation time-inhibition curves over a concentrations range. It was also verified for both extracts an inhibitory effect of the competitive/non competitive mixed type, as well as their *in vitro* antioxidant profile using the methods of DPPH radical decoloration, 2-deoxyribose degradation, TRAP and nitric oxide. After an acute treatment in 14 months-aged mice, we verified the antioxidant effects through TBA-RS and also the enzymes catalase and superoxide dismutase. In the same way, we found out that the same extracts reduced the acetylcholinesterase activity when administered by intraperitoneal injection. Using this methodology, the most potent extracts were *H. quadrifariata* and *H. reflexa*, corroborating the *in vitro* effect found for them. The purified alkaloidal extracts of *L. clavatum* and *L. thyoides* with habitat in Brazil and Argentine were compared to their chemical and biological profile. In this study, we found out that lycopodine and acetyldihydrolycopodine are the main alkaloids found for all species, and *L. clavatum* possesses a better inhibition against AChE when compared to *L. thyoides* for both Brazilian and Argentinean collected species.

Keywords: Alzheimer's disease, Lycopodiaceae, alkaloids, antioxidant activity, anticholinesterasic activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Proteólise do peptídeo APP e produção do peptídeo A β .
- Figura 2 Ilustração do sítio esterásico da enzima AChE
- Figura 3 Estruturas dos fármacos inibidores da enzima AChE empregados na terapêutica da doença de Alzheimer
- Figura 4 Estruturas dos alcalóides já testados em modelos animais para a doença de Alzheimer
- Figura 5 Estrutura do fármaco memantina
- Figura 6 Estrutura do composto multifuncional memoquina
- Figura 7 Estrutura do alcalóide flegmarina
- Figura 8 Estrutura do alcalóide licopodina
- Figura 9 Estruturas dos alcalóides licodina e huperzina A
- Figura 10 Estrutura do alcalóide faucetidina
- Figura 11 Estruturas dos alcalóides lucidina A e senepodina A
- Figura 12 Reações de formação dos produtos corados
- Figura 13 Obtenção das enzimas AChE e BuChE a partir de sangue humano
- Figura 14 Estruturas e classe química dos alcalóides de *Lycopodium* encontrados nas espécies vegetais analisadas.
- Figura 15 Estruturas dos alcalóides cernuína e licocernuína.
- Figura 16 Conversão química do alcalóide clavolonina em acetilclavolonina.
- Figura 17 Espectros de massa referentes ao alcalóide majoritário não identificado e seu produto de degradação minoritário.
- Figura 18 Espectro de massa referente ao alcalóide anidrolícodolina e ao alcalóide não identificado.
- Figura 19 Curva dose-efeito para o alcalóide acetildiidrolicopodina
- Figura 20 Curva dose-efeito para o alcalóide cernuína
- Figura 21 Percentagem de liberação da enzima LDH e da viabilidade celular na presença do EAT de *L. clavatum*

Figura 22 Percentagem de liberação da enzima LDH e da viabilidade celular na presença do EAT de *L. thyoides*

Figura 23 Percentagem de liberação da enzima LDH e da viabilidade celular na presença do EAT de *H. acerosa*

Figura 24 Percentagem de liberação da enzima LDH e da viabilidade celular na presença do EAT de *H. reflexa*

Figura 25 Percentagem de liberação da enzima LDH e da viabilidade celular na presença do EAT de *H. quadrifariata*

Figura 26 Percentagem de liberação da enzima LDH e da viabilidade celular na presença do EAT de *L. cernua*

Figura 27 Efeito dos EAT de *L. clavatum*, *L. thyoides* e *H. acerosa* sobre a liberação da enzima LDH e a viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas

Figura 28 Efeito dos EAT de *H. reflexa*, *H. quadrifariata* e *L. cernua* sobre a liberação da enzima LDH e a viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Taxonomia de Lycopodiales segundo Øllgaard (1992).
- Tabela 2 Dados geográficos e números de coleta para as espécies estudadas.
- Tabela 3 Quantidade de material vegetal coletado e rendimentos de alcalóides totais
- Tabela 4 Percentagens de inibição das enzimas AChE e BuChE para cada alcalóide isolado.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A β	Peptídeo β -amilóide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AINES	Antiinflamatórios não-esteróides
APP	Precursor do peptídeo β -amilóide
BACE-1	<i>β-site APP cleaving enzyme</i> ou β -secretase
BuChE	Butirilcolinesterase
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas
ChAT	Colina acetiltransferase
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
COX	Ciclooxigenase
DA	Doença de Alzheimer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (reagente de Ellman)
EAT	Extrato de alcalóides totais
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtOH	Etanol
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
i.p.	Intraperitoneal
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LTP	Potenciação de longa duração
m/z	Relação massa/carga

M ⁺	Íon molecular
MAO	Monoamino oxidase
MDA	Malonodialdeído
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NFT	Emaranhados neurofibrilares
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NO	Óxido nítrico
OH [•]	Radical hidroxil
r ²	Coefficiente de determinação
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
spp.	Espécies (plural)
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRAP	Potencial antioxidante total
UI	Unidades internacionais
V _{max}	Velocidade máxima enzimática

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO GERAL

2. OBJETIVOS

3. REVISÃO DO TEMA

3.1. Doença de Alzheimer

3.1.1. Generalidades

3.1.2. Neuropatologia da doença de Alzheimer

3.1.2.1. Peptídeo β -amilóide e placas senis

3.1.2.2. Proteína τ e emaranhados neurofibrilares

3.1.2.3. Disfunção colinérgica

3.1.2.4. Alterações oxidativas

3.1.3. Abordagens farmacológicas para a doença de Alzheimer

3.1.3.1. Inibidores da enzima acetilcolinesterase

3.1.3.2. Antagonistas de receptores *N*-metil-*D*-aspartato

3.1.3.3. Novas alternativas para o tratamento da doença de Alzheimer

3.1.3.3.1. Estratégias terapêuticas baseadas no peptídeo β -amilóide

3.1.3.3.1.1. Vacina para o peptídeo β -amilóide

3.1.3.3.1.2. Terapia anti-agregante para o peptídeo β -amilóide

3.1.3.3.1.3. Redução da produção do peptídeo β -amilóide

3.1.3.3.2. Estratégias terapêuticas baseadas na proteína τ

3.1.3.3.3. Inibidores da monoamino oxidase

3.1.3.3.4. Antiinflamatórios

3.1.3.3.5. Antioxidantes

3.1.3.3.6. Antihipercolesterolêmicos

3.1.3.3.7. Memoquina

3.2. Família Lycopodiaceae: aspectos botânicos, químicos e biológicos

3.2.1. Aspectos botânicos

3.2.1.1. Pteridófitas

3.2.1.2. Taxonomia de Lycopodiaceae

3.2.1.3. Aspectos botânicos de Lycopodiaceae

3.2.2. Aspectos químicos

3.2.3. Aspectos biológicos

3.3. Huperzina A

4. MANUSCRITO I

5. MANUSCRITO II

6. MANUSCRITO III

7. MANUSCRITO IV

8. Estudos químicos e biológicos com alcalóides e extratos de alcalóides de Lycopodiaceae

8.1. Estudos químicos

8.1.1. Material vegetal

8.1.2. Extração, purificação e isolamento de alcalóides

8.1.3. Identificação dos alcalóides

8.1.4. Isolamento dos alcalóides

8.2. Estudos biológicos

8.2.1. Avaliação da atividade inibitória para AChE e BuChE *in vitro*

8.2.2. Avaliação da toxicidade celular *in vitro* para os extratos de alcalóides totais

8.3. Resultados e discussão

DISCUSSÃO GERAL

CONCLUSÕES

PERSPECTIVAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUÇÃO GERAL

Plantas medicinais representam historicamente uma das principais e mais disseminadas fontes de medicação pela população em geral e, apesar do aumento no uso de medicamentos sintéticos nos últimos anos, seu emprego tem sido ainda o tratamento de escolha para muitas populações no mundo inteiro, sendo para algumas a única fonte de medicação (HALBERSTEIN, 2005; WANG, 2008). Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) estimam que cerca de 80% da população mundial ainda empregue plantas medicinais como um tratamento primário para problemas de saúde (CRAGG e NEWMAN, 2005).

Nesse contexto, o uso de plantas pode constituir também matéria-prima para o isolamento de compostos ativos, como por exemplo, a morfina, isolada do ópio ainda no início do século XIX (BALUNAS e KINGHORN, 2005) tornando-se o primeiro produto natural a ser comercializado no mundo, em 1826 (NEWMAN *et al.*, 2003). Diversas outras moléculas ainda hoje empregadas na terapêutica tiveram sua descoberta baseada no uso popular. A quinina (isolada de espécies de *Cinchona* sp., nativa dos Andes), atropina e escopolamina (obtidas de plantas da família das Solanáceas empregadas pelos antigos gregos) e a reserpina (isolada de *Rauwolfia serpentina*, de uso popular na Índia) são exemplos importantes (GANELLIN, 1993).

Os alcalóides, dentre outras classes químicas, são exemplos de metabólitos secundários que deram origem a diversos fármacos (BARREIRO e FRAGA, 2001). A quantidade de produtos descritos, juntamente com sua diversidade estrutural e variadas atividades farmacológicas fazem deles um dos grupos de substâncias naturais mais importantes do ponto de vista terapêutico (BRUNETON, 1993). Além disso, diversos alcalóides foram ou ainda são empregados na terapêutica como importantes ferramentas para a elucidação de efeitos farmacológicos, respostas fisiológicas e mecanismos bioquímicos, tendo desempenhado um importante papel na descoberta e no estudo de receptores e canais iônicos (CORDELL *et al.*, 2001). Nesse sentido, muitos compostos derivados de plantas têm sido empregados com sucesso no tratamento de alguns tipos de câncer, como

por exemplo, vincristina e vimblastina, alcalóides indólicos isolados de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae), assim como a vincamina, molécula dotada de importante atividade vasodilatadora cerebral e neuroprotetora isolada das folhas de *Vinca minor* (L.) (Apocynaceae) (ERDÕ *et al.*, 1996; VAN DER HEIDJEN *et al.*, 2004).

Estima-se que aproximadamente 50% das novas entidades químicas aprovadas para uso comercial dentre os anos de 2000-2006 possam ser consideradas como derivadas de produtos naturais, e ainda cerca de 30% das restantes envolvem vacinas e produtos biológicos. Nesse sentido, embora a química combinatória ainda desempenhe um papel importante no processo de descoberta de novos fármacos, é indiscutível a importância dos produtos naturais nesse contexto (NEWMAN e CRAGG, 2007). Características comuns de moléculas naturais, como centros quirais e complexos sistemas de anéis com heteroátomos tornam tais produtos bastante interessantes do ponto de vista químico (KOEHN e CARTER, 2005), tanto para o seu uso em si como fármaco, quanto como ponto de partida para a síntese de novas moléculas, através de modificações estruturais (BALUNAS e KINGHORN, 2005). Destaca-se que 4 medicamentos com indicação para o tratamento da doença de Alzheimer foram introduzidos no mercado no período entre 01/1981 e 06/2006, dos quais 1 é um produto natural e os restantes, derivados de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2007).

Levando-se em consideração o custo de investimento e o grande retorno econômico de um novo fármaco, a indústria farmacêutica tem realizado enormes investimentos em doenças como Alzheimer, derrames, doenças cardíacas e depressão (LITTLEHALES, 1999), de forma que ensaios biológicos *in vitro* e automatizados possam constituir uma realidade mais eficaz para a triagem biológica de milhares de compostos (MONTANARI e BOLZANI, 2001). Inicialmente, a avaliação biológica de qualquer nova entidade química, seja biológica ou sintética, deve passar obrigatoriamente por ensaios *in vitro*. As vantagens desse tipo de ensaio são várias, dentre elas, a redução do número de animais empregados, rapidez, custo

mais baixo e importantes informações sobre mecanismos moleculares que podem ser obtidas (GEBHARDT, 2000).

A necessidade de novos fármacos para o tratamento de desordens do sistema nervoso central (SNC), com destaque para a doença de Alzheimer, tem levado a busca de produtos mais seguros, potentes e com menor incidência de efeitos adversos quando comparados àqueles atualmente presentes no mercado. Dessa maneira, a etnofarmacologia e a etnobotânica têm demonstrado ser uma ferramenta útil na identificação de novas plantas e drogas vegetais em potencial que sejam relevantes para o tratamento de desordens cognitivas, incluindo o Alzheimer (HOWES e HOUGHTON, 2003). Assim, dados compilados através de tais estudos podem servir como uma valiosa fonte de informações para o estudo de plantas medicinais e de seus princípios ativos, com o objetivo de se obter novos compostos com comprovada ação terapêutica. Nesse contexto, a medicina tradicional chinesa tem desempenhado nos últimos anos um importante papel na identificação de novas fontes vegetais para estudos químicos e biológicos quanto a uma série de alvos farmacológicos (ADAMS *et al.*, 2007). A partir de estudos com plantas tradicionalmente empregadas na China por pacientes com sintomas de perda de memória e demência, é que foi cientificamente descrita a planta *Qian Ceng Ta*, ou *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae), fonte de alcalóides inibidores da enzima acetilcolinesterase, mecanismo no qual se baseia a terapia colinomimética para o tratamento da doença de Alzheimer (HOWES e HOUGHTON, 2003; HOWES *et al.*, 2003).

Sendo assim, estudos foram iniciados para a busca de novos agentes terapêuticos, tanto dentro da família Lycopodiaceae, como também dentre as pteridófitas em geral, plantas que também são empregadas popularmente para o tratamento de diversas desordens. Diversas espécies pertencentes aos gêneros *Huperzia* e *Lycopodium* são empregadas para fins medicinais na medicina tradicional chinesa, inclusive para problemas relacionados ao SNC (DUKE e AYENSU, 1985).

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais são a avaliação química e farmacológica de extratos de alcalóides de plantas da família Lycopodiaceae (*H. acerosa*, *H. heterocarpon*, *H. quadrifariata* e *H. reflexa* do gênero *Huperzia*; *L. clavatum* e *L. thyoides* do gênero *Lycopodium* e *L. cernua* do gênero *Lycopodiella*) ocorrentes no estado do Rio Grande do Sul.

Os objetivos específicos incluem:

- identificação da presença de substâncias com atividade inibitória para a enzima acetilcolinesterase e atividade antioxidante através de métodos bioautográficos;
- caracterização e comparação dos perfis dos componentes presentes nos extratos de alcalóides totais;
- isolamento dos alcalóides majoritários presentes;
- determinação das atividades antioxidante e anticolinesterásica para os extratos de alcalóides totais obtidos através de sistemas gerados *in vitro*;
- determinação das atividades antioxidante e anticolinesterásica em estruturas cerebrais de camundongos após administração sistêmica dos extratos de alcalóides totais;
- investigação da toxicidade celular para os extratos empregando-se uma linhagem de gliomas C6.

3. REVISÃO DO TEMA

3.1. Doença de Alzheimer

3.1.1. Generalidades

A doença de Alzheimer (DA) foi primeiramente apresentada em 1907 por Alois Alzheimer (1864-1915), um patologista alemão que descreveu alterações no tecido cerebral de uma paciente de 51 anos de idade que havia morrido de um distúrbio mental incomum para a época (PARIHAR e HEMNANI, 2004). Ele verificou a presença de placas senis e de emaranhados neurofibrilares nas regiões do neocórtex e hipocampo e essa condição foi associada aos sintomas da paciente, que desenvolveu alterações cognitivas progressivas, desorientação e alucinações, culminando com seu óbito (MAURER *et al.*, 1997; FORMAN *et al.*, 2004).

Um século depois, a doença de Alzheimer representa cerca de 60% dos casos de demência em adultos, afetando em torno de 24 milhões de pessoas no mundo inteiro (REID, 2006). De maneira geral, esta doença tornou-se bastante frequente nas últimas décadas devido ao progressivo aumento da expectativa de vida da população mundial, uma vez que esta desordem acompanha o processo de envelhecimento (KOZIKOWSKI e TÜCKMANTEL, 1999). Como consequência, dados os efeitos proporcionados tanto em nível médico, social, psicológico como econômico, essa doença pode se tornar um dos grandes problemas de saúde pública deste século. Estima-se que o número de indivíduos afetados pela doença em 2050 triplique nos Estados Unidos e Europa, alcançando números como 13,2 e 16,2 milhões de pessoas afetadas, respectivamente (HEBERT *et al.*, 2003; WANCATA *et al.*, 2003). Além disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2025 cerca de $\frac{3}{4}$ de toda a população acima de 60 anos (aproximadamente 1,2 bilhão de indivíduos) estará vivendo em países em desenvolvimento. Sendo assim, 71% dos cerca de 81,1 milhões de casos globais de demência em 2040 estarão presentes nestes países (FERRI *et al.*, 2005).

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa irreversível e progressiva, caracterizada por perda de memória e danos nas funções cognitivas, ambos os processos associados com morte neuronal (BERG *et al.*, 1993; BARINAGA, 1995; YAMAZAKI *et al.*, 1996). Um dos sintomas iniciais mais frequentemente verificados em pacientes com esta doença é a deterioração da memória recente, com preservação da memória de longo prazo, antes que uma perda global de memória possa acontecer, com a progressão da patologia. Alterações na expressão verbal também ocorrem com frequência nos estágios iniciais, levando a dificuldades na leitura e escrita. Outros sintomas como a incapacidade em se desenvolver atividades motoras rotineiras também podem surgir, progredindo a um estágio onde o paciente se torna incapaz de desenvolver atividades básicas diárias, como o ato de comer e vestir-se (COYLE, 1987). Sintomas psiquiátricos também são descritos para a doença, com distúrbios comportamentais, alterações da personalidade, declínio da capacidade de raciocínio e depressão (BURNS *et al.*, 2002; PARIHAR e HEMNANI, 2004).

A maioria dos casos de Alzheimer diagnosticados tem surgimento em idade mais avançada e estes são caracterizados como esporádicos quando o paciente possui um baixo risco familiar para a doença. No entanto, uma percentagem menor de casos de pacientes com esta patologia possui um surgimento em idade mais prematura, e são encontrados frequentemente dentro de famílias com casos já relatados da doença, sugerindo a implicação de fatores genéticos para o aparecimento da mesma (MCMURTRAY *et al.*, 2006). Dessa maneira, estudos indicam que a mutação de três genes esteja implicada diretamente na etiologia da DA, sendo eles o precursor do peptídeo β -amilóide (APP) e os genes de presenilinas 1 (PS1) e 2 (PS2), todos envolvidos na formação de placas amilóides (LLEO *et al.*, 2004). Uma associação entre a doença de Alzheimer e a apolipoproteína E (Apo-E), responsável pela distribuição do colesterol entre os neurônios também é relatada (HATTERS *et al.*, 2006). Nesse caso, o alelo ϵ 4 deste gene é considerado um fator de risco para o surgimento da DA, havendo uma interação direta entre a Apo-E o peptídeo β -amilóide e o APP (PARIHAR e HEMNANI, 2004; PIMPLIKAR, 2009).

No entanto, o risco da doença entre membros da mesma família não depende apenas de um padrão hereditário, uma vez que fatores tanto genéticos quanto ambientais podem ter relação no desenvolvimento da patologia. Alguns fatores de risco estão conhecidamente envolvidos com a doença, como diabetes, doenças cardiovasculares, baixo nível educacional, dietas com alto nível calórico e sedentarismo e estima-se uma vida média de 8 anos a partir do diagnóstico dos primeiros sintomas clínicos da doença no indivíduo até sua morte (HOFFMAN *et al.*, 1996).

3.1.2. Neuropatologia da doença de Alzheimer

Dentre as características moleculares mais evidentes relacionadas à DA, estão a presença de depósitos extracelulares de peptídeo β -amilóide, ou $A\beta$, conhecidos como placas neuríticas ou senis, derivadas da proteína precursora do amilóide (APP), e a presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFT), além de disfunção colinérgica, intensa perda neuronal e alterações sinápticas no córtex cerebral, hipocampo e outras regiões cerebrais essenciais para a cognição e memória (PARIHAR e HEMNANI, 2004).

A densidade de placas senis presentes no córtex cerebral está diretamente relacionada com o grau de alterações cognitivas observadas em pacientes antes de sua morte, embora depósitos de $A\beta$ também possam ser encontrados em pacientes saudáveis; os emaranhados neurofibrilares estão bastante correlacionados com os sintomas de demência nos pacientes (COYLE, 1987). As regiões cerebrais mais comprometidas pelas alterações bioquímicas decorrentes da doença de Alzheimer são aquelas associadas às funções mentais superiores, havendo grande perda neuronal no córtex frontal, parietal e temporal, além do hipocampo (WEST *et al.*, 1994). Os neurônios da região CA1 do hipocampo são particularmente suscetíveis a essa patologia, e essa vulnerabilidade seletiva pode estar relacionada à expressão de genes que possam tanto prevenir como promover a morte celular, incluindo receptores glutamatérgicos e fatores neurotróficos, entre outros (MATTSON, 2004).

O hipocampo e o prosencéfalo basal são as regiões prematuramente afetadas pela DA, correspondendo às características clínicas observadas de acentuada perda de memória e de raciocínio, com manutenção da visão e dos movimentos (YAMADA e NABESHIMA, 2000). Curiosamente, também é relatada uma possível relação entre as duas principais características patológicas da doença de Alzheimer: a presença de placas senis e de emaranhados neurofibrilares. Nesse caso, a presença de A β pode induzir uma hiperfosforilação da proteína τ , resultando na formação de NFT e então culminando em morte neuronal (HARDY e ALLSOP, 1991). Além disso, também foi comprovado experimentalmente que um aumento na produção de A β pode diminuir a solubilidade da proteína τ em algumas linhagens celulares (WANG *et al.*, 2006a).

3.1.2.1. Peptídeo β -amilóide e placas senis

As placas senis são uma das principais características descritas para a DA, sendo o resultado da deposição de fibrilas e agregados amorfos de A β , presentes em elevadas quantidades e provenientes de proteínas altamente solúveis que se converteram gradualmente em polímeros fibrilares insolúveis com estruturas β cruzadas, acumulando-se no citosol e núcleo de células nervosas, ou ainda no espaço extracelular (FORMAN *et al.*, 2004). Além da doença de Alzheimer, tais agregados também podem ser encontrados em outras doenças, como a doença de Creutzfeld-Jakob, diabetes mellitus do tipo II e artropatia amilóide (CONWAY *et al.*, 2003).

O peptídeo β -amilóide que se acumula em placas senis é um peptídeo pequeno, contendo de 39 a 43 aminoácidos e proveniente de uma proteína transmembrana de maior extensão, o APP, que possui três isoformas, sendo duas de 700 e outra de 695 aminoácidos, esta última expressa predominantemente em células neuronais (YAMADA e NABESHIMA, 2000). As funções do APP, o precursor do peptídeo β -amilóide, não são ainda bem esclarecidas (DE STROOPER

e ANNAERT, 2000), embora seu metabolismo pela ação de enzimas secretases seja bem estudado.

A clivagem do APP é um processo complexo, incluindo três enzimas e dividido em duas vias principais, a via α e a via β , conforme o esquema apresentado na Figura 1.

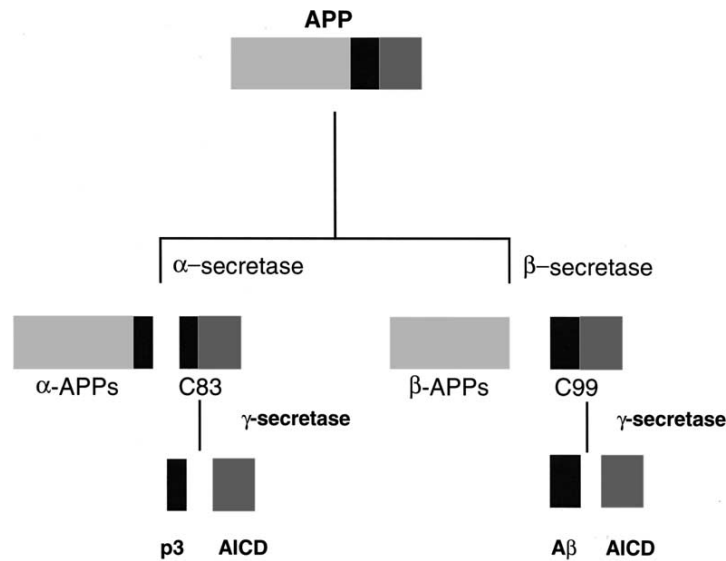


Figura 1: Proteólise do peptídeo APP e produção de peptídeo A β . (retirado de CITRON, 2002).

A via α não é amiloidogênica, e envolve a clivagem do APP por uma enzima α -secretase em sua estrutura, dando origem a fragmentos peptídicos não-amilóides. Entretanto, a clivagem sequencial do APP por ação de β e γ -secretases gera uma variedade de peptídeos A β , de característica amilóide (HAASS e DE STROOPER, 1999). Além disso, sabe-se que a enzima β -secretase torna-se mais ativa no cérebro conforme o aumento da idade (LLEO *et al.*, 2006). Os fragmentos extracelulares obtidos imediatamente após a clivagem do APP pela α e pela β -secretases possuem inclusive ação neuroprotetora, sendo capazes de promover a sobrevivência neuronal, bem como a atividade e a plasticidade sinápticas, com um efeito benéfico na promoção dos processos envolvidos com a memória (HOYER, 2003).

Duas espécies principais de A β são obtidas a partir da via β de clivagem, definidas pelo número de aminoácidos, sendo elas o A β_{40} (com resíduos de aminoácidos de 1-40), que constitui cerca de 90% do total de peptídeo β -amilóide secretado, e o A β_{42} (com resíduos de aminoácidos de 1-42). O peptídeo A β_{42} é altamente fibrilogênico, agregando-se rapidamente e formando depósitos amilóides (YAMADA e NABESHIMA, 2000), sendo sua toxicidade devida à insolubilidade de sua conformação estrutural β formada. Sabe-se que o peptídeo A β_{40} também pode produzir agregados que culminam em placas senis, embora este tenha menor tendência de formação quando comparado ao outro. Sendo os agregados amilóides estruturas resistentes à proteólise, o processo de formação destas placas não será revertido uma vez quando iniciado, podendo ainda se tornar um sítio de nucleação para a formação de mais agregados amilóides (SQUIER, 2001).

A produção de A β a partir do APP pode ser considerada uma clivagem proteolítica anormal, devido a mutações no gene APP ou também a uma atividade anormal de proteases. Entretanto, sabe-se que o peptídeo β -amilóide é também produzido em pequenas quantidades sob condições fisiológicas, e está presente no fluido cerebrospinal de pessoas saudáveis (RANG, 1999).

Estudos envolvendo outras patologias amilóides ainda não são capazes de esclarecer completamente se as placas de A β possam ser consideradas como o agente causador ou apenas como um produto gerado a partir da morte neuronal. Entretanto, há evidências crescentes de que oligômeros de A β sejam neurotóxicos e que também possam amplificar o efeito de outras neurotoxinas, uma vez que a concentração destas se correlaciona positivamente com a neuropatologia *in vivo* (ROYCHAUDHURI *et al.*, 2009). Assim, a “hipótese da cascata amilóide” sugere que o A β seja a molécula que desencadeia a neuropatologia ocasionada em pacientes com a doença de Alzheimer, e esta teoria tem sido bastante investigada, tanto a partir de ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (PÁKASKI e KÁLMÁN, 2008). Dessa maneira, evidências sugerem uma associação entre morte neuronal e um efeito pró-apoptótico dos oligômeros solúveis de A β (KLEIN, 2002, YOUSSEF *et al.*, 2008), uma vez que ratos tratados com o peptídeo A β demonstraram perdas

significativas de memória e este *in vitro* também induziu células de cultura primária de neurônios de ratos à apoptose, em um processo redox-dependente envolvendo ativação de caspases. Sugere-se nesse sentido, que a toxicidade celular induzida pelo peptídeo β -amilóide seja mediada pelo radical óxido nítrico ou por um aumento na atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) neuronal (STEPANICHEV *et al.*, 2008). Além disso, oligômeros solúveis de A β em experimentos celulares *in vitro* e *in vivo* demonstram estimular a hiperfosforilação da proteína tau em culturas de neurônios hipocâmpais, sugerindo um mecanismo de ligação entre os dois processos na patogênese da DA (DE FELICE *et al.*, 2008).

3.1.2.2. Proteína τ e emaranhados neurofibrilares

Os emaranhados neurofibrilares constituem-se em agregados intracelulares que possuem feixes de fibras anormais, formados por pares de filamentos enrolados na forma de hélice, sendo os mesmos constituídos pela proteína τ (proteína associada a microtúbulos) que está hiperfosforilada e com modificações oxidativas (CASSERLY, 2004). A proteína tau normalmente está envolvida na formação e na estabilização dos microtúbulos, mas no contexto da doença de Alzheimer ela se torna hiperfosforilada como consequência de um desequilíbrio entre as atividades de enzimas quinases e fosfatases, que fisiologicamente regulam sua fosforilação. Assim, a proteína τ se dissocia dos microtúbulos, perdendo sua capacidade de estabilizá-los e finalmente se auto-agrega em oligômeros insolúveis, formando emaranhados microscópicos (RANG, 1999; CHURCHER, 2006).

Tanto as placas senis como os emaranhados estão em áreas cerebrais associadas com o aprendizado, memória e comportamento, de forma que esses locais exibam um menor número de sinapses e danos neuronais, que estão relacionados com essas anormalidades moleculares e celulares (PARIHAR e HEMNANI, 2004). Todo esse processo resulta em perda neuronal e dano sináptico, com subsequente comprometimento da memória, coordenação motora e raciocínio,

além da capacidade cognitiva e demência (VIEGAS JÚNIOR *et al.*, 2004). Entretanto, a presença de NFT não é uma característica específica para a DA, uma vez que eles são também encontrados em outras doenças neurodegenerativas. Da mesma maneira, alguns casos menos frequentes de Alzheimer com mínima presença de emaranhados neurofibrilares também já foram descritos na literatura (SELKOE, 2001).

3.1.2.3. Disfunção colinérgica

Duas principais hipóteses têm sido empregadas para o estudo e esclarecimento dos mecanismos moleculares da doença de Alzheimer, sendo uma das hipóteses sobre a deposição amilóide e outra sobre o déficit colinérgico (PARIHAR e HEMNANI, 2004). Vários modelos animais têm sido empregados para demonstrar que disfunções colinérgicas são suficientes para induzir perda de memória em sistemas que mimetizam o quadro patológico da doença (BARTUS e EMERICH, 1999).

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor encontrado no cérebro, nas junções neuromusculares e nos eritrócitos, exibindo duas classes principais de receptores, os nicotínicos e os muscarínicos. Alguns de seus efeitos nos receptores musculares incluem a contração dos músculos lisos, dilatação dos vasos sanguíneos e regulação da taxa de batimentos cardíacos, enquanto que nos receptores cerebrais seus efeitos estão relacionados ao controle das funções motoras, cognição e memória (GIACOBINI, 1998; KOZIKOWSKI e TÜCKMANTEL, 1999; RANG *et al.*, 2000). Tanto a atividade como permanência da ACh no organismo são regulados por dois tipos distintos de colinesterases. A acetilcolinesterase (AChE) ou colinesterase verdadeira (E.C. 3.1.1.7), presente nas fendas sinápticas das sinapses colinérgicas, tem como função hidrolisar este neurotransmissor, regulando suas concentrações livres; no entanto a enzima é inibida na presença de altas concentrações de ACh. A butirilcolinesterase (BuChE), também conhecida como

pseudocolinesterase ou colinesterase não-específica (E.C. 3.1.8), está localizada no plasma, rins, fígado, pele, cérebro, coração e pulmão. Ela não está associada às sinapses, uma vez que possui uma distribuição neuronal mais restrita, e sua função ainda não é totalmente esclarecida, mas seu subtipo plasmático está associado à inativação de fármacos com grupamento éster (RANG *et al.*, 2000).

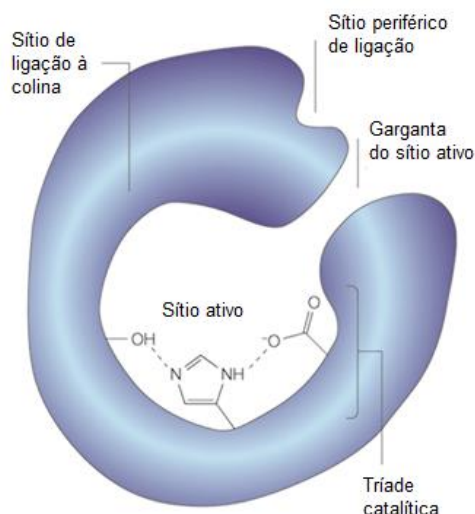


Figura 2: Ilustração do sítio esterásico da enzima AChE, contendo a tríade catalítica (formado pela serina, histidina e glutamato ou aspartato), o sítio aniônico para ligação à ACh e o sítio aniônico periférico (retirado e adaptado de SOREQ e SEIDMAN, 2001).

Nesse contexto, já foi demonstrado em estudos anteriores que a atividade da enzima colina-acetiltransferase (ChAT), responsável pela síntese de acetilcolina, está bastante diminuída em córtex e hipocampo de pacientes acometidos pela doença de Alzheimer, estando este fato relacionado com os déficits cognitivos observados (DAVIES e MALONEY, 1976). Além disso, também foi observada uma perda significativa de neurônios colinérgicos, bem como a densidade de receptores nicotínicos no córtex destes pacientes (RANG *et al.*, 1999).

O envolvimento do sistema colinérgico com a DA tem sido proposto a partir da observação de que a administração de substâncias anticolinérgicas pode induzir um comportamento similar àquele observado em pacientes com esta patologia. Também, a distribuição de déficits colinérgicos se correlaciona bastante com as

regiões cerebrais responsáveis pelos sintomas tratados, e os distúrbios comportamentais advindos são mitigados em pacientes tratados com inibidores colinérgicos ou agonistas de receptores colinérgicos (CUMMINGS, 2000). Além disso, na DA não se observa apenas a destruição de neurônios colinérgicos, mas também de regiões corticais e hipocampais que recebem inervação colinérgica (HARDMAN *et al.*, 2001). Todas essas observações levaram à hipótese colinérgica que propõe que os distúrbios cognitivos observados nessa doença são principalmente devido ao déficit colinérgico causado, e que tais disfunções são parcialmente revertidas com o uso de estimulantes colinérgicos (FRANCIS *et al.*, 1999). Entretanto, uma limitação dessa hipótese é a falta de déficit colinérgico observado nos estágios iniciais da DA (LLEO *et al.*, 2006).

Assim, o fundamento da hipótese colinérgica baseia-se no perfil terapêutico de fármacos potencializadores da função colinérgica central, uma vez que eles proporcionam melhoras no perfil cognitivo e também em alguns efeitos comportamentais oriundos da doença de Alzheimer. Além disso, os neurônios presentes nas sinapses colinérgicas são seletivamente destruídos durante o decurso da doença, e a atividade da ChAT fica comprometida (HOCK, 1995; VIEGAS JÚNIOR *et al.*, 2004). As principais estratégias farmacológicas exploradas atualmente para equilibrar a disfunção colinérgica em pacientes com DA incluem a inibição da degradação da acetilcolina e a administração de agonistas para receptores nicotínicos (MAELICKE *et al.*, 2000; MAELICKE *et al.*, 2001). Entretanto, a maior limitação para o uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase na terapêutica é que neurônios colinérgicos intactos são necessários para sintetizar ACh, de forma que estes fármacos sejam mais benéficos antes que ocorra grande degeneração neuronal (HOCK, 1995).

3.1.2.4. Alterações oxidativas

O sistema nervoso central (SNC) é especialmente vulnerável ao estresse oxidativo devido a algumas características específicas, como seu elevado consumo de oxigênio, abundante conteúdo de lipídios e relativa escassez de antioxidantes quando comparado a outros tecidos (REITER, 1995). Nesse sentido, este fenômeno constitui-se em um ponto importante para explicar os danos proporcionados pela doença de Alzheimer, considerando o mesmo como um evento patológico inicial, através de alterações no citoesqueleto e membranas celulares, com morte neuronal (TAMAGNO *et al.*, 2006). Evidências também apontam a danos causados por espécies reativas a macromoléculas como lipídios, carboidratos e proteínas, bem como aos ácidos nucleicos (MARKESBERY e CARNEY, 1999). Estudos sobre danos oxidativos relacionados à doença de Alzheimer apontam que o tecido cerebral destes pacientes apresenta níveis aumentados de proteínas oxidadas, de produtos de glicação avançada e produção de 4-hidróxi nonenal, um aldeído tóxico marcador de lipoperoxidação (SMITH *et al.*, 1995; PARIHAR e HEMNANI, 2004).

Dados experimentais consideráveis sugerem que o peptídeo β -amilóide esteja envolvido na indução de estresse oxidativo tanto *in vitro* quando *in vivo* e também na geração de espécies reativas levando a disfunção e morte neuronais (PIMPLIKAR, 2009). A ação neurotóxica do peptídeo $A\beta$ envolve a geração de radicais livres e alterações na homeostase quanto à permeabilidade celular para íons Ca^{2+} , uma vez que a interação entre os oligômeros de β -amilóide com íons Fe^{2+} ou Cu^+ resulta na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa de oxigênio. Dessa maneira, células neuronais na presença de $A\beta$ são rapidamente induzidas a uma grande produção de H_2O_2 *in vitro*, e danos celulares significativos, seguidos de morte (TAMAGNO *et al.*, 2006).

Quando o acúmulo de $A\beta$ ocorre na região da membrana plasmática, ocorre lipoperoxidação resultante do estresse oxidativo proporcionado pela produção de espécies reativas, com produção de 4-hidroxinonal e também oxidação de algumas proteínas, como ATPases e canais iônicos. Além disso, o peptídeo $A\beta$ pode

provocar estresse oxidativo mitocondrial, resultando em danos na cadeia transportadora de elétrons e produção elevada de radicais superóxido. Também, a interação do H_2O_2 com os íons Fe^{2+} ou Cu^+ pode gerar radicais hidroxila, potentes indutores da lipoperoxidação das membranas, agravando os danos proporcionados pelos radicais livres neste quadro patológico (MATTSON, 2004).

Um número de estudos sobre o processo de envelhecimento sugere o envolvimento do estresse oxidativo com a doença de Alzheimer já em um estágio bastante inicial da patologia, levando à agregação de peptídeo $\text{A}\beta$ e à hiperfosforilação da proteína tau como um mecanismo compensatório, já que um dos fatores principais da senescência seria o acúmulo de danos produzidos pelo estresse oxidativo e metabólico (NONOMURA *et al.*, 2006). Investigações *post-mortem* e *in vivo* de pacientes com sintomas cognitivos decorrentes da doença verificaram a presença de produtos resultantes do estresse oxidativo gerados por espécies reativas tanto de oxigênio como de nitrogênio (MANGIALASCHE *et al.*, 2009). Além disso, agentes pró-oxidantes também parecem aumentar a produção de $\text{A}\beta$ através de uma super-regulação da expressão da proteína APP (TAMAGNO *et al.*, 2006). Mais recentemente, sugere-se o envolvimento das mitocôndrias no processo oxidativo da DA, uma vez que anormalidades morfológicas, bioquímicas e genéticas para esta organela têm sido detectadas em diferentes tecidos de pacientes acometidos pela doença (MANCUSO *et al.*, 2010).

3.1.3. Abordagens farmacológicas para a doença de Alzheimer

O conhecimento sobre a patogênese das doenças neurodegenerativas tem avançado enormemente nos últimos anos, e embora ainda não se compreenda completamente os mecanismos celulares e sintomas resultantes envolvendo a DA, o consenso científico seria que se trata de uma doença multifatorial, compreendendo tanto fatores genéticos, ambientais como endógenos (CAVALLI *et al.*, 2008). Assim, uma série de estratégias farmacológicas está atualmente sob investigação e algumas delas são empregadas terapêuticamente; entretanto as opções terapêuticas

lançadas no mercado são muito poucas e não são capazes de alterar ou prevenir a doença, sendo consideradas apenas paliativas para seus sintomas (MELNIKOVA, 2007).

Dentre elas, três principais abordagens podem ser destacadas: a primeira delas visa restabelecer os níveis diminuídos de neurotransmissores, a segunda se baseia na neuroproteção e a terceira delas tem como alvo aspectos específicos da DA, como as placas senis (CITRON, 2004). Apesar dos avanços recentes na compreensão do mecanismo de neurodegeneração envolvido na doença de Alzheimer, ainda não existem terapias totalmente efetivas para a doença (RANG *et al.*, 1999). Os fármacos empregados atualmente proporcionam apenas um aumento temporário da cognição, sem prevenir a morte neuronal progressiva causada pela patologia (RIEDERER *et al.*, 2004).

Não há modelos animais que possam mimetizar todos os sintomas cognitivos, comportamentais, bioquímicos e anormalidades histopatológicas observadas dentro da DA. O processo de neurodegeneração latente envolvido na doença ocorre espontaneamente apenas em seres humanos. Entretanto, uma reprodução parcial da neuropatologia e dos déficits cognitivos provenientes da doença de Alzheimer tem sido alcançada através de abordagens genéticas e farmacológicas, mas a falta de um modelo animal padrão torna o estudo de uma potencial terapia para a DA mais complicado (YAMADA e NABESHIMA, 2000).

3.1.3.1. Inibidores da enzima acetilcolinesterase

A principal estratégia empregada no tratamento da doença de Alzheimer visa aumentar a eficiência da transmissão colinérgica cerebral dos pacientes afetados. A primeira abordagem estudada nesse sentido se valia do uso de precursores da síntese da acetilcolina, como o cloridrato de colina e a fosfatidilcolina ou lecitina. Entretanto, os estudos randomizados realizados não demonstraram efeitos clínicos significativos. Assim, uma alternativa terapêutica mais eficaz foi introduzida com o uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), de maneira a diminuir a velocidade de hidrólise e aumentar a permanência deste neurotransmissor na fenda

sináptica neuronal (HARDMAN *et al.*, 2001). Os inibidores da acetilcolinesterase são considerados atualmente os fármacos de escolha para o tratamento de pacientes com sintomas leves a moderados da DA (SCARPINI *et al.*, 2003).

Os fármacos inibidores da degradação da ACh reduzem a velocidade de hidrólise da acetilcolina e aumentam o seu tempo de meia-vida, e vêm sendo uma das alternativas terapêuticas mais utilizadas por apresentarem melhores resultados no controle da doença, sem serem capazes de impedir sua evolução em nenhum de seus níveis (MAELICKE *et al.*, 2000). Baseado nos avanços obtidos em investigações sobre as razões moleculares do surgimento da doença de Alzheimer, o uso de inibidores da AChE tem sido considerado uma forma eficiente de controle dos sintomas desta patologia, fato este que tem motivado a busca por novos modelos estruturais que possam ser mais eficientes e mais potentes para o controle da evolução desta patologia (QUIK e JEYARASASINGAM, 2000; TABARRINI *et al.*, 2001). Dentre os inibidores sintéticos empregados para o tratamento da DA, com ação sobre a enzima AChE, podemos citar a tacrina, donepezil e rivastigmina, além do produto natural galantamina, todos já aprovados pelo FDA para uso clínico (BLENNOW *et al.*, 2006).

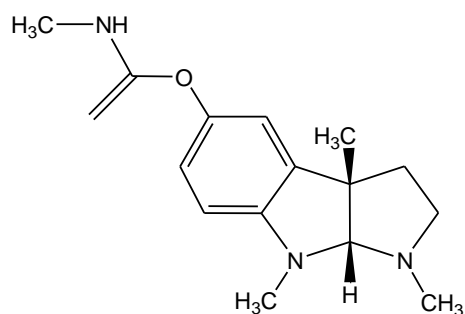
O primeiro fármaco empregado como inibidor da enzima AChE para a doença de Alzheimer foi a fisostigmina ou eserina (**1**), alcalóide indólico presente nas sementes de *Physostigma venenosum* Balf. (Fabaceae), e tradicionalmente usado como um veneno em rituais em determinadas tribos africanas (BRUNETON, 1999). Esta substância é uma amina terciária e atravessa facilmente a barreira hematoencefálica para produzir efeitos colinérgicos centrais (SCHRIPSEMA *et al.*, 2003), sendo um dos primeiros fármacos empregados para o tratamento desta doença, através de administração oral e intravenosa (GIACOBINI, 1998). Apesar de excelente inibidor da enzima, este alcalóide é bastante instável à hidrólise, apresentando uma duração de ação muito curta e efeitos colaterais colinérgicos bastante pronunciados e frequentes, como ataque e parada cardíaca, além de baixa absorção intestinal (HOUGHTON *et al.*, 2006). Assim, uma série de derivados análogos estruturais foram sintetizados, como a neostigmina, uma amina

quarternária potente inibidora da AChE, e a fenserina, anticolinesterásico que também reduz a formação do peptídeo A β . Atualmente, a fisostigmina é empregada unicamente em aplicações tópicas para o tratamento de glaucoma (GIACOBINI, 1998; HOSTETTMAN *et al.*, 2003; SCHRIPSEMA *et al.*, 2003; GREIG *et al.*, 2005).

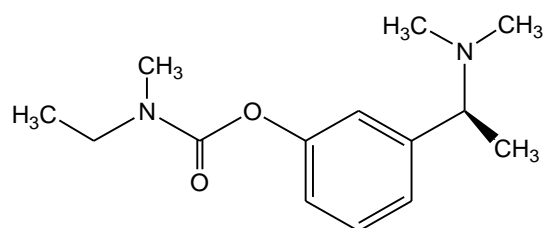
A rivastigmina (**2**), outro análogo da fisostigmina, vem sendo empregada na terapêutica desta doença, possuindo ação longa e efeitos colaterais de menor intensidade (FORETTE *et al.*, 1999; TAYLOR, 2003). A rivastigmina possui um tempo de meia-vida curto (1 hora), mas com a vantagem de não apresentar um metabolismo hepático, de forma que suas interações com outros fármacos são pouco frequentes. Apesar disso, tem como efeitos adversos náuseas e vômitos. (BLENNOW *et al.*, 2006). Ela demonstra uma afinidade similar para ambas as colinesterases assim como a fisostigmina, o que pode ser uma vantagem, uma vez que a atividade da enzima BuChE aumenta conforme a progressão da doença de Alzheimer (BALLARD *et al.*, 2005). Este fármaco é comercializado no Brasil como Exelon[®].

A tacrina (**3**) foi o primeiro inibidor enzimático aprovado pelo FDA para seu uso na doença de Alzheimer em 1993, sendo considerado um inibidor potente e seletivo para a AChE, mas devido ao seu baixo tempo de meia-vida, deve ser tomado quatro vezes ao dia. Além disso, essa substância demonstrou ser dotada de efeitos positivos sobre a perda de memória; porém sua grande desvantagem está no fato de desenvolver hepatotoxicidade em cerca de 30% dos pacientes, de forma que a tacrina não seja atualmente a terapia de escolha para a doença. Entretanto, esta molécula serviu como protótipo para o desenvolvimento de novos inibidores, bem como para o melhor entendimento desta patologia (MONTEITH *et al.*, 1996; RANG *et al.*, 1999; GAUTHIER e SCHELTENS, 2009).

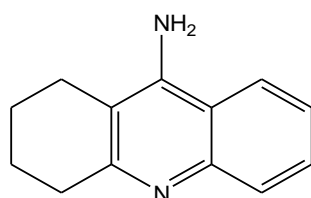
Donepezil (**4**) é um inibidor parcialmente reversível e altamente seletivo para a enzima AChE (SUGIMOTO *et al.*, 2002). Além disso, ele é bem tolerado pelos pacientes, com efeitos adversos leves e transitórios (DOOLEY e LAMB, 2000), exibindo um elevado tempo de meia-vida, de 60-70 horas, o que permite apenas



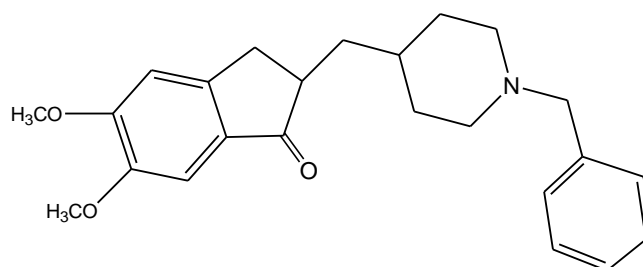
Fisostigmina (1)



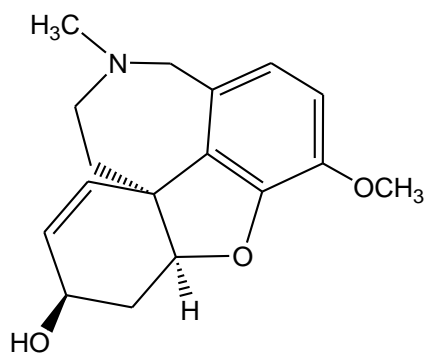
Rivastigmina (2)



Tacrina (3)



Donepezil (4)



Galantamina (5)

Figura 3: Estruturas dos fármacos inibidores da enzima AChE empregados na terapêutica da doença de Alzheimer: fisostigmina (1), rivastigmina (2), tacrina (3), donepezil (4) e galantamina (5).

uma dose diária (SHIGUETA *et al.*, 2001). Também parece aumentar a densidade de receptores nicotínicos e reduzir moderadamente certos sintomas comportamentais associados à doença (TARIOT e FEDEROFF, 2003). É comercializada no Brasil como Epez[®] e Eranz[®] na forma farmacêutica comprimidos.

Finalmente, a galantamina (**5**) alcalóide isolado de várias espécies de plantas da família Amaryllidaceae, como *Galanthus nivalis* L. e *Leucojum aestivum* L. (HOSTETTMAN *et al.*, 2003), é outro composto aprovado pelo FDA para o tratamento da doença de Alzheimer, comercializado no Brasil com o nome Reminyl[®]. Esta substância produziu em pacientes um grau de melhora cognitiva e também demonstrou ativar alguns subtipos de receptores nicotínicos, atuando aparentemente como um modulador alostérico positivo e melhorando a resposta do receptor a acetilcolina, aumentando a frequência de abertura de canais iônicos (MAELICKE *et al.*, 2000). A galantamina mostrou ser um inibidor da AChE seletivo, reversível, competitivo e de ação longa, de maneira que seus efeitos terapêuticos perdurem até mesmo após o término do tratamento (LÓPEZ *et al.*, 2002). Devido ao seu excelente perfil terapêutico, um grande avanço no planejamento de fármacos para o tratamento da DA foi decorrente da descoberta de seu duplo mecanismo de ação, como inibidor da enzima AChE e como ligante potencializador alostérico nos receptores nicotínicos cerebrais (QUICK e JEYARASASINGAM, 2000; MAELICKE *et al.*, 2000; WILKINSON *et al.*, 2004).

Tanto donepezil quanto a galantamina são metabolizados pelas enzimas dos citocromos P450 (CYP), CYP3A4 e CYP2D6, enquanto a rivastigmina possui um metabolismo não-hepático. A rápida absorção da galantamina e da rivastigmina pode proporcionar efeitos adversos colinérgicos, porém sua ingestão concomitante com alimentos pode limitar essa incidência (LLEO *et al.*, 2006). Entretanto, não há evidências de superioridade de um composto sobre o outro com respeito a resultados de eficácia sobre aspectos cognitivos, comportamentais ou funcionais (TARIOT e FEDEROFF, 2003).

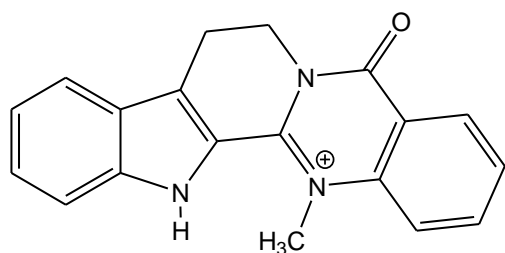
Alguns compostos inibidores da AChE também ainda estão sendo submetidos a ensaios clínicos para avaliação de sua eficácia terapêutica, como por exemplo a huperzina A (**6**), um alcalóide originalmente isolado a partir da espécie *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis (Lycopodiaceae) (YU *et al.*, 2009). Entretanto, devido à relativa escassez de suas fontes naturais, aliada ao fato de que sua molécula requer uma cara e difícil síntese total, investigadores têm

desenvolvido alguns derivados de huperzina A, visando ao seu uso terapêutico, como as huprinas (híbridos de huperzina A com tacrina) e análogos sintéticos, como as hupiridonas, dímeros de estruturas análogas ao alcalóide natural (ALCALÁ *et al.*, 2003; COLOMBRES *et al.*, 2004).

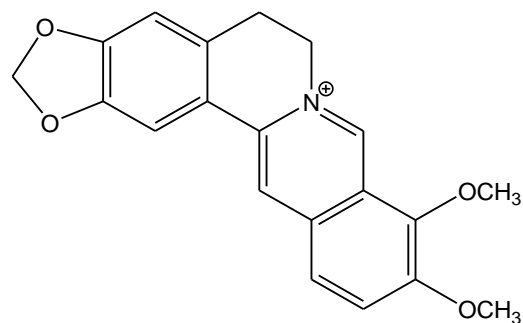
Além disso, um grande número de compostos ativos para o tratamento da doença de Alzheimer obtidos a partir de fontes naturais tem sido descrito na literatura, sendo a maioria dos mesmos acetilcolinesterásicos (DI GIOVANNI *et al.*, 2008). Destes, grande parte tem demonstrado apenas efeito antienzimático *in vitro* e somente alguns deles têm sido avaliados em modelos animais *in vivo*. De fato, sabe-se que um dos sítios de ligação da enzima AChE deve envolver a interação com um átomo de nitrogênio carregado positivamente, apesar de que a existência de outros sítios de ligação seja possível, para permitir a inibição da enzima por outros compostos não-alcaloídicos, como as cumarinas e xantonas, por exemplo (HOUGHTON *et al.*, 2006, FALLARERO *et al.*, 2008; URBAIN *et al.*, 2008).

Alcalóides ativos inibidores da AChE têm sido isolados a partir de plantas de várias famílias, com destaque para Amaryllidaceae (gêneros *Crinum* spp., *Galanthus* spp., *Narcissus* spp.), Buxaceae (gêneros *Sarcococca* spp., *Buxus* spp.), Lycopodiaceae (gêneros *Huperzia* spp. e *Lycopodium* spp.), Papaveraceae (gêneros *Chelidonium* spp., *Corydalis* spp., *Glaucium* spp.), Apocynaceae (gêneros *Tabernaemontana* spp., *Haplophyton* spp.), Ranunculaceae (gêneros *Aconitum* spp., *Coptis* spp.), Liliaceae (gênero *Fritillaria* sp.), Fumariaceae (gênero *Fumaria* spp.), entre outras (ORHAN *et al.*, 2004; HOSTETTMAN *et al.*, 2006; ADSERSEN *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2010). Dentre os compostos ativos já testados em modelos animais, a deidroevodiamina (7), alcalóide isolado da espécie *Evodia rutaecarpa* Bentham (Rutaceae), demonstrou reverter significativamente uma amnésia induzida por escopolamina em ratos a partir de uma única administração através de via intraperitoneal (i.p.) (PARK *et al.*, 1996). Através do mesmo mecanismo de ação também agiram a berberina (8) e a protopina (9), compostos presentes em espécies da família Papaveraceae (PENG *et al.*, 1997). Mais recentemente, também foi verificado que a pseudoberberina (10) possui

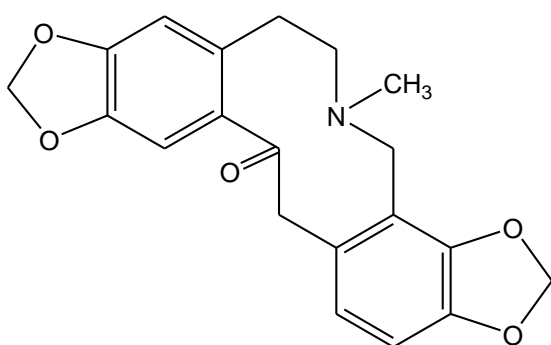
propriedades anti-amnésicas, sendo capaz de reverter os danos cognitivos induzidos pela administração de escopolamina em camundongos, além de aumentar o tempo de natação dos animais nos ensaios com o labirinto aquático de Morris (HUNG *et al.*, 2008).



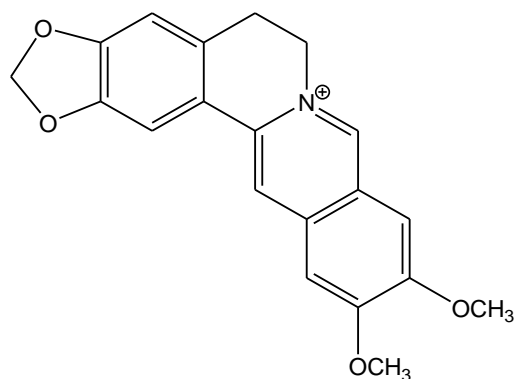
Deidroevodiamina (7)



Berberina (8)



Protopina (9)



Pseudoberberina (10)

Figura 4: Estruturas dos alcalóides já testados em modelos animais para a doença de Alzheimer: deidroevodiamina (7), berberina (8), protopina (9) e pseudoberberina (10).

Além dos alcalóides, outras classes de compostos também têm sido avaliadas quanto ao seu potencial anticolinesterásico, a fim de se evitar os efeitos adversos proporcionados por muitos deles. Nesse sentido, os óleos essenciais e seus terpenos constituintes são os principais produtos naturais mencionados, principalmente os provenientes das famílias Lamiaceae (*Salvia* spp. e *Mentha* spp.) (HOSTETTMAN *et al.*, 2006; MUKHERJEE *et al.*, 2007; ORHAN e ASLAN, 2009). Outras classes

de produtos naturais, como xantonas, cumarinas, flavonóides e quinolonas também têm demonstrado efeito anti-AChE *in vitro* (HOSTETTMAN *et al.*, 2006).

3.1.3.2. Antagonistas de receptores *N*-metil-*D*-aspartato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório presente no SNC, localizado em regiões do cérebro associadas à memória e cognição. Quando liberado em elevadas concentrações e por períodos prolongados, o glutamato pode também agir como uma excitotoxina, causando morte neuronal em processos patológicos como, por exemplo, durante a isquemia cerebral (DUGAN e CHOI, 1999).

Dentre os receptores glutamatérgicos NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato), AMPA (ácido α -amino 3-hidróxi, 5-metil, 4-isoxazol propiônico) e cainato, o NMDA, quando ativado, permite um influxo constante de íons Ca^{2+} para os neurônios, processo este que parece estar envolvido com a potenciação de longa duração (LTP), fenômeno proposto como um mecanismo neuronal potencial para o armazenamento de memória e transmissão sináptica (BLISS e COLINGRIDGE, 1993). Entretanto, em algumas doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, Alzheimer e Huntington, um aumento na concentração de glutamato extracelular pode levar a uma excessiva ativação destes receptores, causando danos e morte neuronal, em um fenômeno chamado excitotoxicidade (DUGAN e CHOI, 1999; SCARPINI *et al.*, 2003). As regiões corticais e subcorticais sofrem perdas estruturais e funcionais com o decorrer da doença de Alzheimer, uma vez que elas contêm neurônios e receptores glutamatérgicos (WENK *et al.*, 2000). Além disso, durante a DA o peptídeo $A\beta$ é capaz de potencializar a toxicidade induzida pelo glutamato, enquanto que a ativação dos receptores NMDA poderia amplificar a patologia induzida por $A\beta$ e τ (TARIOT e FEDEROFF, 2003).

Nesse sentido, antagonistas de receptores NMDA já vêm sendo investigados terapêuticamente no sentido de permitir proteção neuronal durante a patologia da DA. Contudo, muitos dos antagonistas glutamatérgicos testados tiveram como

resultado uma grande incidência de efeitos adversos, seja devido a sua grande afinidade pelos receptores, ou seja, também devido a sua interação com outros neurotransmissores, afetando as funções cerebrais normais (SONKUSARE *et al.*, 2005).

A memantina (**11**), único composto desta classe terapêutica aprovado para uso pelo FDA, é reservada para emprego em estágios moderados a severos da doença de Alzheimer, comercializada no Brasil com o nome Ebix[®] (VARDY, 2006; FARLOW e CUMMINGS, 2007). Trata-se de um antagonista glutamatérgico não competitivo dos receptores NMDA, e não um inibidor da AChE. Estudos sugerem que ela proteja os neurônios de danos produzidos pela excitotoxicidade induzida pelo glutamato, mas sem afetar a ativação fisiológica deste receptor, necessária para a atividade cognitiva (HELMUTH, 2002; PUANGTHONG e HSIUNG, 2009). De fato, devido ao seu mecanismo de ação distinto, a memantina não apresenta os efeitos adversos comumente esperados para os fármacos empregados no tratamento da doença de Alzheimer. Aliado a isso, este composto parece bloquear os receptores de maneira mais eficaz quando na presença de maiores concentrações de glutamato (CHEN e LIPTON, 2006). Investigações sugerem que ela tenha eficácia sobre o comportamento e cognição tanto em pacientes que sofrem de Alzheimer quanto de esquizofrenia (KRIVOY *et al.*, 2008).

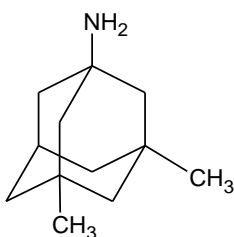


Figura 5: Estrutura do fármaco memantina (**11**), antagonista de receptores NMDA empregado na terapêutica da doença de Alzheimer.

Além disso, a sua relativa longa meia-vida permite que sua administração seja feita somente duas vezes ao dia, e não há metabolismo hepático. Um estudo clínico de curta duração realizado sugeriu que os efeitos obtidos a partir da

administração conjunta de memantina e donepezil possam ser superiores àqueles obtidos somente com donepezil em pacientes com um grau leve a moderado da doença de Alzheimer (LLEO *et al.*, 2006).

3.1.3.3. Novas alternativas para o tratamento da doença de Alzheimer

As alternativas terapêuticas disponíveis atualmente para o tratamento da patologia da DA proporcionam apenas um alívio temporário para os sintomas em muitos pacientes, sem alterar ou prevenir a progressão da doença, de forma que a busca por novas alternativas de tratamento é imprescindível (CAVALLI *et al.*, 2008). Devido ao grande número de investigações científicas no sentido de procurar entender e elucidar de maneira mais eficaz os mecanismos moleculares envolvendo esta patologia, um número de abordagens terapêuticas tem sido proposto, como as listadas a seguir.

3.1.3.3.1. Estratégias terapêuticas baseadas no peptídeo β -amilóide

De acordo com a “hipótese da cascata amilóide”, o peptídeo A β que se agrega e deposita na forma de placas amilóides extracelulares é formado a partir de uma proteólise sequencial do APP, sendo a formação de emaranhados neurofibrilares um processo secundário, mas ambos levando à neurodegeneração (KENNEDY *et al.*, 2007). Atualmente, assume-se que o peptídeo A β esteja presente no tecido nervoso na forma de um equilíbrio dinâmico entre monômeros e oligômeros solúveis com oligômeros e fibras amilóides insolúveis, todos potencialmente neurotóxicos. Estas espécies podem exercer danos celulares através de diferentes maneiras, seja através de transtornos da função mitocondrial, por indução de genes apoptóticos, formação de canais iônicos, estimulação de proteínas-quinases induzidas por estresse ou por ativação da microglia, levando à expressão de genes pro-inflamatórios, aumento na geração de espécies reativas e morte neuronal (CAVALLI *et al.*, 2008). Assim, o estabelecimento dessa hipótese como

evento primordial da patogênese da doença de Alzheimer tem levado a investigações sobre múltiplas abordagens terapêuticas para esta doença.

3.1.3.3.1.1. Vacina para o peptídeo β -amilóide

Esta abordagem terapêutica parte da premissa de que anticorpos anti-A β , induzidos pela imunização para o peptídeo A β , atravessariam a barreira hematoencefálica e eliminariam as placas senis. A idéia seria que os anticorpos evitariam a formação de depósitos e que também auxiliariam em sua supressão do tecido cerebral. Assim, três hipóteses foram investigadas para este possível efeito; a primeira delas através de um efeito direto, o que levaria à dissolução dos agregados, segundo por uma possível fagocitose mediada por anticorpos anti- A β , ou também por um efluxo do peptídeo A β do tecido cerebral para o plasma, devido a uma mudança no equilíbrio da concentração de peptídeo entre esses dois possíveis depósitos (WEINER e FRENKEL, 2006).

Um número de protocolos de vacinação tem sido elaborado por diferentes grupos de investigação mundiais, sendo primeiramente testados em modelos empregando camundongos transgênicos. Todos eles têm levado a uma redução na quantidade de placas amilóides no cérebro e também a benefícios quanto aos danos comportamentais observados (SCARPINI *et al.*, 2003). O processo de imunização ativa em camundongos transgênicos para A β_{42} antes da indução da patologia decorrente da doença de Alzheimer pode prevenir tanto a deposição de agregados amilóides como reduzir a extensão e a progressão da patologia. Estudos também evidenciaram que a redução nos depósitos de A β está associada a benefícios cognitivos e comportamentais nestes modelos, sugerindo que a imunização anti-A β possa diminuir ou mesmo reverter a agregação amilóide (VARDY *et al.*, 2006). Também, foi verificado que a imunização poderia reduzir a presença de NFT em um estágio inicial de formação em animais transgênicos desenvolvendo tanto placas amilóides quando emaranhados neurofibrilares (MOREIRA *et al.*, 2006).

Tendo-se em vista estes resultados promissores, alguns ensaios clínicos de imunização em pacientes com DA leve a moderada foram iniciados. Entretanto um estudo clínico de imunização ativa iniciado em 2001 teve de ser interrompido na fase II, devido a uma síndrome pós-vacinação, onde aproximadamente 6% do grupo tratado sofreram de meningoencefalite (VARDY *et al.*, 2006). Foi demonstrado que esta reação não foi devido ao título de anticorpos A β presente, mas sim a uma resposta inflamatória específica (MOREIRA *et al.*, 2006). Também, foi observado que os anticorpos criados pelos pacientes não possuíam reações cruzadas com APP de cadeia longa ou com outros compostos, sendo os mesmos direcionados diretamente às placas amilóides, e que os pacientes com maior carga de anticorpos foram os que apresentaram menores declínios cognitivos (LLEO *et al.*, 2006). Além disso, tem sido proposto que a imunização anti-A β também possa melhorar a transmissão colinérgica, embora o exato mecanismo ainda não seja conhecido. Atualmente, três ensaios clínicos com imunização para o peptídeo A β estão em andamento nos EUA e Europa (PÁKÁSKI e KÁLMÁN, 2008).

A imunização passiva com anticorpos anti-A β também tem demonstrado efeitos benéficos contra a deposição de placas amilóides. Entretanto, um número significativo de casos de hemorragia cerebral amyloid angiopathy-related tem sido observado em estudos animais. Atualmente, tanto ensaios de imunização ativa quanto passiva estão em andamento nas fases clínicas I e II (VARDY *et al.*, 2006).

3.1.3.3.1.2. Terapia anti-agregante para o peptídeo β -amilóide

Alguns peptídeos sintéticos de cadeia curta com homologia para a região hidrofóbica do peptídeo A β têm sido planejados a fim de se interromper a estabilização da conformação β insolúvel formada para o mesmo (SCARPINI *et al.*, 2003). Entretanto, evidências sugerem que a inibição da formação dos agregados poderia levar a um aumento no acúmulo de oligômeros metaestáveis que poderiam ser ainda mais patogênicos. A vantagem dessa terapia é o fato de que seu alvo

terapêutico trata-se de um evento patológico, sem interferência com as reações metabólicas normais (SELKOE, 2001).

Recentemente, o tramiprosato, um agente anti-agregante, tem demonstrado eficácia em inibir a polimerização do peptídeo β -amilóide, tanto através de ensaios *in vitro* como *in vivo*, e atualmente está em avançado estágio clínico em pacientes (AISEN, 2005; CAVALLI *et al.*, 2008). Um produto natural, a curcumina também demonstrou bloquear a agregação amilóide de maneira potente ($IC_{50} < 1 \mu M$), além de ser um potente antioxidante e evitar danos ainda maiores às células neuronais já lesadas pela patologia, constituindo-se em um composto multifuncional (ZHANG *et al.*, 2005).

3.1.3.3.1.3. Redução da produção do peptídeo β -amilóide

A produção do peptídeo $A\beta$ requer a ação de duas enzimas, a β e a γ -secretases, de forma que sua inibição poderia também inibir por consequência o processo de formação de placas amilóides. Além disso, um aumento na atividade da enzima α -secretase também poderia interferir na patologia, por impedir a formação do peptídeo $A\beta$ através da clivagem do APP em dois fragmentos. Assim, as abordagens nesse sentido envolvem a inibição da β e a γ -secretases ou a estimulação da α -secretase (CITRON, 2004).

A β -secretase é uma protease ligada à membrana, também conhecida como BACE-1 (*β -site APP cleaving enzyme*) ou memapsin (*membrane aspartyl protease of the statin family*) (MOREIRA *et al.*, 2006). Este tipo de protease possui um sítio de ligação amplo de ligação ao seu substrato, de forma que seus possíveis inibidores enzimáticos devam possuir uma extensa cadeia, mas sem afetar sua habilidade em cruzar a barreira hematoencefálica (VARDY *et al.*, 2006). Além disso, os inibidores BACE-1 devem também ser específicos para outras aspartil proteases, como a BACE-2, que também produz peptídeo $A\beta$, mas é expressa em tecidos altamente vascularizados, e para a catepsina D, uma protease envolvida no processamento de hormônios e antígenos (SCARPINI *et al.*, 2003). Grande parte dos inibidores

conhecidos é planejada baseada em peptídeos, com o uso de hidróxietilenos, estatinas ou hidróxiethyluréias adicionadas a determinadas sequências de aminoácidos. Contudo, compostos não-peptídicos têm sido também avaliados nesse sentido com o intuito de superar problemas como a baixa biodisponibilidade por via oral e eficácia em cruzar a barreira hematoencefálica (SCHMIDT *et al.*, 2006).

Dessa maneira, produtos naturais têm sido investigados quanto a sua atividade anti- β -secretase, como algumas catequinas presentes no chá verde (*Camellia sinensis* L., Theaceae), que demonstraram potência na ordem micromolar (JEON *et al.*, 2003). A hispidina, estilipirona isolada do fungo *Phellinus linteus* (L. ex. Fr) Quel. também demonstrou uma atividade potente (PARK *et al.*, 2004). Outros inibidores não competitivos da β -secretase foram isolados de *Sanguisorba officinalis* L. (Rosaceae), a telimagrandina II e o ácido gálico (LEE *et al.*, 2005), bem como a groenlandicina e epiberberina, alcalóides dos rizomas de *Coptis chinensis* Franch (Ranunculaceae) (JUNG *et al.*, 2009). O mesmo efeito biológico foi demonstrado também pelo ácido elágico e pela punicalagina, isolados de *Punica granatum* L. (Punicaceae). Até o momento, a punicalagina é o produto natural de maior atividade inibitória para a β -secretase, com $IC_{50} = 0,41 \mu M$ (KWAK *et al.*, 2005).

A γ -secretase é um complexo enzimático que consiste em várias subunidades, com presenilinas como o sítio catalítico deste complexo. Mutações nos genes dos dois tipos de presenilinas existentes (PS1 e PS2) podem conduzir ao surgimento da doença de Alzheimer (VARDY *et al.*, 2006). Nesse sentido, um número de inibidores para a γ -secretase são conhecidos, todos com capacidade de diminuir a produção de peptídeo A β tanto *in vitro* como *in vivo*. Entretanto, alguns estudos indicam que o fragmento de APP C-terminal, antes de sofrer a clivagem pela γ -secretase, parece ser mais tóxico que o peptídeo A β por si só, além de desempenhar algumas funções fisiológicas (CUTLER e SRAMEK, 2001; MOREIRA *et al.*, 2006). Além do APP, outro substrato conhecido para a γ -secretase é a Notch, proteína transmembrana envolvida na sinalização e desenvolvimento celulares. Assim, compostos anti- γ -secretase que reduzam a

produção de A β e que não interfiram na sinalização realizada pela proteína Notch têm sido desenvolvidos. Essa ação seletiva é provavelmente mediada por interação com uma proteína ligada à membrana, a nicastrina, que é parte do complexo γ -secretase e provavelmente modula o sítio catalítico do mesmo (SCARPINI *et al.*, 2003). O alvo terapêutico definido para os inibidores de γ -secretase a serem investigados está em diminuir em cerca de 10% a secreção do peptídeo A β ₄₂, e sem efeitos tóxicos (SCHMIDT *et al.*, 2006). Dentre os compostos com tal efeito, o fármaco antiinflamatório R-flurbiprofeno tem também demonstrado efeitos cognitivos positivos em pacientes com doença de Alzheimer de grau moderado e está atualmente em avançado estágio em seus ensaios clínicos (VARDY *et al.*, 2006, CAVALLI *et al.*, 2008).

Experimentos conduzidos com animais transgênicos têm demonstrado que a ativação da enzima α -secretase também pode resultar em uma diminuição da formação do peptídeo A β . Uma série de compostos com atividade estimuladora para a α -secretase tem sido relatada, como alguns agonistas muscarínicos e serotoninérgicos, além do glutamato, estatinas, estrógeno (através da terapia de reposição hormonal), testosterona e ativadores da proteína quinase C. Embora alguns destes compostos já tenham sido investigados através de ensaios clínicos, evidências para seu uso terapêutico rotineiro ainda não foram estabelecidos. Interessantemente, alguns inibidores da enzima AChE parecem ser estimuladores da clivagem α do APP (VARDY *et al.*, 2006).

3.1.3.3.2. Estratégias terapêuticas baseadas na proteína τ

Um aumento na fosforilação da proteína τ está associado ao número de emaranhados neurofibrilares formados, e este processo parece ser o resultado de um aumento na atividade de proteína quinases, em combinação com uma reduzida atividade de fosfatases (CUTLER e SRAMEK, 2001).

Diversas quinases estão envolvidas na hiperfosforilação da proteína τ , mas evidências mais recentes sustentam o papel de duas enzimas, a quinase 3 β -glicogênio sintase (GSK3 β) e a quinase ciclina-dependente 5 (Cdk5). Sabe-se que a conversão da Cdk5 em uma forma menor está relacionada a um aumento na hiperfosforilação da proteína τ , e dessa maneira, o planejamento de moléculas inibidoras desta enzima poderia evitar a formação de NFT em neurônios de pacientes com a doença de Alzheimer (CUTLER e SRAMEK, 2001). O lítio, composto estabilizador do humor, é capaz de inibir a enzima GSK3 β e tem demonstrado reduzir tanto a formação de peptídeo β -amilóide quanto a formação de NFT em animais transgênicos. Atualmente, o lítio se encontra em estudos de investigação clínica em pacientes com doença de Alzheimer para este fim (VARDY *et al.*, 2006; CAVALLI *et al.*, 2008).

Outros mecanismos de ação têm sido propostos com o intuito de evitar a toxicidade neuronal proveniente da proteína τ , como por exemplo, o restabelecimento das funções fisiológicas para a proteína τ hiperfosforilada, prevenção da agregação dos emaranhados de proteína τ , remoção dos emaranhados neurofibrilares formados ou mesmo a estabilização dos microtúbulos (VARDY *et al.*, 2006).

3.1.3.3.3. Inibidores da enzima monoamino oxidase

A monoamino oxidase (MAO) está envolvida em mecanismos de estresse oxidativo e também é responsável pela desaminação de neurotransmissores ou neuromoduladores, como a noradrenalina, dopamina e serotonina. Existem dois subtipos enzimáticos: a MAO-A e a MAO-B, que se diferem pela sua distribuição tecidual, pelos seus substratos bem como pela especificidade de inibição. A MAO-A desamina preferencialmente a serotonina, e seus inibidores são considerados antidepressivos, enquanto que o substrato preferencial para a MAO-B é a β -feniletilamina, sendo seus inibidores empregados para o tratamento da doença de Parkinson. Além disso, a MAO-B representa cerca de 80% da atividade da monoamino oxidase cerebral (RIEDERER *et al.*, 2004). Na doença de Alzheimer,

tanto os circuitos neuronais dopaminérgicos quanto os noradrenérgicos ficam deteriorados, de maneira que inibidores da MAO possam restabelecer os níveis de ambos os neurotransmissores (CUTLER e SRAMEK, 2001; STAHL e FELKER, 2008).

O inibidor MAO-B selegilina possui ação neuroprotetora multifatorial, uma vez que ele diminui a formação de radicais livres através da metabolização de aminas endógenas, possui efeito sequestrador para espécies reativas no SNC, previne a ativação de pré-toxinas exógenas, inibe a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) tanto no sistema nervoso quanto no vascular e também exibe efeitos neuroprotetores contra a apoptose neuronal em culturas celulares. Estudos clínicos conduzidos para a selegilina em pacientes com a doença de Alzheimer demonstram benefícios significativos na memória e na atenção, efeito possivelmente associado a melhoras nas funções dos sistemas monoaminérgicos envolvidos no processo de degeneração neuronal. A selegilina também parece estar envolvida em melhoras dos sintomas de depressão e agitação, comumente observados na doença (RIEDERER *et al.*, 2004). Entretanto, análises *post-mortem* realizadas em pacientes tratados com este fármaco não demonstram diferenças nos níveis de NFT e de placas senis. Uma meta-análise conduzida concluiu que o uso rotineiro da selegilina para a doença de Alzheimer não deveria ser preconizada, uma vez que não há evidências de efeitos benéficos em longo prazo para o tratamento (CUTLER e SRAMEK, 2001).

Além disso, uma série de estudos envolvendo planejamento racional de fármacos tem buscado aliar as características inibitórias para a MAO-B da selegilina com o efeito inibitório sobre a AChE da fisostigmina, através da síntese de uma série de moléculas já testadas através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Outros estudos têm empregado tanto a rasagilina como a selegilina juntamente com a rivastigmina como ponto de partida para o desenvolvimento de *leads*, visando ao equilíbrio tanto do efeito anti-AChE quanto do efeito anti-MAO-B nas moléculas sintetizadas (STERLING *et al.*, 2002). Assim surgiu o ladostigil, um potencial candidato para o tratamento da doença de Alzheimer, cujo estudo clínico em pacientes com demência

e depressão encontra-se no final da fase II. Seu efeito neuroprotetor *in vivo* já foi verificado, por inibição de processos apoptóticos e também por impedir a ativação da caspase-3 (CAVALLI *et al.*, 2008). Também possui atividade estimuladora para a α -secretase, ativando a rota não-amiloidogênica de clivagem do APP, de maneira que o ladostigil possa contribuir positivamente para benefícios cognitivos aos pacientes com a doença de Alzheimer (YOUUDIM *et al.*, 2006).

3.1.3.3.4. Antiinflamatórios

Muitos estudos epidemiológicos retrospectivos têm demonstrado a ligação entre o uso prolongado de fármacos antiinflamatórios não-esteróides (AINES) com uma redução dos riscos de surgimento da doença de Alzheimer (SCARPINI *et al.*, 2003). Assim, a hipótese seria que a neurodegeneração é um efeito proporcionado devido à resposta inflamatória causada pela presença de placas amilóides e NFT (MOREIRA *et al.*, 2006). Acredita-se que o processo inflamatório possa acelerar a progressão da doença de Alzheimer através de dois mecanismos, seja por aumentar a deposição do peptídeo A β e de placas senis, por consequência, ou também por estimular a morte neuronal causada. De fato, ainda não se sabe com clareza se a neuroinflamação contribui para a formação de placas amilóides e de emaranhados neurofibrilares, ou se ela ocorre como consequência desses dois acontecimentos patológicos; de qualquer maneira, o uso de antiinflamatórios pode trazer efeitos benéficos em potencial (VARDY *et al.*, 2006). Além disso, a expressão da ciclooxigenase (COX) parece estar elevada em cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer, e a expressão da COX-2 parece estar particularmente aumentada em regiões cerebrais com elevada densidade de placas senis (CUTLER e SRAMEK, 2001).

Estudos em alguns modelos animais indicam que o uso de AINES possa atenuar o processo de inflamação do tecido nervoso (VARDY *et al.*, 2006). Uma recente meta-análise envolvendo 11 estudos prospectivos e não-prospectivos demonstrou que os AINES estão associados com riscos reduzidos da doença de Alzheimer. Entretanto, alguns ensaios clínicos têm resultado em efeitos negativos,

gerando algumas dúvidas quanto à hipótese inflamatória da patologia. Algumas razões sugeridas para este fato têm sido sobre o estágio da doença quando a terapia foi iniciada ou ainda sobre a escolha do fármaco. Além do efeito antiinflamatório, três AINES (ibuprofeno, indometacina e sulindaco) têm demonstrado diminuir a produção do peptídeo $A\beta_{42}$ independentemente da inibição da COX (MOREIRA *et al.*, 2006). Assim, é possível que o mecanismo independente da COX seja responsável pelos efeitos benéficos observados em estudos com AINES (VARDY *et al.*, 2006).

3.1.3.3.5. Antioxidantes

Considerando-se o estresse oxidativo como um evento primário para a patogênese da doença de Alzheimer, investigações têm sido conduzidas a fim de se verificar como os antioxidantes e suplementos alimentares possam prevenir ou retardar a doença (MOREIRA *et al.*, 2006). Além disso, a toxicidade do peptídeo $A\beta$ pode ser atenuada *in vitro* com o uso de antioxidantes (TARIOT e FEDEROFF, 2003).

A principal estratégia antioxidante estudada tem sido o uso de α -tocoferol (vitamina E), uma vez que baixos níveis séricos de vitamina E estão associados com prejuízos na memória e sua concentração plasmática está bastante reduzida em pacientes com a DA. A vitamina E é capaz de reduzir a morte neuronal *in vitro* na presença de peptídeo $A\beta$ em modelos celulares (CUTLER e SRAMEK, 2001). Um ensaio randomizado duplo-cego foi realizado em pacientes sofrendo da forma leve a moderada da doença, sendo tratados com α -tocoferol (1000 UI/dia) e selegilina, um inibidor da MAO com características antioxidantes, cada um deles isoladamente ou em conjunto. Os resultados demonstram que a combinação não traz nenhum efeito adicional, sendo ele igual àquele alcançado pela vitamina E somente. Os dois fármacos são efetivos quanto a melhoras no *status* funcional dos pacientes, bem como um aumento de 6 meses em média na sobrevivência para a comunidade investigada no estudo, embora não tenha trazido efeitos cognitivos importantes

(TARIOT e FEDEROFF, 2003). Um estudo de meta-análise conduzido sugere que doses acima de 400 UI por dia de vitamina E possam incrementar a mortalidade pela doença, e uma vez que os benefícios obtidos com este tratamento sejam apenas modestos, a recomendação seria para descontinuar o tratamento ou então empregar doses menores de α -tocoferol (LLEO *et al.*, 2006).

Estudos epidemiológicos conduzidos a fim de se verificar formas alternativas de emprego da vitamina E para prevenir a doença de Alzheimer têm demonstrado resultados contraditórios. Alguns ensaios demonstram um retardo no avanço da doença, enquanto que outros não demonstraram tal efeito. Particularmente, um estudo randomizado de 5 anos no qual pacientes com riscos vasculares receberam uma combinação de vitamina E, vitamina C e β -caroteno ou placebo não detectou nenhuma diferença na frequência de danos cognitivos entre os grupos. Do mesmo modo, a eficácia da ingestão de vitamina C também não foi completamente investigada (LLEO *et al.*, 2006).

A idebenona, um antioxidante de similaridade estrutural à ubiquinona tem demonstrado efeitos positivos quanto a sintomas cognitivos decorrentes da doença de Alzheimer. Estudos verificaram que a relação risco-benefício é favorável quando a idebenona é comparada com a tacrina e provavelmente com outros inibidores da AChE (TARIOT e FEDEROFF, 2003).

A eficácia dos antioxidantes no tratamento desta patologia não está completamente estudada até o momento, mas presume-se que sua eficácia seja mais bem verificada em combinações com outros antioxidantes e não isoladamente, como são comumente estudados (MOREIRA *et al.*, 2006).

O planejamento racional de moléculas com atividades antioxidantes e anticolinesterásicas também tem sido realizado, visando melhorar a transmissão colinérgica juntamente com um controle dos danos celulares oxidativos e redução da agregação amilóide. O protótipo inicial dessa classe é a lipocrina, produto entre a combinação da tacrina com o ácido lipóico (ROSINI *et al.*, 2005). A mesma estratégia foi usada na síntese de compostos a partir da melatonina e do ácido ferúlico com a tacrina, resultando em compostos bastante ativos quanto à inibição

da AChE, com maior seletividade para esta do que para a BuChE, além de grande atividade antioxidante e efeitos benéficos quanto à patologia induzida pela presença de placas de peptídeo A β e de NFT (RODRIGUEZ-FRANCO *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2008).

3.1.3.3.6. Antihipercolesterolêmicos

Evidências correlacionando elevados níveis de colesterol *in vivo* com a DA já foram identificadas, de modo que estudos em modelos animais demonstraram que uma dieta enriquecida em colesterol aumenta a imunorreatividade do peptídeo A β no cérebro, acelerando a patogênese amilóide em camundongos transgênicos para esta doença. Entretanto, percebe-se que a dose empregada nos estudos é cerca de duas vezes maior que a dose normal ingerida diariamente por humanos, sendo necessários alguns estudos complementares para que os dados possam ser mais bem correlacionados (MOREIRA *et al.*, 2006). Por outro lado, um estudo *in vitro* sugeriu que a manipulação farmacológica das concentrações de colesterol intracelular possa influenciar diretamente a proteólise do APP, que passa da via amiloidogênica para a não-amiloidogênica em resposta à redução nos níveis de colesterol (SCARPINI *et al.*, 2003). O colesterol também parece regular negativamente a atividade da enzima α -secretase, enquanto que tanto a β - quanto a γ -secretases foram super-reguladas, resultando em um aumento na produção de placas amilóides. Além disso, a quantidade de colesterol nas membranas parece aumentar diretamente a atividade da γ -secretase (MOREIRA *et al.*, 2003).

Alguns estudos epidemiológicos retrospectivos têm relacionado o uso crônico de estatinas com um decréscimo no risco de desenvolver a doença de Alzheimer. Entretanto, em um estudo de triagem randômica controlado com a pravastatina, nenhum efeito significativo sobre as funções cognitivas foi observado mesmo após três anos de tratamento (SCARPINI *et al.*, 2003).

De acordo com os dados obtidos até o momento, não há diferenças farmacológicas nesse sentido quanto à eficácia de estatinas hidrofílicas ou

hidrofóbicas, uma vez que teoricamente suas características moleculares não permitiriam sua passagem através da barreira hematoencefálica. Sendo assim, se o efeito protetor das estatinas for confirmado, ele será devido a um efeito indireto sobre o cérebro dos pacientes (MOREIRA *et al.*, 2006).

3.1.3.3.7. Memoquina

O planejamento racional de novos fármacos para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, tem considerado cada vez mais a obtenção de moléculas que não sejam específicas apenas para um alvo biológico, mas para vários deles ao mesmo tempo, já que essas doenças estão relacionadas a múltiplos fatores patogênicos. Assim, surgiu o conceito do MTDL (*multi-target-directed ligand*), composto com potencial atividade multifatorial quanto ao seu alvo terapêutico e que poderia também ser empregado para mais de uma doença neurodegenerativa, uma vez que algumas delas compartilham mecanismos patológicos em comum (MORPHY e RANKOVIC, 2005; CAVALLI *et al.*, 2008).

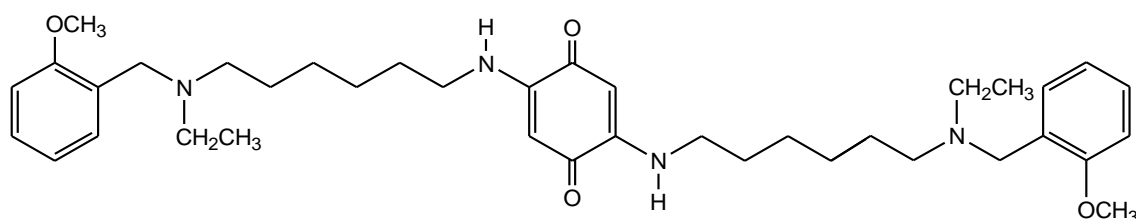


Figura 6: Estrutura do composto multifuncional memoquina (**12**).

Dessa maneira, estudos acadêmicos que visavam à criação de compostos multifuncionais para a DA levaram à síntese da memoquina (**12**), molécula que possui vários efeitos benéficos em comum, como atividade anticolinesterásica, atividade inibitória para o processamento do APP e agregação do peptídeo β -amilóide, além de ser potente antioxidante (ROSINI *et al.*, 2005).

A memoquina possui o fragmento benzoquinona proveniente da coenzima Q10 como a porção sequestradora de espécies reativas, estando este incorporado a um esqueleto poliamina proveniente de uma série sintetizada de inibidores colinérgicos. Sua eficácia já foi comprovada em ensaios biológicos, sendo verificada atividade anti-AChE em ordem nanomolar, inibição da agregação amilóide induzida por ação da AChE, da auto-agregação do peptídeo A β ₄₂, além de inibidor da BACE-1 (β -secretase). Quando testado em modelos com animais transgênicos, a memoquina demonstrou reverter os déficits colinérgicos observados, além de prevenir a hiperfosforilação da proteína τ no córtex e promover melhoras em sintomas comportamentais observados, como distúrbios de memória e atenção. Sendo também um composto com boa biodisponibilidade por via oral, além de boa capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica e boa tolerância mesmo depois de prolongadas administrações, a memoquina parece ser uma entidade química capaz de combater a neurodegeneração causada pela doença de Alzheimer em diferentes níveis (CAVALLI *et al.*, 2008).

3.2. Família Lycopodiaceae: aspectos botânicos, químicos e biológicos

3.2.1. Aspectos botânicos

3.2.1.1. Pteridófitas

As plantas pertencentes ao filo Pteridophyta, representadas em sua maioria pelas samambaias ou avencas, constituem um grupo bastante importante do ponto de vista evolutivo, uma vez que são consideradas as primeiras plantas terrestres a apresentarem tecido dotado de vasos condutores (BARROS *et al.*, 2002). Este grupo vegetal está amplamente distribuído pelo mundo, englobando uma riqueza de espécies estimada entre 9000 a 12000, das quais cerca de 3250 delas ocorrem nas Américas, sendo algumas delas exclusivas dos trópicos (TRYON e TRYON, 1982; WINDISCH, 1992). No Brasil, ocorrem cerca de 1100 espécies, constituindo-se em um grupo bastante representativo da biodiversidade do país (WINDISCH, 2002).

As pteridófitas são muito antigas em termos evolutivos, sendo desprovidas de sementes, possuindo raízes verdadeiras, caule do tipo rizoma e folhas denominadas frondes. Sua reprodução é realizada por esporos e com marcada alternância de duas gerações em seu ciclo de vida, com uma geração esporofítica diplóide dominante (PRYER *et al.*, 2004; SMITH *et al.* 2006). As espécies desse grupo têm ocorrência em uma variada diversidade de habitats, podendo ser terrestres, rupestres ou epifíticas, em sua maioria apresentando porte herbáceo e em alguns casos trepadeiras (SALINO, 2000). Seus ambientes de ocorrência abrangem desde o nível do mar até elevadas altitudes, de latitudes correspondentes às regiões temperadas e subtropicais até as regiões próximas aos círculos polares (PAGE, 1979). No Brasil, as pteridófitas apresentam-se distribuídas principalmente no bioma da Mata Atlântica, nas regiões sudeste e sul (LABIAK e PRADO, 1998).

Estas plantas foram recentemente classificadas nas divisões Monilophyta (fetos, cavalinhas e psilotáceas) e Lycophyta (selagineláceas, licopodiáceas e isoetáceas) (PRYER *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2006). Segundo ØLLGAARD (1987), a família Lycopodiaceae nos Neotrópicos apresenta aproximadamente 185 espécies, sendo divididas entre os gêneros *Huperzia* Bernh., *Lycopodiella* Holub. e *Lycopodium* L.

3.2.1.2. Taxonomia de Lycopodiaceae

Embora várias classificações botânicas tenham sido sugeridas para *Lycopodium* (s.l.), o sistema taxonômico para Lycopodiales ainda não está bem estabelecido, sendo atualmente aceitos os sistemas propostos por Ching, Holub e Øllgaard (MA e GANG, 2004). O ponto preponderante seria a definição muito vaga para a diferenciação de espécies, baseadas mais no senso comum e experiência botânica que propriamente em características definidas (ØLLGAARD, 1992). Assim, classificações têm sido propostas baseadas em seus gametófitos, mas apenas algumas poucas espécies são conhecidas dessa forma (BRUCE, 1976). O sistema

descrito por ROTHMALER (1944) inclui *Huperzia* em uma família distinta de *Lycopodium* (família Huperziaceae = Urostachyaceae), empregando como caracteres diferenciais o número de cromossomos das espécies aliado a aspectos químicos, através da presença de ácidos fenólicos, ligninas e flavonas (GIFFORD e FOSTER, 1989). Nesse sentido, os ácidos fenólicos presentes em Lycopodiales têm sido usados para a sua classificação botânica, sendo os principais constituintes o ácido ferúlico, além de ácidos *p*-cumarínico, cafeico, vanílico e *p*-hidróxibenzóico. O ácido sirínico tem sido encontrado nos gêneros *Lycopodium* e *Diphasium*, mas não em *Huperzia* e *Lepidotis* na classificação proposta por Rothmaler (1944). Além disso, cabe destacar que a capacidade em sintetizar compostos derivados do ácido sirínico é uma maneira de distinguir as angiospermas das pteridófitas e da maioria das gimnospermas (TOWERS e MAASS, 1965). O mesmo tipo de classificação também tem sido proposto para o conteúdo em flavonóides presentes nos diferentes gêneros. Dessa maneira, o gênero *Lycopodium* contém crisoeriol e/ou luteolina enquanto que *Huperzia* contém crisoeriol, apigenina, luteolina, selagina e tricínina (VOIRIN e JAY, 1978).

O sistema proposto por WILCE (1972) baseia-se na morfologia dos esporos das diferentes espécies destas plantas. Por outro lado, HOLUB tem proposto uma série de classificações nos anos de 1964, 1985 e 1991. Ele propôs a inclusão de novos gêneros, como *Lycopodiella*, *Austrolycopodium* ou *Diphasiastrum* e também estabeleceu que o número de cromossomos não seja uma característica definitiva para a segregação de *Huperzia* dos demais gêneros de Lycopodiales. O sistema proposto por Ching em 1981, principalmente empregado na China e outros países asiáticos, é baseado em dados quimiotaxômicos quanto ao conteúdo de alcalóides de aproximadamente 20 espécies chinesas. Dessa maneira, as espécies da família Huperziaceae conteriam principalmente huperzina A, huperzina B, serratina e serratinina, enquanto que espécies de Lycopodiaceae conteriam liconotina e anotinina (MA *et al.*, 1998). No sistema proposto por Tryon e Tryon (1982) há a inclusão do gênero *Phylloglossum* Kunze, apenas encontrado na Austrália,

Tasmânia e Nova Zelândia, com apenas uma espécie, *Phylloglossum drummondii* Kunze.

Tabela 1: Taxonomia de Lycopodiales segundo Øllgaard (1992)

	Família	Gênero	Seções ou grupos
Øllgaard (1992)	Lycopodiaceae	<i>Lycopodium</i> L.	<i>Lycopodium</i>
			<i>Complanata</i> Victorin
			<i>Diphasium</i> (Rothm.) B. Øllg.
			<i>Magellanica</i> B. Øllg.
		<i>Lycopodiella</i> Holub	<i>Lycopodiella</i> Holub
			<i>Caroliniana</i> (Bruce) B. Øllg.
			<i>Campylostachys</i> (K. Müller) B. Øllg.
		<i>Huperzia</i> Bernh.	<i>Huperzia selago</i>
			<i>Huperzia reflexa</i>
			<i>Huperzia brongniartii</i>
			<i>Huperzia dichotoma</i>
			<i>Huperzia taxifolia</i>
			<i>Huperzia heterocarpon</i>
			<i>Huperzia linifolia</i>
			<i>Huperzia verticillata</i>
<i>Huperzia phlegmaria</i>			
<i>Huperzia saururus</i>			
<i>Huperzia brevifolia</i>			
<i>Phylloglossum</i> Kunze	-		

Sendo assim, no presente trabalho a classificação proposta por ØLLGAARD (1992) (Tabela 1) foi empregada, por ser um dos sistemas mais aceitos atualmente. Essa classificação leva em consideração os padrões de ramificação do caule, anatomia do córtex, distribuição das cavidades de mucilagem, padrões de diferenciação das folhas, morfologia dos esporofilos, dos esporângios e do gametófito, bem como do número de cromossomos.

3.2.1.3. Aspectos botânicos de Lycopodiaceae

O gênero *Huperzia* Bernh. é cosmopolita, formado por 300 espécies ocorrendo em ambientes tropicais, temperados, até subpolares e em regiões elevadas, com aproximadamente 150 espécies de ocorrência nos Neotrópicos (ØLLGAARD, 1992). A maior diversidade de espécies é encontrada nas florestas tropicais da América do Sul e na região dos Andes. Este gênero apresenta grande variação no padrão de crescimento, incluindo espécies de tamanho reduzido, plantas massivas e eretas, podendo ser terrestres ou epífitas pendentes (ØLLGAARD, 1990). *Lycopodium* L. é também considerado um gênero cosmopolita de aproximadamente 40 espécies descritas, sendo 8 delas presentes nos Neotrópicos. Nestes ambientes, estas espécies parecem estar restritas aos ambientes frios e às regiões de grande altitude, sendo mais tolerantes aos habitats mais secos do que as espécies de *Huperzia* (ØLLGAARD, 1992). As plantas do gênero *Lycopodiella* Holub. ocorrem em praticamente todas as regiões temperadas úmidas e tropicais do mundo, englobando cerca de 40 espécies, apresentando grande diversidade nas Américas, com 25 delas habitando os Neotrópicos (ØLLGAARD, 1992; KERBER e WINDISCH, 2005).

No estado do Rio Grande do Sul, ocorrem 9 espécies para o gênero *Huperzia*, sendo elas *Huperzia acerosa* (Sw.) Holub, *Huperzia christii* (Silveira) Holub., *Huperzia fontinaloides* (Spring) Trevis., *Huperzia flexibilis* (Fée) B. Øllg, *Huperzia heterocarpon* (Fée) Holub, *Huperzia hexasticha* B. Ollg. & P.G. Windisch, *Huperzia quadrifariata* (Bory) Rothn., *Huperzia mandiocana* (Underw. & F.E. Lloyd) B. Øllg e *Huperzia reflexa* (Lam.) Trevis. As três espécies que representam o gênero *Lycopodium* no estado são *Lycopodium clavatum* (L.), planta de hábito ereto e de crescimento em barrancos semi-sombreados, além de *Lycopodium thyoides* Humb. & Bonpl. ex Willd. e *Lycopodium assurgens* Fée., sendo esta última de ocorrência muito rara. Quanto ao gênero *Lycopodiella*, são cinco as espécies de ocorrência no estado: *Lycopodiella cernua* (L.) (sin.

Lycopodium cernuum), *L. carnosum* (Silveira) B. Øllg, *L. caroliniana* (L.) Pichi-Serm, *L. alopecuroides* (L.) Cranfill e *L. geometra* B. Øllg. & Wind. (KERBER e WINDISCH, 2005).

3.2.2. Aspectos químicos

A presença de alcalóides dentro do gênero *Lycopodium* foi pela primeira vez descrita em 1881 para a espécie *Lycopodium complanatum*, tendo sido então isolada uma base livre, de fórmula molecular $C_{16}H_{25}NO$ denominada licopodina. Durante os anos seguintes não houve avanços importantes sobre a química dos alcalóides deste gênero, sendo em 1938 três alcalóides isolados e caracterizados por Achmatowicz e Uzieblo a partir de *Lycopodium clavatum*, quando foi então designada a correta estrutura para esta molécula (MACLEAN, 1967).

Um grande avanço na investigação de espécies pertencentes a este gênero foi iniciado a partir da década de 1940, quando as plantas pertencentes à família Lycopodiaceae foram então caracterizadas como uma rica fonte de alcalóides (MACLEAN, 1967; ORHAN *et al.*, 2006). A partir de então, houve grandes avanços nos estudos químicos destas espécies, considerando a hipótese de que analogias presentes entre os alcalóides seriam indicativas de analogias botânicas, e esta informação seria base para uma classificação quimiotaxonômica do gênero (AYER *et al.*, 1990). Sendo assim, estes produtos também são considerados taxonomicamente importantes, uma vez que os gêneros de Lycopodiáceas são objeto de considerável controvérsia entre pesquisadores (GERARD e MACLEAN, 1986; MA *et al.*, 1998). Até o momento, estima-se que cerca de 200 diferentes alcalóides tenham sido isolados, encontrados em diferentes gêneros desta família (MA e GANG, 2004).

Apesar da existência de cerca de 500 espécies relacionadas aos gêneros *Lycopodium* L., *Huperzia* Bernh. e *Lycopodiella* Holub, somente poucas delas têm sido estudadas. Esse fato se deve a sua pouca abundância natural, ao seu

crescimento bastante lento e também por serem encontradas em habitats muito particulares (MA e GANG, 2004). No caso de *Huperzia* spp., estima-se que as plantas requerem cerca de 15 a 20 anos de crescimento, desde a germinação dos esporos até o período de maturação. Devido a essas características, várias dessas espécies correm perigo de extinção em várias regiões do mundo, como é o caso de *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis, de ocorrência na China e fonte de obtenção do alcalóide huperzina A, que praticamente desapareceu de alguns locais de crescimento previamente conhecidos (MA e GANG, 2004).

Os alcalóides presentes nas espécies dos gêneros *Lycopodium*, *Huperzia* e *Lycopodiella* receberam a denominação de alcalóides de *Lycopodium*, constituindo-se em um grupo próprio de produtos naturais. Eles possuem estruturas contendo um esqueleto de 16 carbonos (ou às vezes dímeros com 32 carbonos), e cerca de 200 compostos já foram isolados de 54 espécies distintas pertencentes a esta família (MA e GANG, 2004). O núcleo pode ser do tipo quinolizidínico ou piridina/ α -piridona, derivados do metabolismo do aminoácido lisina.

Seus núcleos pouco usuais conferem uma grande diversidade estrutural aos alcalóides de *Lycopodium*, de forma que podem ser consideradas moléculas interessantes dos pontos de vista biogenético, biológico e sintético (HEMSCHEIDT e SPENSER, 1996; KOBAYASHI e MORITA, 2005).

Em geral, estes alcalóides estão constituídos por 4 anéis de 6 membros, denominados A, B, C e D. Usualmente possuem 16 átomos de carbono, mas a perda de substituintes pode fazer com que apresentem um menor número. O sistema de

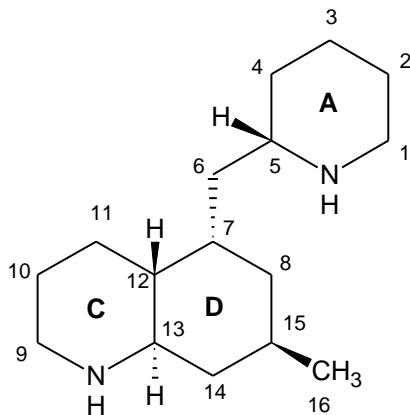


Figura 7: Estrutura do alcalóide flegmarina (13).

numeração empregado para estas estruturas está baseado na hipótese biogénica de CONROY (1960), onde duas unidades de 2-propilpiperidina se unem para formar flegmarina (**13**).

De acordo com esta rota biogénica proposta, os alcalóides de *Lycopodium* podem ser classificados em quatro diferentes tipos (AYER e TRIFONOV, 1994), todos agrupados a partir das características de seus núcleos, sendo eles: (i) grupo licopodano, (ii) grupo licodano, (iii) grupo faucetimano e (iv) grupo misto.

Os alcalóides do grupo licopodano são aqueles que têm como estrutura base o alcalóide licopodina (**14**), o primeiro isolado deste grupo a partir da espécie *Lycopodium clavatum* L. (ACHMATOWICZ e UZIEBLO, 1938 *apud* MACLEAN, 1967). Eles possuem quatro ciclos, sendo que os anéis C e B formam parte de um sistema quinolizidínico. É considerado o maior e mais amplamente distribuído grupo de alcalóides de *Lycopodium*.

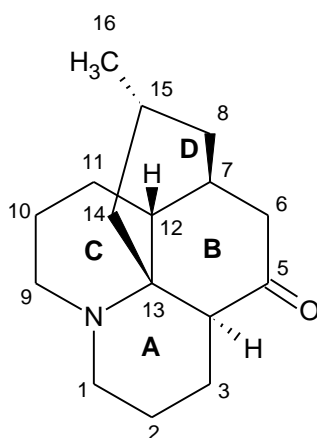


Figura 8: Estrutura do alcalóide licopodina (**14**).

O grupo licodano ou flabelidano reúne as características que contam com a licodina (**15**) como núcleo base. Primeiramente isolada de *Lycopodium annotinum* L. (ANET e EVES, 1958), ela possui também quatro anéis, estando os ciclos B, C e D na mesma disposição do grupo licopodano. No entanto, o anel A é rompido nesta estrutura para formar um anel do tipo piridina ou piridona. Outro exemplo importante a ser destacado desta classe de produtos é a huperzina A (**16**).

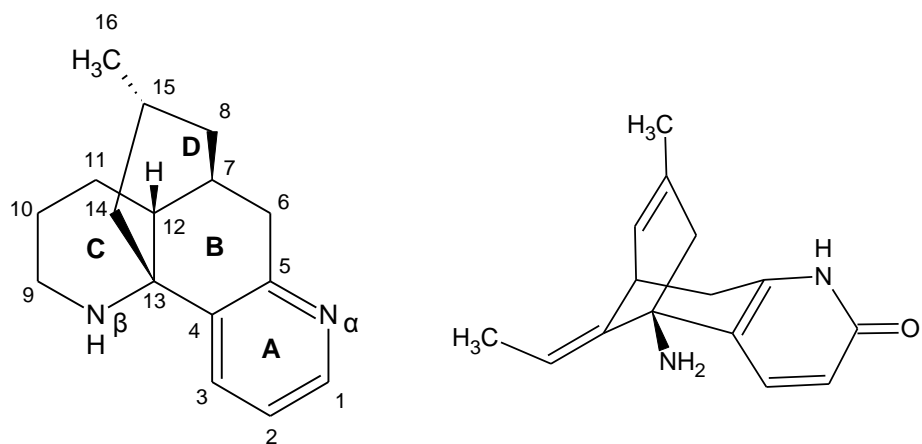


Figura 9: Estruturas dos alcalóides licodina (**15**) e huperzina A (**16**).

Os integrantes do grupo faucetimano podem ser considerados como produtos que possuem como precursor a licopodina e que surgem a partir da migração entre os carbonos C₄-C₁₃ a C₄-C₁₂ durante o seu processo de biossíntese, tendo como protótipo o alcalóide faucetidina (**17**).

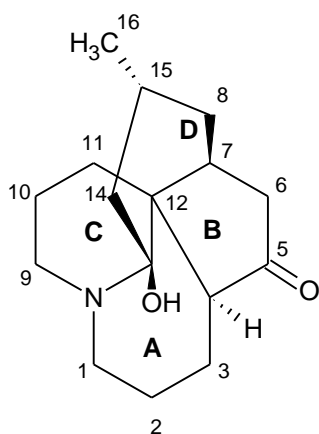


Figura 10: Estrutura do alcalóide faucetidina (**17**).

Finalmente, o grupo misto reúne os alcalóides de *Lycopodium* com grande diversidade estrutural e que não podem ser classificados nos grupos anteriores. Alguns dos exemplos que podem ser citados são a lucidina A (**18**), isolada de *Lycopodium lucidulum* e a senepodina A (**19**), isolada de *Lycopodium chinense* (TORI *et al.*, 2000; MORITA *et al.*, 2001).

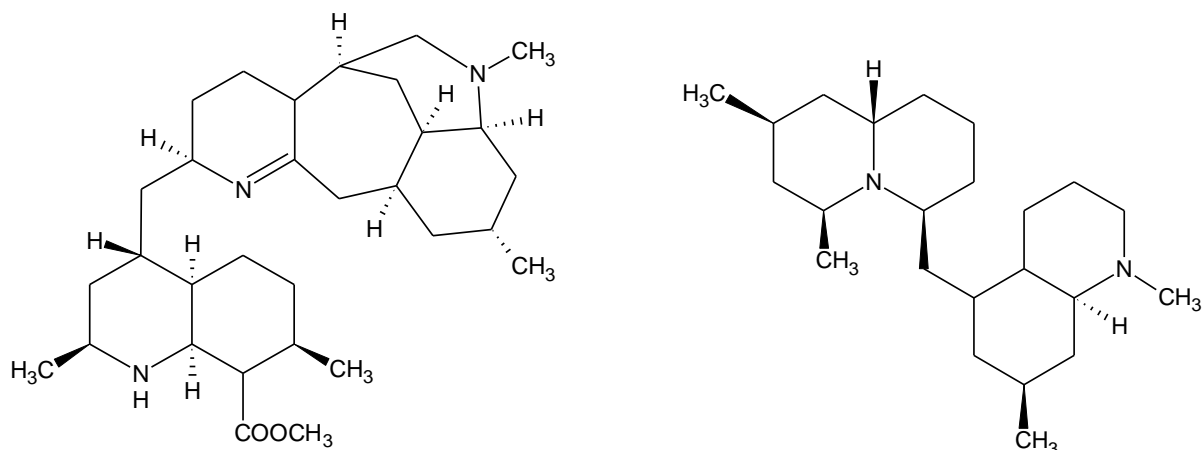


Figura 11: Estruturas dos alcalóides lucidina A (18) e senepodina A (19).

3.2.3. Aspectos biológicos

Espécies pertencentes à família Lycopodiaceae vêm sendo empregadas há vários séculos na Medicina Tradicional Chinesa, para o tratamento de contusões, inflamações, condições de estresse, esquizofrenia, miastenia grave e para envenenamento por organofosforados. Os alcalóides de *Lycopodium* têm demonstrados efeitos importantes no tratamento de doenças que afetam tanto o sistema cardiovascular como o neuromuscular, que pode estar relacionado a sua atividade anticolinesterásica. Além disso, têm demonstrado efeitos benéficos quanto à memória e aprendizado em modelos animais *in vivo*, com destaque para o alcalóide huperzina A (MA e GANG, 2004).

Outra planta com estudos relatados na literatura pertencente a este gênero é *Huperzia saururus* (Lam.) Trevis, empregada popularmente na Argentina como afrodisíaco e para problemas de memória, sendo rica em alcalóides, como sauroxina, 6-hidróxi licopodina, *N*-acetil licopodina, licopodina, licodina, *N*-metil licodina e clavolonina (ORTEGA *et al.*, 2004). Um extrato de alcalóides purificado obtido desta planta demonstrou ser dotado de seletiva e potente atividade anticolinesterásica *in vitro* para a AChE (IC₅₀= 0,58 µg/mL), além de proporcionar um aumento na atividade sináptica em hipocampo de ratos, conforme verificado

através de experimentos eletrofisiológicos e de promover um aumento na retenção da memória em ratos (ORTEGA *et al.*, 2004; ORTEGA *et al.*, 2006; VALLEJO *et al.*, 2007). Também foi verificado que sauroína, alcalóide majoritário do extrato de alcalóides desta espécie, significativamente melhorou a transmissão sináptica através de ensaios de LTP, bem como o aprendizado e a memória em ensaios *in vivo* (VALLEJO *et al.* 2009).

Na Medicina Tradicional Chinesa, os esporos de diferentes espécies de *Lycopodium*, principalmente *Lycopodium clavatum* L., são empregados como pó secante para ferimentos e eczemas (BLASCHEK *et al.*, 1998). Além disso, a decocção de algumas espécies é usada popularmente para diversos fins, como *Lycopodiella cernua*, para artrite, dores e espasmos, *Lycopodium complanatum*, como analgésico e antirreumático e *Lycopodium obscurum* para artrite, dismenorréia e como diurético (DUKE e AYENSU, 1985).

Lycopodium clavatum L., uma das espécies escolhidas no presente trabalho, devido à sua relativa abundância, é tradicionalmente empregada na América do Sul como carminativo, laxante, diurético e afrodisíaco (SCHAUENBERG e PARIS, 1972; NUÑEZ e CANTERO, 2000; HURREL e DE LA SOTA, 1996). Na China, a decocção da planta inteira também é utilizada para desordens mentais (DUKE e AYENSU, 1985). Além disso, sua composição em alcalóides é conhecida, tendo a licopodina como substância majoritária (84,5%), além de diidroliscopodina e licodina (ORHAN *et al.*, 2006). Possui relatada atividade anticolinesterásica *in vitro*, efeito este atribuído ao triterpeno α -onocerina (ORHAN *et al.*, 2003). Entretanto, estudos posteriores de fracionamento bioguiado contestaram tal afirmação e atribuíram tal atividade a outro triterpeno, o licoclavatul, este de composição minoritária (ROLLINGER *et al.*, 2005). Além disso, aos extratos de alcalóides de *Lycopodium clavatum* foram atribuídas atividades antiinflamatória, através do ensaio de aumento na permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético (ORHAN *et al.*, 2006), além de atividades antibacteriana, antioxidante frente ao DPPH, anti-viral e anti-fúngica (ORHAN *et al.*, 2007).

Estudos fitoquímicos também já foram conduzidos anteriormente com a espécie *Lycopodium thyoides* H. B. Willd, tendo sido identificados os alcalóides licopodina, acetildiidrolicopodina, acetilfaucetina, faucetina, além de outros produtos ainda não elucidados (AYER & DIKKO, 1974). Outros estudos relataram a presença de traços de flabelidina e de outros 3 compostos nitrogenados não identificados (BRAEKMAN *et al.*, 1974). Contudo, estudos farmacológicos com esta planta ainda não foram conduzidos, mas sabe-se que infusões da planta inteira são empregadas pelos índios Quechuas do Equador para tratar problemas de parto e para crianças com problemas de locomoção, a fim de se aumentar sua resistência ao trabalho (ELLEMAN, 1990; NAVARRETE *et al.*, 2006).

Os efeitos atribuídos pela medicina tradicional para a maioria destas espécies são obtidos através de relatos de uso popular, de forma que não há relatos científicos que sustentem seus efeitos.

3.3. Huperzina A

Nos últimos anos, grandes avanços têm sido relatados na literatura sobre a identificação e o estudo de atividades farmacológicas de novos alcalóides de espécies de *Huperzia* e de *Lycopodium*, principalmente depois do isolamento e dos relatos de potente efeito anticolinesterásico para o alcalóide huperzina A, encontrado em *Huperzia serrata* (Qian Ceng Ta). Este fato motivou a pesquisa e a busca de novos alcalóides anticolinesterásicos nesta família de plantas, potencialmente úteis no tratamento do mal de Alzheimer (LIU *et al.*, 1986).

A planta *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev., empregada há séculos na medicina tradicional chinesa para o tratamento de febres, inflamações e esquizofrenia, sendo fonte de vários alcalóides sesquiterpênicos inibidores da acetilcolinesterase, denominados huperzinas (CHIU *et al.*, 2007; CORDELL *et al.*, 2001). Os alcalóides, que representam 0,2 % de seu conteúdo total, incluem as huperzinas A e B, serratina, serratinina, licodolina e licopodina (LIU *et al.*, 1986).

Além disso, este vegetal contém triterpenos, que também podem desempenhar um papel farmacológico no uso tradicional desta planta.

Este alcalóide é um inibidor potente, reversível e altamente específico para a AChE, avaliado através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, cuja potência *in vitro* é igual ou superior à da fisostigmina, galantamina, donepezil e tacrina, mas com menos efeitos colaterais ($IC_{50} = 0,082 \mu M$) (ZANGARA, 2003). A inibição reversível para a enzima AChE parece estar envolvida com a capacidade da molécula de huperzina A ligar-se aos resíduos aromáticos do sítio ativo da enzima, conforme observado através de estudos de análise estrutural e de modelagem molecular (CHIU *et al.*, 2007).

Ensaio biológicos *in vivo* com ratos verificaram que este alcalóide produziu uma maior inibição da AChE quando comparada com donepezil, rivastigmina e tacrina, indicando uma maior biodisponibilidade e facilidade em cruzar a barreira hematoencefálica (LIANG e TANG, 2004). Além disso, a huperzina A possui menor potência inibitória para a enzima butirilcolinesterase presente no soro humano, de forma que esta seletividade pela AChE pode sugerir um perfil de efeitos adversos menos significativos (SCOTT e GAO, 2000). O seu mecanismo de ação também tem sido extensivamente estudado e foi verificado que este alcalóide tem ação antagonista *in vitro* para receptores NMDA, protegendo os neurônios da excitotoxicidade induzida pelo glutamato (VED *et al.*, 1997) e também promovendo melhoras cognitivas para os pacientes que sofrem do mal de Alzheimer (CHIU *et al.*, 2007). Também se verificou em estudos clínicos que a huperzina A promove uma diminuição nos danos provocados pelos radicais livres em pacientes tratados com esta substância (XU *et al.*, 1999), com redução dos efeitos deletérios induzidos pelo H_2O_2 , como geração de malonodialdeído e atenuação na queda das atividades das enzimas catalase e glutathione peroxidase (XIAO *et al.*, 1999). Em ensaios *in vivo*, o alcalóide reduziu os efeitos da disfunção cognitiva causada pela infusão intracerebroventricular do peptídeo $A\beta$ em ratos (WANG *et al.*, 2001). Empregando-se modelos de isquemia, a huperzina A conferiu proteção a células expostas à

privação de oxigênio e glicose (ZHOU *et al.*, 2001a), além de proteção histopatológica e comportamental contra isquemia global transitória em roedores, atenuando os déficits de memória produzidos e diminuindo a morte celular causada na região CA1 hipocampal (ZHOU *et al.*, 2001b).

Estudos clínicos realizados com huperzina A demonstraram a eficácia deste alcalóide em reverter distúrbios associados a problemas de memória em pacientes idosos e com a doença de Alzheimer (MA *et al.*, 2006). Grande parte destes estudos foi conduzida na China, e estima-se que cerca de 100.000 pessoas tenham sido tratadas com huperzina A, indicando que esta substância seja efetiva e segura para o tratamento de disfunções cognitivas (CHIU e ZHANG, 2000). Dados farmacocinéticos indicam que este alcalóide possui rápida absorção quando administrado por via oral, sendo transportado até o fígado, onde sofre o metabolismo de primeira passagem. Tanto a substância como os seus metabólitos distribuem-se amplamente pelo organismo com rápido acesso ao cérebro, sendo o seu pico plasmático alcançado em aproximadamente 80 minutos (QUIAN *et al.*, 1995 *apud* CHIU *et al.*, 2007). As reações adversas atribuídas à huperzina A são primariamente colinérgicas, incluindo náuseas, diarreia e sudorese, efeitos estes menos pronunciados quando comparados aos fármacos tacrina e fisostigmina. Além disso, não foi evidenciado nenhum indício de hepatotoxicidade e o alcalóide demonstrou ser seguro e bem tolerado no organismo de voluntários idosos (ZANGARA, 2003).

Nos Estados Unidos, esta substância ainda não foi aprovada pela agência FDA (*Food and Drug Administration*) para comercialização como medicamento (ZANGARA, 2003), sendo vendido apenas como suplemento alimentar com indicações para perda de memória (CHIU *et al.*, 2007).

Estudos comparativos demonstraram que huperzina A é o alcalóide de maior potência anticolinesterásica, seguido de huperzina C e de 6 β -hidróxi huperzina A. Também possuem considerável atividade os alcalóides huperzinina, huperzina B e flegmariunina B (LIU e HUANG, 1994; WU e GU, 2006). Além disso, foi

demonstrado experimentalmente que o isômero (-)-huperzina A, naturalmente encontrado na planta, possui uma capacidade 49 vezes maior de inibir a enzima AChE quando comparado ao isômero (+)-huperzina A, inclusive com maior seletividade para a enzima butirilcolinesterase (WANG *et al.*, 2006b).

Baseado nos resultados positivos para este alcalóide, uma série de compostos híbridos tacrina-huperzina A, chamados de huprinas, foram sintetizados e sua atividade farmacológica *in vitro* foi determinada (CAMPS *et al.*, 1999). Os compostos (±)-huprina Y e (±)-huprina Z possuem uma maior capacidade inibitória para a enzima acetilcolinesterase do que tacrina e (-)-huperzina A isoladamente, sendo reversíveis e mais específicos para a AChE humana, resultados comprovados através de estudos *in vitro* e *ex vivo* em camundongos (ALCALÁ *et al.*, 2003).

O alcalóide huperzina A não é encontrado apenas em *Huperzia serrata*, mas também em outras espécies de *Huperzia* sp. com próxima relação taxonômica, como *Lycopodium* sp. (MA *et al.*, 1998). A distribuição da família Lycopodiaceae é global, mas suas plantas são encontradas com relativa abundância nos habitats tropicais do continente americano. Na China, país onde o uso tradicional de plantas desta família ocorre há vários séculos, sua distribuição é bem menos abundante e é apenas encontrada em habitats bastante específicos (MA *et al.*, 2006). Além disso, *Huperzia serrata* corre um sério risco de extinção devido a intensas coletas realizadas nos últimos anos, motivadas pelo interesse científico despertado através dos importantes resultados científicos apresentados para o tratamento da doença de Alzheimer. Sendo assim, é de grande relevância a busca de novas fontes naturais de huperzina A, assim como esforços para a síntese de análogos deste alcalóide, assim como novos compostos inibidores da enzima acetilcolinesterase.

4. MANUSCRITO I

Submetido ao periódico **Journal of Pharmacy and Pharmacology**

ALKALOIDAL PROFILING AND ANTICHOLINESTERASE ACTIVITY OF
SOUTH AMERICAN LYCOPODIACEAE SPECIES

Eduardo Luis Konrath^{a,1}, María Gabriela Ortega^{b,c,1}, Sérgio A. de Loreto
Bordignon^d, Miriam Anders Apel^a, Amélia Teresinha Henriques^a, José Luis
Cabrera^{b,c,*}

^aPrograma de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bFarmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

^cInstituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET), Córdoba,
Argentina.

^dCentro Universitário La Salle, Canoas, RS, Brazil.

* Correspondence: Prof. José L. Cabrera, Departamento de Farmacia, Facultad de
Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria 5000,
Córdoba, Argentina. E-mail: jcabrera@dqo.fcq.unc.edu.ar.

¹ ELK and MGO contributed equally to this publication.

Abstract

Objectives: The anticholinesterase effects and chemical profiling of alkaloidal extracts of five Lycopodiaceae species from Brazil were investigated.

Methods: In this work the alkaloids extracts of four *Huperzia* and one *Lycopodiella* species with habitat in Brazil were tested for their *in vitro* anticholinesterase activities, using erythrocyte membranes and human serum as sources of acetyl and butyrylcholinesterase, respectively. Moreover, the chemical identification of each alkaloid present in the bioactive extracts was performed by GC-MS.

Key findings: The results show a potent acetylcholinesterase inhibition for *Huperzia reflexa* (IC₅₀ value = 0.11 µg/ml), followed by *Huperzia quadrifariata* (IC₅₀ value = 2.0 µg/ml), *Huperzia acerosa* (IC₅₀ value = 5.5 µg/ml), *Huperzia heterocarpon* (IC₅₀ value = 25.6 µg/ml) and *Lycopodiella cernua* (IC₅₀ value = 42.6 µg/ml) alkaloids extracts. A lower inhibition of butyrylcholinesterase was observed for all extracts with the exception of *H. heterocarpon* (IC₅₀ value = 8.3 µg/ml), whose alkaloids extract shows a selectivity for the pseudocholinesterase. Also, the chromatographic analysis revealed the presence of a number of *Lycopodium* alkaloids belonging to lycopodane, flabellidane and cernuane groups.

Conclusions: All extracts demonstrated a potent inhibition for acetylcholinesterase enzyme, with emphasis for *H. reflexa* and *H. quadrifariata*. Further investigations are in progress in order to discover which compound/s is/are responsible for the anticholinesterase activity.

Keywords: *Huperzia acerosa*; *Huperzia heterocarpon*; *Huperzia quadrifariata*; *Huperzia reflexa*; *Lycopodiella cernua*; Anticholinesterase activity.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that has emerged as one of the major public health problems in the elderly, resulting in impaired memory and behavior, as well as loss of intellectual and social abilities.^[1,2] The main treatment strategies available have been based on the cholinergic hypothesis, which postulates that memory impairments in AD patients result from a deficit of acetylcholine (ACh) levels in the brain. As the cholinergic system has been shown as the predominantly affected neurotransmitter system in this disease,^[3] the most effective available pharmacotherapy for AD is the use of acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, which indirectly elevates the acetylcholine concentrations in the brain.^[4,5] Therefore, the search for new AChE inhibitors with higher efficacy and fewer side effects has been extensively achieved, particularly those derived from natural products.^[6]

Lycopodium alkaloids represent a structurally related group of secondary metabolites obtained from plants of the genus *Lycopodiella*, *Lycopodium* and *Huperzia* (Lycopodiaceae), many of them of interest from chemical and pharmacological points of view.^[7] In recent years, this family has been extensively studied as a source of new and potent inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), since the isolation of huperzines A and B from the Chinese medicinal plant *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.^[8] Extensive studies on the chemical constituents found in *Lycopodium* plants have resulted in the isolation of many new alkaloids with diverse structures, and huperzine A has so far been the most well known *Lycopodium* alkaloid, considered to be a highly potent, reversible and selective inhibitor for AChE enzyme when compared with inhibitors currently used in the therapeutics.^[9]

Results of the previous studies performed by our group with alkaloids extracts from *Huperzia saururus* (Lam.) Trevis., a plant used in the Argentinean folk medicine as an aphrodisiac and memory improver, demonstrated a strong and selective

inhibition for the enzyme AChE.^[10] Recently, sauroine, the main alkaloid found in the alkaloidal extract of *H. saururus*, was proved to display an improvement on the memory retention and learning in rats,^[11] which may corroborate some previous findings related to the alkaloid extract, such as an increase on hippocampal plasticity^[12] and in the memory retention in rats.^[13] These interesting results prompt us to perform further investigations in alkaloid extracts from Lycopodiaceae species found in Brazil, regarding the acetyl and butyrylcholinesterase inhibition and chemical composition, in order to screen plant extracts that could become new candidates for the subsequent isolation of compounds with cholinesterase inhibitor activity.

In the state of Rio Grande do Sul, Brazil, the genus *Huperzia* is represented by nine species, namely: *H. acerosa* (Sw.) Holub, *H. christii* (Silveira) Holub., *H. fontinaloides* (Spring) Trevis., *H. flexibilis* (Fée) B. Øllg, *H. heterocarpon* (Fée) Holub, *H. hexasticha* B. Ollg. & P.G. Windisch, *H. quadrifariata* (Bory) Rothn., *H. mandiocana* (Underw. & F.E. Lloyd) B. Øllg and *H. reflexa* (Lam.) Trevis. Also, *Lycopodiella* is represented by five species: *L. alopecuroides* (L.) Cranfill, *L. carnosa* (Silveira) B. Øllg., *L. caroliniana* (L.) Pic. Serm., *L. cernua* (L.) Pic Serm. and *L. geometra* B. Øllg. & P. G. Windisch.^[14,15] Among all these species, previous reports on literature for the presence of alkaloids have been described only for *Lycopodiella alopecuroides* (syn. *Lycopodium alopecuroides* L.),^[16] *Lycopodiella caroliniana* (syn. *Lycopodium carolinianum*)^[17] and *Lycopodiella cernua* (syn. *Lycopodium cernuum*).^[18] The latter also has reported medicinal uses for spasms, rheumatism and as an anti-inflammatory agent.^[19,20] The chemical content of the plant collected in Japan has been already described as composed by cernuane, phlegmarane and quinolizidine-type alkaloids.^[21]

This way, the aim of this work was to examine the inhibitory effects on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase for *L. cernua*, *H. acerosa*, *H. heterocarpon*, *H. quadrifariata* and *H. reflexa*. To our knowledge, no previous reports regarding the cholinesterase activity or the chemical content for these species have been reported so far.

Materials and methods

Chemicals

Acetylthiocholine iodide, 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) and butyrylthiocholine chloride were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). Physostigmine salicylate and all other reagents and organic solvents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). 50 mM sodium phosphate pH 7.2 was used as a buffer throughout the experiment unless otherwise stated.

Plant Material

Whole plants of *Huperzia acerosa* (Sw.) Holub (HAS 47477), *Huperzia heterocarpon* (Fée) Holub (HAS 47478) and *Huperzia quadrifariata* (Bory) Rothm. (HAS 47475) were collected in the city of Riozinho (2007), *Huperzia reflexa* (Lam.) Trevis. (HAS 45877) in Barra do Ouro (2008) and *Lycopodiella cernua* (L.) Pic Serm. (HAS 47473) in Santo Antônio da Patrulha (2008), all in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. They were identified by Dr Sérgio L. Bordignon, Fundação La Salle, and for each plant a voucher specimen has been deposited in the herbarium (HAS) of the Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Brazil, as indicated.

Preparation of the extracts

Dried and crushed aerial parts of *H. quadrifariata* (580 g), *L. cernua* (396 g) *H. reflexa* (92 g), *H. heterocarpon* (23 g) and *H. acerosa* (14 g) were separately defatted with *n*-hexane and then extracted with ethanol by using a Soxhlet extractor. After exhaustive extraction, the ethanolic extracts were filtered and concentrated under reduced pressure. The residues were solubilized with 5% aqueous HCl and then washed three times each with CH₂Cl₂. The acidic H₂O layer was then basified with NH₄OH (pH 11) in order to produce free bases, and then extracted with CH₂Cl₂. The resulting organic phases were evaporated to dryness and lyophilized, to yield the powdered crude total alkaloid extracts: *H. quadrifariata* extract (E_{HQ}):

2.26 g, (0.40%); *L. cernua* (E_{LC}): 0.67 g, (0.17%); *H. reflexa* (E_{HR}): 0.64 g, (0.69%); *H. heterocarpon* (E_{HH}): 0.055 g, (0.24%); *H. acerosa* (E_{HA}): 0.054 g, (0.38%).

Anticholinesterase activity assays

The assessment of acetylcholinesterase inhibition was carried out using basically the colorimetric method first described by Ellman *et al.* (1961)^[22] as modified by Ortega *et al.* (2004),^[10] with the use of acetylthiocholine iodide as substrate and erythrocyte membranes as enzyme source. A typical run performed in order to calculate the activity of the obtained acetylcholinesterase consisted of 750 μ L of phosphate buffer 50 mM of pH 7.2 containing 0.25 mM of 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (buffer + DTNB), 100 μ L of distilled water, 5 μ L of enzyme obtained from human blood, and 25 μ L of acetylthiocholine iodide 58 mM ($V_f = 880 \mu$ L). The reactants were placed in a microcuvette. Absorbance was measured using a spectrophotometer at 405 nm (Spectronic Genesys 5), and the reading was repeated during 3 min at intervals of 30 s to verify the linearity of the reaction. The enzymatic activity was calculated using the absorption coefficient 23460 U/L and the resultant value was considered 100% activity. All experiments were performed at 25°C.

In a similar way, different crude alkaloid extracts (E) of *Huperzia* species were evaluated. In this assay and for each determination, a quantity of E solutions (1 mg/mL each prepared with 1% DMSO in buffer) was added to the buffer + DTNB solution, together with distilled water and the enzyme preparation. The quantity of solution of E added was determined, taking into account that the final concentration corresponds to each one of the different assayed concentrations ranging between 100 and 0.1 μ g/ml (lower concentrations for the most active extracts). Physostigmine salicylate (Merck, Germany) was employed as reference inhibitor for comparison of the anticholinesterase activity.

For the butyrylcholinesterase inhibition measurement, butyrylthiocholine chloride 54.5 mM was used as substrate and serum as enzyme source. For this purpose, blood obtained by venipuncture from human healthy volunteers was centrifuged for

serum separation. Measurement of the enzymatic activity and inhibitory capacity of the different alkaloid extracts was performed in a similar way to that described previously, using 22760 U/L as absorption coefficient. Again, physostigmine salicylate was used as reference inhibitor.

Alkaloid analysis by GC-MS

In order to identify the components present in the extracts, they were submitted to GC-MS.^[10] The alkaloid analysis was performed using a Perkin Elmer Qmass-910 apparatus, and a capillary column SE 30, 30m in length. The injection volume was 0.5 mL with He as carrier, at flow rate 1 mL/min. Temperature program: 140 °C (3 min), 140–250 °C at 5 °C/min, 250 °C (5 min), 250–280 °C at 5 °C/min, 280 °C (5 min). The temperatures of injector, interface and ion source were 300 °C, 280 °C, and 280 °C, respectively and the ionization energy was 70 eV. The individual alkaloid identifications were made examining a reference library of mass spectra obtained from authentic samples of our own *Lycopodium* alkaloids collection and also by comparing breakdown patterns with those found in the literature.^[10,18,23-28]

Statistical Analysis

All assays were independently performed in triplicate, and results were expressed as means \pm S.E.M. (standard error of the mean). The IC₅₀ values were estimated using non-linear fitting of concentration-response data using the GraFit 6.0 software in a PC compatible computer.

Results and discussion

In our ongoing search for new bioactive *Lycopodium* alkaloids, we have studied in the present work five Brazilian species belonging to Lycopodiaceae family: *Huperzia acerosa*, *H. heterocarpon*, *H. quadrifariata*, *H. reflexa* and *Lycopodiella cernua*, whose alkaloids extracts were evaluated regarding the acetylcholinesterase and the butyrylcholinesterase inhibition, together with their chemical content.

Initially, the enzymatic inhibition was evaluated at the concentrations of 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$ for each E (Table 1), in order to verify their potency and establish further dilutions to the estimation of IC_{50} values. Next, these values were estimated for those crude alkaloids extracts that demonstrated an important inhibition (about 70%) at 100 $\mu\text{g/mL}$ for both enzymes (Table 2), and the curves of concentration-response effect for them are shown in Figs. 1 and 2.

In this way, the IC_{50} values for the alkaloidal extracts of the five species on anticholinesterase inhibition were: E_{HR} 0.11 $\mu\text{g/mL}$, E_{HQ} 2.0 $\mu\text{g/mL}$, E_{HA} 5.5 $\mu\text{g/mL}$, E_{HH} 25.6 $\mu\text{g/mL}$, E_{LC} 42.6 $\mu\text{g/mL}$ and for physostigmine salicylate, 0.08 $\mu\text{g/mL}$. Regarding the inhibition on AChE, *Huperzia reflexa* extract was the most potent, followed by *H. quadrifariata*, *H. acerosa*, *H. heterocarpon* and *L. cernua*. The IC_{50} value for the E_{HR} is considered to be 1.5 times higher than the reference inhibitor and 5 times lower than the extract of *H. saururus* (IC_{50} value = 0.58 $\mu\text{g/mL}$), which also displayed an interesting effect on acetylcholinesterase activity.^[10]

On the other hand, *H. heterocarpon*, *H. quadrifariata* and *H. reflexa* alkaloidal extracts showed an important effect on butyrylcholinesterase which also allowed the estimation of IC_{50} values. A major specificity for the enzyme acetylcholinesterase was observed for E_{HQ} (IC_{50} value = 5.5 $\mu\text{g/mL}$) and E_{HR} (IC_{50} value = 5.6 $\mu\text{g/mL}$), whose activities are very similar to the reference inhibitor (IC_{50} of physostigmine salicylate = 5.01 $\mu\text{g/mL}$), with the exception of E_{HH} , which displayed a better inhibition against BuChE when compared to AChE, with an IC_{50} value of 8.3 $\mu\text{g/mL}$.

A preliminary analysis of the alkaloidal extracts by GC-MS indicated the presence of a number of *Lycopodium* alkaloids, already described for other species (Fig. 3). The chromatographic profile obtained for *H. reflexa*, indicates the presence of lycodine, anhydrolycodoline, lycodoline, 6-hydroxylycopodine, α -obscurine/sauroxine, des-*N*-methyl- α -obscurine, together with lycopodine and an unidentified compound of m/z 245, with typical pattern fragmentation for an alkaloid which belongs to lycopodane group. The alkaloidal extract of *H. acerosa*, showed three alkaloids identified as lycopodine, lycodine and flabelline, and *H.*

quadrifariata revealed the presence of lycopodine, 6-hydroxylycopodine, lycodoline, clavolonine, acetylclavolonine, sauroine and a alkaloid still not elucidated (m/z 272), recognized as belonging to flabellidane group. *L. cernua* alkaloidal extract indicated only two compounds, identified as cernuine and lycocernuine,^[18] and *H. heterocarpon*, showed three alkaloids but none could be identified up to now, although the fragmentation pattern correspond to *Lycopodium* alkaloids belonging to lycopodane (m/z 245, 261) and flabellidane (m/z 272) classes.

The chemical examination of the five species studied did not reveal the presence of *Lycopodium* alkaloids with known inhibitory effect for AChE, like huperzine A (M^+ 242), huperzine B (M^+ 256), *N*-de-methylhuperzine (M^+ 256), huperzine C (M^+ 242), huperzine (M^+ 270), carinatamine A (M^+ 258), lycoperine A (M^+ 495) and sieboldine A (M^+ 293).^[8,29-32]

While *H. quadrifariata* and *H. heterocarpon* alkaloidal extracts showed an unidentified alkaloid of M^+ 272 belonging to lycodine class, it cannot be concluded with data obtained so far, it can be carinatamine B (M^+ 272), a *Lycopodium* alkaloid with anticholinesterase activity obtained from *Lycopodium sieboldii* Miq.^[32]

The unidentified alkaloids from E_{HQ} and E_{HH} showed a typical fragmentation pattern for *Lycopodium* alkaloids,^[23] but they do not correspond conclusively with the reported spectra of any known alkaloid from this group. Therefore, the isolation of these molecules, together with their elucidation by other spectroscopic methods are in progress.

Conclusion

In this study we have investigated the biological potential for alkaloidal extracts of five Brazilian Lycopodiaceae species regarding the anticholinesterase activity. This way, an important anticholinesterase activity in the alkaloidal extracts of *H. reflexa* and *H. quadrifariata* was determined. On BuChE inhibition, *H. reflexa* and *H.*

quadrifariata showed again an important activity compared to reference inhibitor, but the cholinesterase specificity was on true acetylcholinesterase. *H. acerosa* also displayed an interesting effect on AChE inhibition, although not so potent as compared to BuChE. On the other hand, *H. heterocarpon* showed a better inhibition for the butyrylcholinesterase compared to acetylcholinesterase inhibition, which is also of relevance, once BuChE has been targeted as a new approach to intercede the progression of AD in the late stage, due to the fact that this enzyme represents the predominant cholinesterase in brain, compared to AChE.^[33]

To our knowledge, this is the first report demonstrating biological properties for these *Huperzia* species, and they are associated with the *Lycopodium* alkaloids present in the extracts. Among the studied species, only *L. cernua* has medicinal uses reported in literature;^[19,20] its chemical content has been previously studied^[18] and we have found only two alkaloids already described for this species (cernuine and lycocernuine). However, reports on anticholinesterasic activities were not described up to this moment on literature.

In view of the significant inhibitory effect exhibited by *H. reflexa*, *H. quadrifariata* and *H. acerosa*, the fractionation of the extracts is being conducted in our laboratory in order to obtain their active principles. Further investigations of the chemical structures of the active principles and their pharmacological evaluation are necessary to determine which alkaloid/s is/are responsible for the above-demonstrated biological effects.

Acknowledgements and funding

This work was supported in part by the Brazilian funding agencies CAPES, CNPq and by the Argentinean agencies SECyT-UNC N° 069/08 and FONCyT: Préstamo BID PICT N° 06-0120. E.L.K. is a doctoral fellow of CAPES, M.G.O. and J.L.C. are members of the Research Career of CONICET. The authors wish to thank Dr. Rosana M. Sena (Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul) for identification of the species under study.

References

1. Cummings JL. Treatment of Alzheimer's disease: current and future therapeutic approaches. *Rev Neurol Dis* 2004; 1: 60-69.
2. Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 2004; 430: 631-639.
3. Giacobini E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2003; 28: 512-522.
4. Cummings JL. The role of cholinergic agents in the management of behavioural disturbances in Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmac* 2000; 3: 21-29.
5. Martinez A, Castro A. Novel cholinesterase inhibitors as future effective drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15: 1-12.
6. Perry EK *et al.* Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to Phytotherapy. *J. Pharm Pharmacol* 1999; 51: 527- 534.
7. Ma X, Gang DR. The *Lycopodium* alkaloids. *Nat Prod Rep* 2004; 21: 752-772.
8. Liu JS *et al.* The structure of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Can J Chem* 1986; 64: 837-839.
9. Ma X *et al.* Huperzine A from *Huperzia* species- an ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol* 2007; 113: 15-34.
10. Ortega MG *et al.* Anticholinesterase activity in alkaloids extract of *Huperzia saururus*. *Phytomedicine* 2004; 11: 539-543.
11. Vallejo MG *et al.* Sauroine, an alkaloid from *Huperzia saururus* with activity in Wistar rats in electrophysiological and behavioral assays related to memory retention. *J Nat Prod* 2009; 72: 156-158.

12. Ortega MG *et al.* *Huperzia saururus*, activity on synaptic transmission in the hippocampus. *J Ethnopharmacol* 2006; 104: 374-378.
13. Vallejo MG *et al.* *Huperzia saururus* increases memory retention in rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 111: 685-687.
14. Lorscheitter ML *et al.* Pteridophyte spores of Rio Grande do Sul flora, Brazil, part I. *Palaeontographica Abt B* 1998; 246: 1-113.
15. Kerber KTB, Windisch PG. Sinopse das espécies de Lycopodiaceae (Pteridophyta) ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul. In: *Resumos do 56° Congresso Nacional de Botânica*. Curitiba, Brazil, 2005.
16. Ayer W *et al.* The alkaloids of *Lycopodium alopecuroides* L. *Can J Chem* 1968; 46: 15-20.
17. Miller N *et al.* Some constituents from *Lycopodium carolinianum* L. var. affine. Carolinianine, a new *Lycopodium* alkaloid. *Bull Soc Chim Belg* 1971; 80: 629-638.
18. Ayer W *et al.* The alkaloids of *Lycopodium cernuum* L. II. The stereochemistry of cernuine and lycocernuine. *Can J Chem* 1967; 45: 445-450.
19. Duke JA, Ayensu ES. *Medicinal plants of China*, vol II. Michigan: Reference Publications Inc., 1985.
20. Barboza GE *et al.* Medicinal plants: a general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine flora. *Kurtziana* 2009; 34 (1-2): 7-365.
21. Morita H *et al.* New phlegmarane-type, cernuane-type and quinolizidine alkaloids from two species of *Lycopodium*. *Tetrahedron* 2004; 60: 7015-7023.
22. Ellman GL *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
23. MacLean DB. *Lycopodium* alkaloids XIII. Mass spectra of representative alkaloids. *Can J Chem* 1963; 41: 2654-2670.

24. Alam SN *et al.* *Lycopodium* alkaloids XV Structure and mass spectra of some minor alkaloids of *Lycopodium flabelliforme*. *Can J Chem* 1964; 42: 2456–2466.
25. Ayer W *et al.* *Lycopodium* alkaloids. Sauroxine. *Tetrahedron* 1965; 21: 2169–2172.
26. MacLean DB. *Lycopodium* alkaloids. In: Brossi A. Eds. *The Alkaloids*. New York: Academic Press, 1985: 241-298.
27. Sun CM *et al.* Revised stereochemistry of so-called isoselagine and spectroscopic analysis of 6 α -hydroxylycopodine from *Lycopodium serratum* var. *longipetiolatum*. *Planta Med* 1993; 59: 467–471.
28. Ortega MG *et al.* Sauroine – a novel *Lycopodium* alkaloid from *Huperzia saururus*. *Tetrahedron Lett* 2004; 45: 7003-7005.
29. Shen YC, Chen CH. Alkaloids from *Lycopodium casuarinoides*. *J Nat Prod* 1994; 57: 824-826.
30. Hirasawa Y *et al.* Sieboldine A, a novel tetracyclic alkaloid from *Lycopodium sieboldii*, inhibiting acetylcholinesterase. *Org Lett* 2003; 5: 3991-3993.
31. Hirasawa Y *et al.* Lycoperine A, a novel C₂₇N₃-type pentacyclic alkaloid from *Lycopodium hamiltonii*, inhibiting acetylcholinesterase. *Org Lett* 2006; 8: 123-126.
32. Choo CY *et al.* Carinatumins A-C, new alkaloids from *Lycopodium carinatum* inhibiting acetylcholinesterase. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 1703-1707.
33. Ballard CG *et al.* Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res* 2005; 2: 307-318.

Table 1

Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities by alkaloidal extracts of the analyzed species at the concentrations of 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$. The inhibition efficacy was expressed as a percentage of enzyme activity inhibited as compared to the control value. Data are shown as means \pm S.E.M. of nine independent experiments.

Alkaloidal extract	AChE inhibition (%)		BuChE inhibition (%)	
	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
<i>Huperzia acerosa</i>	68.8 \pm 5.4	90.6 \pm 0.0	15.80 \pm 0.0	57.9 \pm 0.0
<i>Huperzia heterocarpon</i>	8.6 \pm 0.0	70.0 \pm 0.0	48.3 \pm 0.0	79.3 \pm 0.0
<i>Huperzia quadrifariata</i>	87.4 \pm 2.2	99.48 \pm 0.9	68.4 \pm 0.0	87.9 \pm 0.0
<i>Huperzia reflexa</i>	89.7 \pm 0.0	95.5 \pm 2.8	64.7 \pm 0.0	88.2 \pm 0.0
<i>Lycopodiella cernua</i>	29.0 \pm 0.0	76.6 \pm 1.6	5.3 \pm 0.0	47.4 \pm 0.0

Table 2

Effects on acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) activities for the alkaloidal extracts and for the reference inhibitor physostigmine salicylate. Data are expressed as IC₅₀ values (means ± S.E.M.) of three independent experiments.

Sample	AChE inhibition IC ₅₀ (µg/mL)	BuChE inhibition IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Huperzia acerosa</i>	5.5 ± 0.9	n.d. ^a
<i>Huperzia heterocarpon</i>	25.6 ± 2.7	8.3 ± 0.9
<i>Huperzia quadrifariata</i>	2.0 ± 0.3	5.5 ± 0.5
<i>Huperzia reflexa</i>	0.11 ± 0.05	5.6 ± 0.3
<i>Lycopodiella cernua</i>	42.6 ± 1.5	n.d. ^a
Physostigmine salicylate	0.08 ± 0.01	5.01 ± 0.22

^aNot determined due to poor activity.

Figure 1.

Dose-dependent inhibition of acetylcholinesterase by *H. acerosa*, *H. heterocarpon*, *H. quadrifariata*, *H. reflexa* and *L. cernua* alkaloids extracts and physostigmine salicylate. Vertical bars represent the S.E.M. The inhibition efficacy was expressed as a percentage of enzyme activity inhibited as compared to the control value (100%).

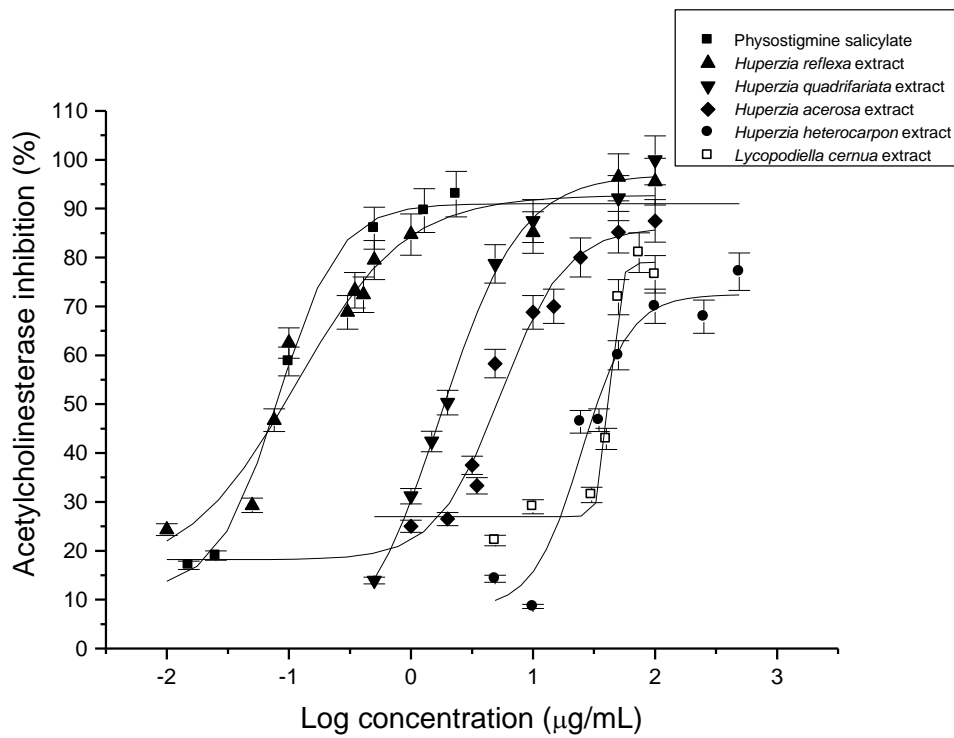


Figure 2.

Dose-dependent inhibition of butyrylcholinesterase by *H. heterocarpon*, *H. quadrifariata* and *H. reflexa* alkaloids extracts and physostigmine salicylate. Vertical bars represent the S.E.M. The inhibition efficacy was expressed as a percentage of enzyme activity inhibited as compared to the control value (100%).

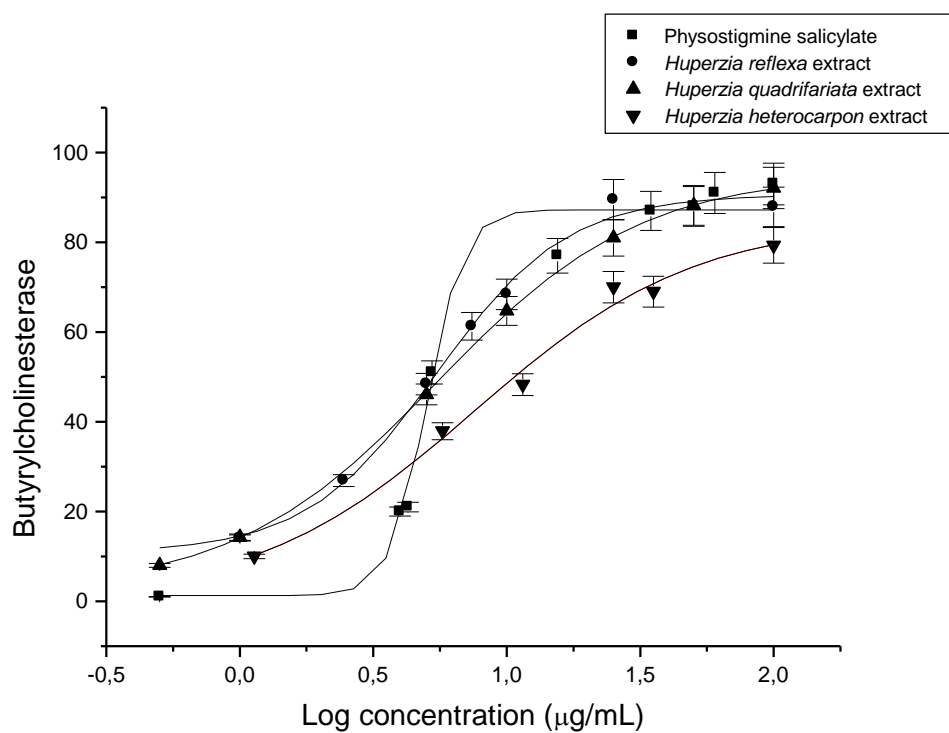
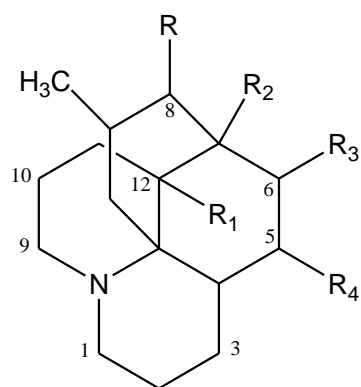


Figure 3.

Lycopodium alkaloids identified in the species analyzed in the present work.



Lycopodane group

$R = R_1 = R_2 = R_3 = H; R_4 = O$

Lycopodine

$R = OH; R_1 = R_2 = R_3 = H; R_4 = O$

Clavolonine

$R = R_1 = R_2 = H; R_3 = OH; R_4 = O$

6-hydroxylycopodine

$R = R_2 = R_3 = H; R_1 = OH; R_4 = O$

Lycodoline

$\Delta^{11,12}; R = R_1 = R_2 = R_3 = H; R_4 = O$

Anhydrolycodoline

$R = OAc; R_1 = R_2 = R_3 = H; R_4 = O$

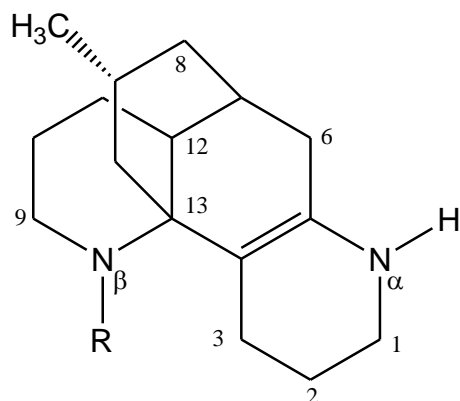
Acetylclavolonine

$R = R_2 = OH; R_1 = R_3 = H; R_4 = O$

Sauroine

$\Delta^{4,5}; R = R_1 = R_2 = R_3 = H; R_4 = NAc$

Flabelline



Flabellidane group

$\Delta^{N\alpha,1}, \Delta^{2,3}; R = H$

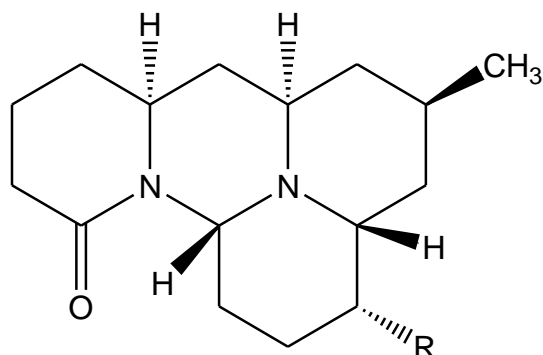
Lycodine

$R = CH_3; C_1 = O$

α -obscurine

$R = H; C_1 = O$

Des-*N*-methyl- α -obscurine



Cernuane group

$R = H$

Cernuine

$R = OH$

Lycocernuine

5. MANUSCRITO II

Submetido ao periódico **Journal of Ethnopharmacology**

INVESTIGATION OF ACETYLCHOLINESTERASE AND ANTIOXIDANT
ACTIVITIES ON ALKALOIDAL EXTRACTS OF TRADITIONALLY USED
LYCOPODIUM SPECIES FROM SOUTH AMERICA

Eduardo Luis Konrath^{a,*}, Bruna Medeiros Neves^a, Paula Santana Lunardi^b, Carolina dos Santos Passos^a, André Simões-Pires^b, María Gabriela Ortega^c, Carlos Alberto Gonçalves^b, José L. Cabrera^c, José Cláudio Fonseca Moreira^b, Amélia T. Henriques^a

^aPrograma de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre – RS, Brazil.

^bDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Prédio Anexo, 90035-003, Porto Alegre-RS, Brazil.

^cFarmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Cordoba, IMBIV (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, UNC-CONICET) Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina.

Corresponding author at: Departamento de Produção de Matéria Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 5258; fax: + 55 51 3308 5243.

E-mail address: edukonrath@yahoo.com.br (E.L. Konrath)

Abstract

Aims of the study: The study was aimed at evaluating medicinal and therapeutic potentials of two Lycopodiaceae species, *Lycopodium clavatum* (L.) and *Lycopodium thyoides* (Humb. & Bonpl. ex Willd), both used in folk medicine in South America for central nervous system conditions. Alkaloids extracts were evaluated for chemical characterization, acetylcholinesterase and antioxidant activities.

Materials and methods: The evaluation of the anticholinesterase and the antioxidant activities of the analyzed species was performed using *in vitro* and *in vivo* models. Effects on acetylcholinesterase (AChE) were evaluated *in vitro* using rat brain homogenates and in mice brain structures after a single administration (25, 10 and 1 mg/kg i.p.) of the alkaloidal extracts. The *in vitro* antioxidant effects were tested for the 2-deoxyribose degradation, oxide nitric (NO) interaction, 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and total reactive antioxidant potential (TRAP). After an acute an acute administration (25 and 10 mg/kg, i.p.) of the extracts in middle-aged (12 months) mice, the antioxidant effects were estimated through the thiobarbituric acid reactive substances test (TBARS), and the antioxidant enzymes activities for catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). The alkaloidal content was determined for each species by GC/MS examination of the extracts.

Results: AChE activity was inhibited *in vitro* by the alkaloidal extracts of both *Lycopodium* species in a dose and time-dependent manner in rat cortex, striatum and hippocampus; a significant inhibition was also observed in brain areas of mice after alkaloids enriched extracts acute administration, as well as a decrease on lipid peroxidation and an increase in CAT activity in cortex, hippocampus and cerebellum. A moderate antioxidant activity was observed *in vitro* for the extracts. Chemically, the main alkaloids found for the two species were lycopodine and acetyldihidrolycopodine.

Conclusion: This study provides a scientific basis for the therapeutic properties traditionally claimed for *L. clavatum* and *L. thyoides* correlated with the AChE inhibitory activity and antioxidant effects.

Keywords: *Lycopodium clavatum*; *Lycopodium thyoides*; Acetylcholinesterase inhibitor; Antioxidant activity; Cognitive deficits; Alzheimer's disease

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease of this century and the most prevalent cause of dementia among the elderly. About 4.6 million new cases of dementia are added every year worldwide, and it is estimated that 71% of dementia cases will occur in the developing countries by 2040 (Ferri *et al.*, 2005; Kalaria *et al.*, 2008). This irreversible neurological disorder is characterized by memory impairment, cognitive dysfunction, behavioral disturbances and deficits in activities in daily living (Cummings *et al.*, 1988). Neuropathologically, the main characteristics found for AD are the presence of senile plaques, produced in the cleavage of the amyloid precursor protein (APP) together with the neurofibrillary tangles in the brain (Giacobini, 2003a), leading to neurodegeneration.

In the past decade, treatment for AD has largely involved replacement of neurotransmitters that are known to be lacking in AD, mostly based on the cholinergic hypothesis of AD, which is an important approach for the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) (Perry, 1988; Francis *et al.*, 1999). As one of the most remarkable biochemical changes in AD patients is a reduction of acetylcholine levels in the hippocampus and cortex of the brain, the use of cholinesterase inhibitors is the most used treatment for the symptoms of mild AD, improving the cholinergic deficit (Lahiri *et al.*, 2002). However, the present drugs used for AD treatment with AChE inhibitory activity (e.g. tacrine, rivastigmine, galanthamine and donepezil) are extremely limited and possess some considerable side effects, related to cholinergic stimulation in brain and peripheral tissues (Bachurin, 2003; Thompson *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2008). Recently, multiple lines of evidence indicate that reactive oxygen species are associated with the pathogenesis of AD, once cellular characteristics of this disease are either causes or effects of oxidative stress (Zhu *et al.*, 2004; Sultana *et al.*, 2006). Antioxidants may therefore be applied as neuroprotective agents in AD (Moreira *et al.*, 2005), since oxidative damage was observed before the formation of AD specific pathological β -amyloid plaques.

Considering the complex pathology of AD, the current strategies to develop new agents focus on compounds with multiple potencies, and plants are an important source of these compounds.

A number of plants have been used in traditional medicine remedies to treat memory and cognitive disorders, such as *Huperzia serrata* (Qian Ceng Ta), which is used for centuries in China for the treatment of contusions, strains, swelling and schizophrenia (Yu *et al.*, 2001). Huperzine A and B, some of the alkaloids found in this species, have potent, reversible and selective anti-AChE activity (Ayer, 1991; Shen and Chen, 1994). Moreover, huperzine A possess remarkable activity on memory and learning (Zhu and Tang, 1988; Zhang *et al.*, 1991), and reported *in vivo* antioxidant activity in several studies (Xiao *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). For this reason, this compound has been marketed in China as a new drug for AD, and some synthetic derivatives are being developed as drug candidates in China and Europe (Ma *et al.*, 2007). Since then, *Lycopodium* alkaloids, a group of metabolites occurring in the family Lycopodiaceae, have become a new potential source of pharmacologically interesting natural products, which has led to the identification of over 200 alkaloids from 54 *Lycopodium* species so far (Ma and Gang, 2004).

Lycopodium clavatum (L.) and *Lycopodium thyoides* (Humb. & Bonpl. ex Willd), commonly known as “club mosses”, are creeping perennial species found in almost all parts of the world, considered montane plants in the Neotropics (Øllgaard, 1992). Both species are well known for their rich alkaloid content, which has been extensively reviewed (Ayer and Dikko, 1974; McLean, 1985; Ma and Gang, 2004). Aerial parts of *L. clavatum* are popularly used as carminative, laxative and diuretic (Schauenberg and París, 1972; Nuñez and Cantero, 2000); the entire plant is used in South America as an aphrodisiac (Hurrel and de la Sota, 1996) and in China for the treatment of mental disorders (Duke and Ayensu, 1985). Some Andean ethnic groups from Ecuador, the Quechuas, have used infusions of *L. thyoides* as a traditional medicine to treat parturition disorders, and the whole plant is believed to act as a central nervous system stimulant for young children with motor problems,

in order to improve their resistance to the labor (Elleman, 1990; Navarrete *et al.*, 2006). Therefore, in this study, the hypothesis that the alkaloid extracts from *Lycopodium* species can inhibit the activity of the enzyme AChE and also display antioxidant activity were tested.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

Lycopodium thyoides and *Lycopodium clavatum* were collected in the city of Bom Jesus, Rio Grande do Sul, Brazil and identified by Prof. Dr Sérgio L. Bordignon, Fundação La Salle. The voucher specimens (collection numbers HAS 45875 and HAS 45878, respectively) were deposited in the Herbarium of the Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2.2. Preparation of the total alkaloidal extracts (AE)

The dried and ground aerial parts from *Lycopodium thyoides* (1.69 kg) and *Lycopodium clavatum* (1.35 kg) were separately extracted with hexane using a Soxhlet extractor. Afterwards, defatted plant material was exhaustively macerated with methanol and the resulting crude extracts were dried under reduced pressure. Each extract was then suspended in 5% HCl and partitioned with CH₂Cl₂. The aqueous layers were alkalized with NH₄OH (pH 11) and then extracted again with CH₂Cl₂; the organic layers were dried over NaSO₄ and evaporated to give the crude alkaloidal extracts AELT (*L. thyoides*) and AELC (*L. clavatum*). The yield of the extracts was 0.34% and 0.38% of dried materials for each species, respectively.

2.3. Chemical composition

The alkaloids extracts were submitted to CG-MS in order to separate and identify the present components, by means of a Perkin-Elmer Qmass 910 apparatus and a capillary column SE 30, 30 m in length. The analysis were performed using an injection volume of 0.5 µl with He as carrier, with the flow rate being 1 ml/min.

Temperature program: 140 °C (3 min), 140-250 °C at 5 °C/min, 250 °C (5 min), 250-280 °C (5 min). The temperatures of injector, interface and ion source were 300, 280 and 280 °C, respectively. The ionization energy was 70 eV and individual alkaloid identifications were made by comparison of the breakdown patterns with those found in the literature (MacLean, 1963; Alam *et al.*, 1964; Loyola *et al.*, 1979; Ortega *et al.*, 2004).

2.4. Animals

The experiments were performed using adult male Wistar rats (60 days old, weighing 240-260 g) and Swiss albino male mice (CF1 strain, 3 and 12 months old, weighing 35-50 g); all obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Animals were maintained under controlled temperature (23 ± 1 °C) and light-dark cycles of 12 h, with free access to food and water. The research protocols with animals followed throughout our study were designed to minimize suffering and limit the number of animals sacrificed. The project was approved (#2007942, 2008) by the University Ethics Committee.

2.5. Drugs and reagents

Acetylthiocholine iodate, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), AAPH (2,2-azobis[2-methylpropionamidine]dihydrochloride), luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione), 2-deoxyribose, glycine, Griess reagent, sodium nitroprusside, NBT (nitrotetrazolium blue chloride), huperzine A and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co (St Louis, MO, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and the buffer salts were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals and organic solvents were of analytical grade. Stock solutions of AELC and AELT were initially dissolved in DMSO and further diluted to various concentrations in 20 mM phosphate buffer immediately before use, in order to achieve final concentrations of DMSO not greater than 1%. For the intraperitoneal administrations, extracts were dissolved in

DMSO and saline solution (NaCl 0.9 g %) to obtain the final concentrations in a DMSO 20% (v/v) solution.

2.5. Anticholinesterasic activity assays

AChE activity was measured by the colorimetric method of Ellman *et al.* (1961) with some minor modifications, adapted for determining the enzyme activity in supernatants of brain homogenates.

2.5.1. *In vitro* analysis for AChE activity

Rats were separately decapitated, the brains quickly removed and placed on an ice-cold plate. Cortex, striata and hippocampi were dissected, weighed and homogenized in 15, 10 and 10 volumes, respectively of cold 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, containing 160 mM sucrose. The homogenates were centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4 °C, and the clear resulting supernatants used as enzyme sources were divided into aliquots and stored at -20 °C. Briefly, enzyme samples in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) were incubated in the presence of 10 mM DTNB solution with different concentrations of each AE in buffer (final concentrations from 50 to 1000 µg/ml). The enzyme reaction was initiated by addition of 0.8 mM acetylthiocholine iodide after the pre incubation times of 0, 15 and 30 min. Substrate hydrolysis was monitored by the formation of a yellow anion of 5-thio-2-nitrobenzoic acid at 415 nm, every 30 s during 2.5 min by a SpectraMax 190, 96-well plate reader. Enzyme activity was estimated through differences in dA/min, and the degrees of inhibition in each brain area and incubation time were calculated by comparison with its control (DMSO 1%, results expressed as percentages of control); every experiment was performed in triplicate.

The kinetic parameters K_m (Michaelis-Menten constant) and V_{max} (maximal velocity) were determined by means of a Lineweaver-Burk plot (Segel, 1975) over a substrate range of 0.01 to 0.08 mM, after 30 min of incubation of striatum samples with three different concentrations of AELC and AELT (50, 100 and 250 µg/mL).

2.5.2. *Ex vivo* analysis for AChE activity

Three months-aged mice were randomly divided into 9 groups (n = 6) and received a single intraperitoneal injection (0.1 mL/ 10 g) of saline solution, vehicle (DMSO 20%), AELC (25, 10 and 1 mg/kg), AELT (25, 10 and 1 mg/kg) or huperzine A (0.5 mg/kg). Animals were killed by decapitation 60 minutes later each administration. After that, brains were removed; cortex and hippocampi were dissected separately and processed as described above. Total AChE activity was measured as triplicates in aliquots of brain homogenates, the enzymatic inhibition is expressed as percentage of control (DMSO-treated mice).

2.6. Antioxidant activity assays

2.6.1. Assay of 2-deoxyribose degradation

The formation of OH (hydroxyl radicals) from Fenton reaction was indirectly estimated by the spectrophotometric measurement of the 2-deoxyribose oxidative degradation, through the production of malondialdehyde, which condensates with 2-thiobarbituric acid (TBA) (Hermes-Lima *et al.*, 1994). The reaction was carried out in a 20 mM phosphate buffer (pH 7.2) medium containing AELC and AELT at final concentrations ranging between 50 and 2500 µg/mL with 5 mM 2-deoxyribose and 100 mM H₂O₂. The reaction started by the addition of Fe²⁺ (6 mM final concentration) to the solutions and was carried out for 15 min at room temperature. Reaction was stopped by the addition of 4% phosphoric acid followed by 1% TBA (in 50 mM NaOH). Solutions were boiled for 15 min at 100 °C and then cooled at room temperature. The absorbance was measured at 532 nm and percent values were determined by comparing the absorbance of control (Fenton reagents) and test samples.

2.6.2. Scavenging activity of the oxide nitric (NO) radical

The interaction of the alkaloidal extracts (in final concentrations between 50 and 2500 µg/mL) with nitric oxide was assessed by the nitrite detection method (Green

et al., 1982). NO was generated from spontaneous decomposition of 200 nM sodium nitroprusside in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4). Nitric oxide interacts with oxygen to produce stable products, leading to the formation of nitrites, which were measured by the Griess reaction. The reaction mixture containing 10 mM sodium nitroprusside in phosphate buffer and the extracts were incubated at 37 °C for 1 h. An aliquot was taken and homogenized with Griess reagent (0.1% α -naphthylethylenediamine in water and 1% sulfanilic acid in 5% H₃PO₄). The concentration of nitrite was assayed at 540 nm and calculated with reference to the absorbance of the standard nitrite solutions. The inhibition results were expressed as percentages in relation to the non-treated control (100%).

2.6.3. DPPH radical scavenging activity

The free radical scavenging effect of the extracts was assessed by the discoloration of a methanolic solution of 1,1,-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) as previously reported (Mensor *et al.*, 2001). The extracts were assayed in a range from 10 to 250 μ g/ mL. Values are presented as mean \pm standard deviation of three determinations. The quenching of free radicals by extracts was evaluated spectrophotometrically at 517 nm against the absorbance of the DPPH radical (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2003). A freshly prepared DPPH solution (0.1 mM) was used for the assays. Samples were dissolved in methanol and the methanolic solution of DPPH served as a control. The degree of discoloration indicates the free radical scavenging efficiency of the substances. The percentage of DPPH discoloration was calculated as previously described.

2.6.4. Total reactive antioxidant potential (TRAP) assay

An adapted method of TRAP to measure luminol-enhanced chemiluminescence (Lissi *et al.*, 1992) was used to determine the capacity of the alkaloidal extracts to trap a flow of water-soluble peroxy radicals produced through thermal decomposition of ABAP (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride). Briefly,

the reaction mixture contained the free radical source (ABAP, 10 mM) and 4 mM luminol in the 0.1 M glycine buffer (pH 8.6). The incubation of this mixture at 20 °C generates an almost constant light intensity that was measured in a scintillation counter (Beckman) working in the out of coincidence mode. For the determination of the free radical scavenging potential, increasing concentrations of AELC and AELT in methanol were added to the system (from 50 to 2500 µg/mL). The addition of alkaloidal extracts decreases chemiluminescence to basal levels, for a period proportional to the concentration of antioxidants (TRAP), until luminal radicals are regenerated, when the antioxidants are totally consumed. The results of the chemiluminescence emission were expressed as area under the curve (AUC).

2.7. *Ex vivo* antioxidant assay

Twelve months-aged mice were divided into 6 groups (n = 6) and injected intraperitoneally (0.1 mL/ 10 g) with saline solution, vehicle (DMSO 20%), AELC (25 and 10 mg/kg) or AELT (25 and 10 mg/kg). Mice were decapitated 60 min after drug administration and the brain was quickly excised. Hippocampi, cerebral cortex and cerebellum were dissected out, brain tissues were homogenized in 10 vol. of ice-cold 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing EDTA (1mM) and phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM). The homogenate was centrifuged at 10,000 x g for 10 min; the supernatant was employed for the assays.

2.7.1. Lipid peroxidation assay

Lipoperoxidation was evaluated by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) tests during an acid-heating reaction as previously described (Draper and Hadley, 1990). Aliquots of samples were incubated with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid. The mixture was heated (25 min) on a boiling water bath. TBARS was determined by reading the absorbance of the pink-colored complex formed in a spectrophotometer at 532 nm. 1,1,3,3-tetramethoxypropane, which is converted to malondialdehyde, was used as standard.

2.7.2. Determination of antioxidant enzyme activity

Catalase (CAT) activity was assayed as described by Aebi (1984). Briefly, homogenates were incubated with 10% ethanol and 10% Triton and the activity was assayed at 37 °C by determining the rate of degradation of H₂O₂ at 240 nm in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). One unit is defined as 1 pmol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity is reported as units per mg protein. Superoxide dismutase (SOD) activity was accessed by quantifying the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer at 480 nm (Boveris, 1984) and the results are expressed as units of SOD/ mg of protein.

2.8. Protein assay

All results were normalized by the protein concentrations, which were determined by Peterson's modification of the procedure of Lowry *et al.* (Lowry *et al.*, 1951), using bovine serum albumin as standard.

2.9. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error mean (S.E.M.). Differences between the treatments and controls were evaluated by ANOVA followed by Duncan's multiple range test whenever necessary; linear regression was further used to verify dose-response relationship. A $p < 0.05$ was considered to be significant. Data related to K_m and V_{max} were analyzed by one-way ANOVA.

3. Results

3.1. Chemical composition

The CG-MS analysis performed for the extracts of *Lycopodium clavatum* and *Lycopodium thyoides* revealed the presence of a number of known *Lycopodium* alkaloids (Fig. 1) belonging to lycopodane and flabellidane groups. Both species had lycopodine and acetyldihydrolycopodine as the main alkaloids found, followed

by lycodoline, lycodine and α -obscurine. Additionally, it was found *N*-methyl-lycodine and traces of clavolonine in *L. clavatum*, whereas for *L. thyoides* the alkaloids flabeliformine and flabellidine were detected.

3.2. Acetylcholinesterase inhibition

No significant differences in AChE activity (dA/min) were found with phosphate buffer or DMSO over time. Both alkaloidal extracts of *Lycopodium* significantly inhibited *in vitro* AChE activity in a dose and time-dependent manner in all brain structures studied (Figures 2 and 3). At 30 min of incubation with AELC there were clear dose/effect associations, with Pearson' coefficients as follows: $r^2 = 0.9227$ ($p < 0.001$) for cortex (Fig. 2A), $r^2 = 0.8731$ ($p < 0.001$) for striatum (Fig. 2B) and $r^2 = 0.9139$ ($p < 0.001$) for hippocampus (Fig. 2C), while for AELT it was found $r^2 = 0.8752$ ($p < 0.001$) for cortex (Fig. 3A), $r^2 = 0.8904$ ($p < 0.001$) for striatum (Fig. 3B) and $r^2 = 0.8868$ ($p < 0.001$) for hippocampus (Fig. 3C). Whereas the AChE inhibition seems to be stabilized after 15 min of incubation in the presence of AELC in cortex, with AELT it continues to drop thereafter. As for striatum, treatment with AELC also promotes a stabilization of enzymatic inhibition after 15 min, the same effect found for higher concentrations of AELT (500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$), while for 250 and 50 $\mu\text{g/mL}$ there is a continuing drop of inhibition. In hippocampus, treatment with both alkaloidal extracts seems to not affect AChE inhibition over time.

Double-reciprocal Lineweaver-Burk plot for rat striatal acetylcholinesterase assays with 30 min of incubation (Fig. 4) indicates that in presence of increasing concentrations of AELC (50, 100 and 250 $\mu\text{g/mL}$) V_{max} values are reduced (from 0.32 to 0.23, 0.16 and 0.12 μM of acetylthiocholine hydrolyzed/ mg of protein/ min, respectively) and K_m values are increased (from 0.05 to 0.07, 0.08 and 0.1 μM , respectively). In the case of AELT, the same concentrations also induced a decrease in V_{max} (from 0.26 to 0.17, 0.13 and 0.11 μM of acetylthiocholine hydrolyzed/ mg

of protein/ min, respectively), and an augment in K_m (from 0.05 to 0.07, 0.09 and 0.11 μM), a pattern common to competitive/ noncompetitive type inhibitors.

Table 2 shows the effects of a single administration of the alkaloidal extracts (25, 10 and 1 mg/kg, i.p.) on AChE activity in the cortex and hippocampus of mice. As observed, treatment with the extracts correlates with enzymatic inhibition in all of the brain structures studied; when treated with AELC, decreases in AChE activity were in the range of 46.5, 37.2 and 20% (cortex) and 43, 18.7 and 6.2% (hippocampus), respectively for each dose, while for AELT, decreases in enzymatic activity were in the order of 43.5, 40.7 and 28.3% (cortex) and 54.7, 33.6 and 10% (hippocampus). At 0.5 mg/kg, huperzine A showed an inhibitory effect of 64.3% for cortex and 47.5% for hippocampus.

3.3. Antioxidant activities

Table 1 summarizes the antioxidant effects of each AE against 2-deoxyribose degradation, nitric oxide production, DPPH discoloration and total reactive antioxidant potential. At the final concentration of 2500 $\mu\text{g/mL}$, the inhibitory power against 2 deoxyribose degradation comprised 25-35%, and for nitric oxide production 50-60% for AELC and AELT. Both extracts were also able to reduce the DPPH radical at all tested concentrations, but due to the turbidity at test conditions, concentrations higher than 500 $\mu\text{g/mL}$ could not be assayed. In the TRAP assay, the extracts acted as peroxy scavengers, diminishing the chemiluminescence with induction times proportional to the concentrations added. Also, a single i.p. administration of AELC and AELT (25 and 10 mg/kg) in 12 months mice induced changes in all studied indexes of oxidative stress; different patterns were found at different brain regions. A significant decrease in lipoperoxidation (TBARS levels, Fig. 5) was observed in cortex, hippocampus and cerebellum for all extracts analyzed. In terms of antioxidant enzymes activity, SOD activity was significantly increased only in cerebellum of AELT treated mice (Fig. 6A), while CAT activity was enhanced in all brain structures after treatment with both extracts (Fig. 6B).

Moreover, the SOD/CAT ratio was found to be significantly decreased in cortex, hippocampus and cerebellum of AELC treated mice (Fig. 6C), while AELT promoted a decrease only at the higher dose, with the exception of cortex, which showed a drop in the enzymatic ratio at all doses.

4. Discussion and conclusions

It is now widely accepted the use of inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase as the first line pharmacotherapy for symptomatic relief of mild to moderate AD, through an increase of acetylcholine levels at the synaptic site in the brain, improving memory and cognitive deficits of the patients (Giacobini, 2003b; Loizzo *et al.*, 2008). Besides, some potent inhibitors of AChE are derived from natural sources and most of them belong to the chemical class of alkaloids, e.g., galanthamine and huperzine A, the most studied *Lycopodium* alkaloid. This way, the present study reports for the first time the *in vitro* and *in vivo* antioxidant and anticholinesterasic activities of the alkaloidal extracts of two species belonging to *Lycopodium* genus (Lycopodiaceae) collected in Brazil: *L. clavatum* (L.) and *L. thyoides* (Humb. & Bonpl. ex Willd), plants which are well known for their content in alkaloids and used in folk medicine for CNS-related disorders. Some previous studies found that a crude plant extract of *L. clavatum* growing in Turkey displayed a significant inhibitory effect on AChE *in vitro* at the concentration of 1 mg/mL (Orhan *et al.*, 2003; Orhan *et al.*, 2004); a bio-assay guided fractionation of the plant extract indicated the triterpenoid α -onocerin as the main responsible for such activity (Orhan *et al.*, 2003). Later, in contrast to these studies, no anti-AChE was found for this compound, and another triterpenoid, lyclavatol, was found to possess some inhibitory effect, although does not fully explain the activity of *L. clavatum* crude extract (Rollinger *et al.*, 2005). Also, an alkaloidal extract for the same species was found to possess a significant *in vivo* anti-inflammatory activity, and the major alkaloid found for such extract was lycopodine, followed by dihydrolycopodine and lycodine, all of them belonging to lycopodane group (Orhan

et al., 2007). On the other hand, to our knowledge no biological studies have been reported in the literature with the species *L. thyoides* so far.

In the present study we report that the alkaloidal extracts of both *L. clavatum* and *L. thyoides* species have the ability to inhibit AChE and display antioxidant properties as evaluated by *in vitro* and *ex vivo* assays. AChE activity was found to be inhibited in rat cortex, hippocampus and striatum homogenates incubated *in vitro* with AELC and AELT (50-1000 µg/mL); a significant (\approx 20-55%) decrease in AChE activity was also observed *in vivo* in these memory relevant brain structures as evaluated 60 min after a single AELC and AELT (25, 10 and 1 mg/kg i.p.) administration to adult (3 months) mice. Although further experiments are needed for a definitive conclusion, the AChE inhibition induced by both alkaloidal extracts seems to be dose and time-dependent, with AELT displaying a higher inhibitory activity when compared to AELC. Different effects on enzymatic inhibition may be related to the uneven existence of several molecular AChE forms on particular tissues or brain regions, favoring interactions with particular types of the enzyme (Bisso *et al.*, 1991). It is noteworthy that the intraperitoneal administration of huperzine A, obtained from the Chinese medicinal herb *Huperzia serrata*, resulted in various degrees of AChE activity inhibition in rat hippocampus, cortex, striatum and hypothalamus (Tang *et al.*, 1994; Cheng and Tang, 1998), consistent with our findings for the same compound in hippocampus and cortex (inhibition of 47.5 and 64.3%, respectively). The competitive/noncompetitive mode of inhibition, as suggested by the Lineweaver-Burk plots, indicates that active compounds are able to interact with both the enzyme active center and the enzyme-substrate complex. Interestingly, compounds of notorious efficacy for the symptomatic treatment of AD like tacrine galanthamine and donepezil, are also of the mixed type of inhibition (Snape *et al.*, 1999; Khalid *et al.*, 2005), as well as some plant extracts (Siqueira *et al.*, 2003).

Increasing evidence supports the role of oxidative damage to biomolecules in the pathogenesis of AD patients, suggesting that antioxidants may be recognized as a potential treatment for the disease (Lleó *et al.*, 2006). In this scenario, the benefits

of multi-factorial medicines have been advocated, stimulating the search for new anti-AChE and antioxidant drugs, especially those derived from natural sources. Relevant to this discussion, our *in vitro* antioxidant tests revealed that extracts had poor activity against the formation of hydroxyl radicals a harmful radical formed *in vivo*, but were more potent in decreasing the concentration of nitrite after spontaneous decomposition of sodium nitroprusside, indicating that the alkaloids of AELC and AELT may be able to scavenge nitric oxide. The scavenging effect on DPPH, which is related to lipid peroxidation (Rekka and Kourounakis, 1991), revealed a stronger antioxidant effect for the extracts, and may be attributed to their capacity of trapping free radicals by donating a hydrogen atom. TRAP assay is commonly associated with the ability of a given compound to scavenge peroxy radicals, superoxide or luminol-derived radicals (Lissi *et al.*, 1992), indicating the presence of alkaloids in the assayed extracts with dose-dependent antioxidant action.

Also interestingly, it was found that an acute treatment with AELC and AELT in middle-aged mice reduced oxidative stress damage in specific brain areas. This is an important step to verify a physiologically contribution to the cellular defenses against free radicals, by detecting the interaction of the extracts with the antioxidant systems of the brain samples. Our data showed that extracts diminished the formation of TBARS, an index of lipid peroxidation, in the cortex, hippocampus and striatum. Moreover, both enhanced CAT activity, avoiding therefore the accumulation of hydrogen peroxide. As for SOD, activity was only significantly enhanced in cerebellum after the administration of AELT, indicating that extracts did not reach the brain areas studied, at least in significant amounts, or even that the extracts have selective capacity to specific brain structures. The activity ratios between antioxidant enzymes, such as SOD/CAT ratio, have been considered as an index of oxidative status (Palomero *et al.*, 2001). In this sense, the high activity of CAT combined with the decrease of SOD function in most brain regions might allow an imbalance in the physiologic generation of oxygen reactive species that in

many cases act as cell signaling elements, compromising Ca^{2+} influx and the vesicular traffic through cell membranes (Halliwell, 2006; Forman, 2007).

Although some alkaloidal extracts of Lycopodiaceae plants have been already tested for AChE inhibitory activity (Ortega *et al.*, 2004; Borloz *et al.*, 2006), studies on the anti-AChE for the *Lycopodium* alkaloids here described in our extracts are scarce, available only for lycodoline, which displayed a poor effect on the enzyme (Halldorsdottir *et al.*, 2010). Therefore, the inhibitory effects of each pure alkaloid in AELC and AELT are in progress, in order to identify the active compound (s) in the extracts. In addition, the constituents present in the alkaloidal extracts responsible for the anticholinesterase and antioxidant activities found after a single i.p. administration may have different activity and/or access different areas of brain, suggesting that pharmacokinetic studies to evaluate the distinct distribution of the compounds should be carried out.

The major finding of this study was that AELC and AELT have efficacy in crossing the blood-brain barrier, which is a consideration to be taken into account for a medication for a neurodegenerative disease. Also, extracts lead to significant AChE inhibition and antioxidant effects, through *in vivo* and *in vitro* animal models, in brain areas relevant to cognitive functions. Thus, this study further indicates that *Lycopodium clavatum* and *Lycopodium thyoides* possesses multiple modes of action that are relevant to cognitive disorders, corroborating their traditional use by local communities in South America as medicines for CNS disorders.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge financial support received from CAPES, CNPq and FAPERGS (Brazil), SeCyT-UNC and FONCyT (Argentina). The authors are grateful to Prof. Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon (Centro Universitário La Salle, Brazil) and Dr. Rosana M. Sena (Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul) for the identification of the species under study.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105, 121–126.
- Alam, S.N., Adams, A.H., MacLean, D.B., 1964. Lycopodium alkaloids XV. Structure and mass spectra of some minor alkaloids of *L. flabelliforme*. *Canadian Journal of Chemistry* 42, 2456–2466.
- Ayer, W.A., 1991. The *Lycopodium* alkaloids. *Natural Product Reports*, 455-463.
- Ayer, W.A., Dikko, S., 1974. Alkaloids of *Lycopodium thyoides* and *L. contiguum*. *Phytochemistry* 13, 654-655.
- Bachurin, S.O., 2003. Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews* 23, 48-88.
- Bisso, G.M., Briancesco, R., Michalek, H., 1991. Size and charge isomers of acetylcholinesterase in the cerebral cortex of young and aged rats. *Neurochemical Research* 16, 571- 575.
- Borloz, A., Marston, A., Hostettmann, K., 2006. The determination of huperzine A in European Lycopodiaceae species by HPLC-UV-MS. *Phytochemical Analysis* 17, 332-336.
- Boveris, A., 1984. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods in Enzymology* 105, 429-435.
- Cheng, D.C., Tang, X.C., 1998. Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 60, 377-386.
- Cummings, J.L., Vinters, H.V., Cole, G.M., Khachaturian, Z.S., 1988. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve and treatment opportunities. *Neurology* 51 (1 Suppl. 1), S2-S17.
- Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421–431.
- Duke, J.A., Ayensu, E.S., 1985. Details of over 1200 medicinal plants of China and 579 brief details of their uses. In: *Medicinal plants of China*. Vol II. Reference Publications Inc., Michigan, pp. 352-361.
- Ellemann, L. 1990. Appendix to plants used by the Saraguros. In: Balslev, H. & B. Øllgard (eds). *Plants Used by the Saraguros*. Botanisk Institut, Aarhus Universitet, Aarhus, pp. 1-46.

Ellman, G.L., Courtney, D.K., Andres, V.J., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.

Fang, L., Kraus, B., Lehmann, J., Heilmann, J., Zhang, Y., Decker, M., 2008. Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 18, 2905-2909.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodati, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Sczufca, M., 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112-2117.

Forman, H.J., 2007. Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 42, 926-932.

Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K., 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 66, 137-147.

Giacobini, E., 2003a. Cholinergic function and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatrics Psychiatry* 18, S1-S5.

Giacobini, E., 2003b. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochemical Research* 28, 512-522.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.K., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytica Biochemistry* 126, 131-138.

Halldorsdottir, E.S., Jaroszewski, J.W., Olafsdottir, E.S., 2010. Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the Icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. *alpestre*. *Phytochemistry* 71, 149-157.

Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 97, 1634- 1658.

Hermes-Lima, M., Wang, E.M., Shulman, H.M., Storey, K.B., Ponka, P., 1994. Deoxyribose degradation catalyzed by Fe(II)EDTA: kinetics aspects and potential usefulness for submicromolar iron measurements. *Molecular and Cellular Biochemistry* 137, 65-73.

Hurrel, J., de la Sota, E., 1996. Etnobotánica de las pteridófitas de los pastizales de altura de Santa Victoria (Salta, Argentina). *Revista Museo La Plata XIV, Ser. Botánica* 343-364.

Kalaria, R.N., Maestre, G.E., Arizaga, R., Friedland, R.P., Galasko, D., Hall, K., Luchsinger, J.A., Ogunniyi, A., Perry, E.K., Potocnik, F., Prince, M., Stewart, R., Wimo, A., Zhang, Z., Antuono, P., 2008. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *The Lancet Neurology* 7, 812-826.

Khalid, A., Azim, M.K., Parveen, S., Rahman, A., Choudhary, M.I., 2005. Structural Basis of acetylcholinesterase inhibition by triterpenoidal alkaloids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 1528-1532.

Lahiri, D.K., Farlow, M.R., Greig, N.H., Sambamurti, K., 2002. Current drug targets for Alzheimer's disease treatment. *Drug Development Research* 56, 267–281.

Lissi, E., Pascual, C., Delcastillo, M.D., 1992. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radical Research Communications* 17, 299-311.

Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Menichini, F., 2008. Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. *Current Medicinal Chemistry* 15, 1209-1228.

Loyola, L.A., Morales, G., Castillo, M., 1979. Alkaloids of *Lycopodium magellanicum*. *Phytochemistry* 18, 1721–1723.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

Ma, X., Gang, D.R., 2004. The *Lycopodium* alkaloids. *Natural Products Reports* 21 752-772.

Ma, X., Tan, C., Zhu, D., Gang, D.R., Xiao, P., 2007. Huperzine A from *Huperzia* species – an ethnopharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 15-34.

MacLean, D.B., 1963. *Lycopodium* alkaloids XIII. Mass spectra of representative alkaloids. *Canadian Journal Chemistry* 41, 2654–2670.

MacLean, D.B., 1985. *Lycopodium* alkaloids. In: Brossi, A. (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, vol. 26. Academic Press, Orlando, pp. 241–298.

Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., dos Santos, T.C., Coube, C.S., Leitão, S.G., 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* 15, 127-130.

Moreira, P.I., Siedlak, S.L., Aliev, G., Zhu, X., Cash, A.D., Smith, M.A., Perry, G., 2005. Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* 112, 921- 932.

Navarrete, H., León, B., Gonzales, J., Aviles, D.K., Lecaro, J.S., Mellado, F., Alban, J., Øllgaard, B., 2006. Helechos. In: Moraes R., B. Øllgaard, Kvist, L.P., Borchsenius, F., Balslev, H., *Botánica Económica de los Andes Centrales*, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, pp. 385-411.

Núñez, C., Cantero, J., 2000. Las plantas medicinales del sur de la provincia de Córdoba. Ed. Fundación Universidad Nacional Río Cuarto, Córdoba, pp. 1-144.

Øllgaard, B., 1992. Neotropical Lycopodiaceae – an overview. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79, 687-717.

Orhan, I., Küpeli, E., Şener, B., Yesilada, E., 2007. Appraisal of anti-inflammatory of the clubmoss, *Lycopodium clavatum* L. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 146-150.

Orhan, I., Şener, B., Choudhary, M.I., Khalid, A., 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 57-60.

Orhan, I., Terzioglu, S., Şener, B., 2003. α -onocerin: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum*. *Planta Medica* 69, 265-267.

Ortega, M.G., Agnese, A.M., Cabrera, J.L., 2004. Anticholinesterase activity in an alkaloid extract of *Huperzia saururus*. *Phytomedicine* 11, 539–543.

Palomero, J., Galán, A.I., Muñoz, M.E., Tuñon, M.J., González-Gallego, J., Jiménez, R., 2001. Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 386- 845.

Perry, E., 1988. Acetylcholine and Alzheimer's disease. *British Journal of Psychiatry* 152, 737-740.

Rekka, E., Kourounakis, P.N., 1991. Effect of hydroxyethyl rutenosides and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity-some structural aspects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43, 486–491.

Rollinger, J.M., Ewelt, J., Seger, C., Sturm, S., Ellmerer, E.P., Stuppner, H., 2005. New insights into the acetylcholinesterase inhibitory activity of *Lycopodium clavatum*. *Planta Medica* 71, 1040-1043.

Schauenberg, P., París, F., 1972. Guía de las plantas medicinales. Ed. Omega, Barcelona, pp. 1-364.

Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J.A., Theoduloz, C., Astudillo, S.L., Feresin, G.E., Tapia, A., 2003. Free radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). Free Radical Research 37, 447 - 452.

Segel, I.H., 1975. Rapid equilibrium partial and mixed-type inhibition. In: Enzyme Kinetics. Wiley-Interscience, New York, pp. 161-226.

Shen, Y., Chen, C.H., 1994. Alkaloids from *Lycopodium casuarinoides*. Journal of Natural Products 57, 824-826.

Snape, M.F., Misra, A., Murray, T.K., de Souza, R.J., Williams, J.L., Cross, A.J., Green, A.R., 1999. A comparative study in rats of the *in vitro* and *in vivo* pharmacology of the acetylcholinesterase inhibitors tacrine, donepezil and NXX-066. Neuropharmacology 38, 181- 193.

Siqueira, I.R., Fochesatto, C., da Silva, A.L., Nunes, D.S., Battastini, A.M., Netto, C.A., Elisabetsky, E., 2003. *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian "nerve tonic", possesses anticholinesterase activity. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 75, 645-650.

Sultana, R., Perluigi, M., Butterfield, D. A., 2006. Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. Antioxid. Redox Signaling 8, 2021-2037.

Tang, X.C., Kindel, G.H., Kozikowski, A.P., Hanin, I., 1994. Comparison of the effects of natural and synthetic huperzine A on rat brain cholinergic function *in vitro* and *in vivo*. Journal of Ethnopharmacology 44, 147-155.

Thompson, S., Lanctot, K.L., Herrmann, N., 2004. The benefits and risks associated with cholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease. Expert Opinion on Drug Safety 3, 425-440.

Wang, R., Zhang, H.Y., Tang, X.C., 2001. Huperzine, A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by beta-amyloid protein-(1-40) in rat. European Journal of Pharmacology 421, 149-156.

Xiao, X.Q., Wang, R., Han, Y.F., Tang, X.C., 2000. Protective effects of huperzine A on beta-amyloid (25-35) induced oxidative injury in rat pheochromocytoma cells, Neuroscience Letters 286, 155-158.

Yu, H.Y., Sun, Y.M., Yang, Y.J., 2001. Chine Tradit. Herb. Drugs 32, 279-281.

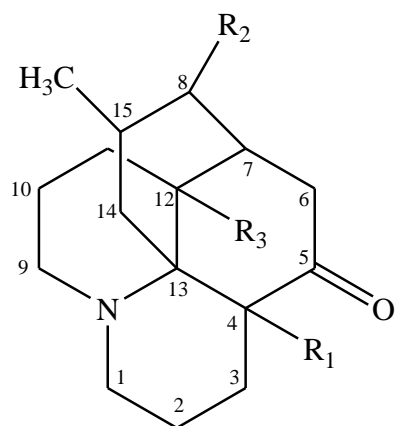
Zhang, R.W., Tang, X.C., Han, Y.Y., Sang, G.W., Zhang, Y.D., Ma, Y.X., Zhang, C.L., Yang, R.M., 1991. Drug evaluation of huperzine A in the treatment of senile memory disorders. *Acta Pharmacologica Sinica* 12, 250–252.

Zhu, X., Raina, A.K., Lee, H.G., Casadesus, G., Smith, M.A., Perry, G., 2004. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Brain Research* 1000,32-39.

Zhu, X.D., Tang, X.C., 1988. Improvement of impaired memory in mice by huperzine A and huperzine B. *Acta Pharmacologica Sinica* 9, 492–497.

Figure 1: Structures of the alkaloids present in the alkaloidal extracts of *Lycopodium clavatum* (AELC).and *Lycopodium thyoides* (AELT).

Lycopodane group



$R_1 = R_2 = R_3 = H$

Lycopodine

$R_1 = R_2 = R_3 = H; C_5 = OAc$

Acetyldihydrolycopodine

$R_1 = R_2 = H; R_3 = OH$

Lycodoline

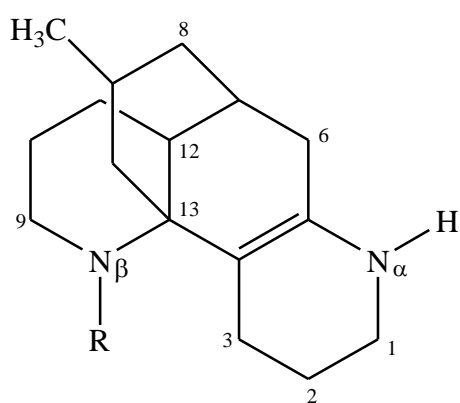
$R_1 = R_3 = H; R_2 = OH$

Clavolonine

$R_1 = OH; R_2 = R_3 = H$

Flabelliformine

Flabellidane group



$\Delta^{N\alpha,1}, \Delta^{2-3}; R = H$

Lycodine

$\Delta^{N\alpha,1}, \Delta^{2-3}; R = CH_3$

N-methyl lycodine

$R = CH_3; C_1 = O$

α -obscurine

$R = H; N\alpha = COCH_3$

Flabellidine

Figure 2.

Effect of *Lycopodium clavatum* AE (50, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on AChE activity in rat cortex, striatum and hippocampus. AChE activity (as percentage of the DMSO control group) at 0, 15 and 30 min of incubation. Each value represents mean \pm S.E.M. (n = 5).

* $p < 0.05$ vs. control, paired Student's t test; a = $p < 0.05$ vs. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, b = $p < 0.05$ vs. 250, c = $p < 0.05$ vs. 500, ANOVA/Duncan; # = $p < 0.05$ vs. previous incubation time, ANOVA/Duncan.

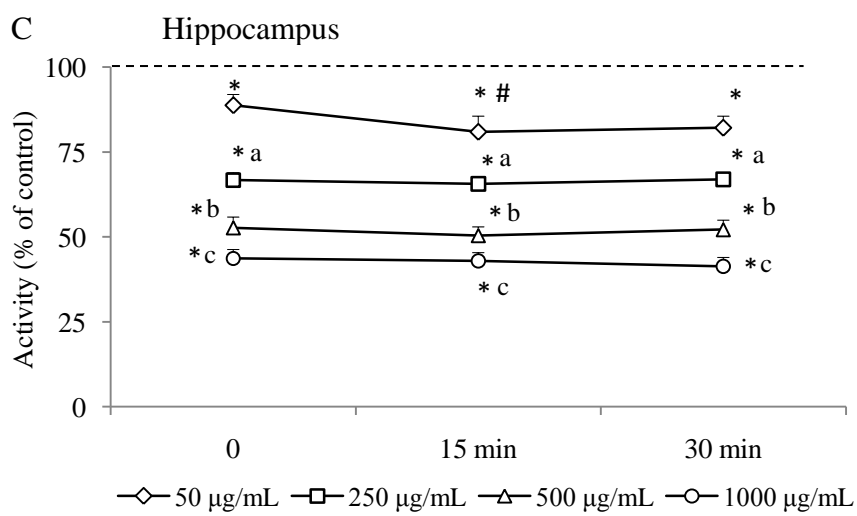
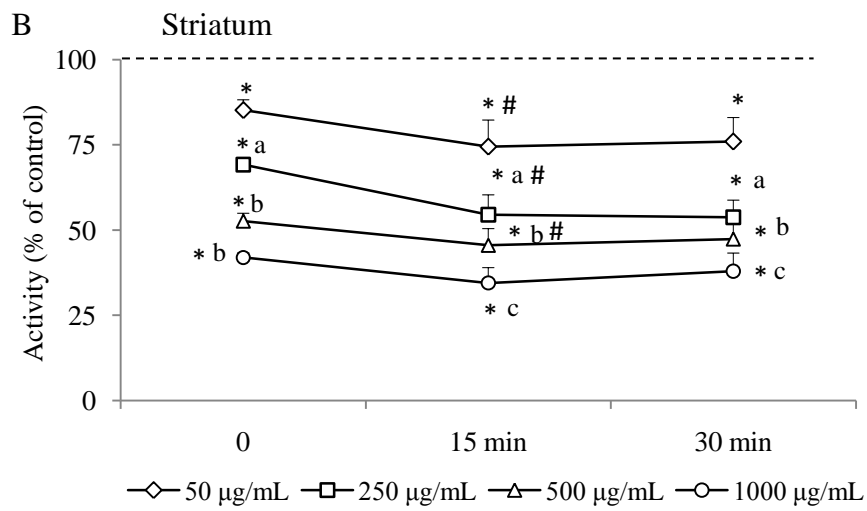
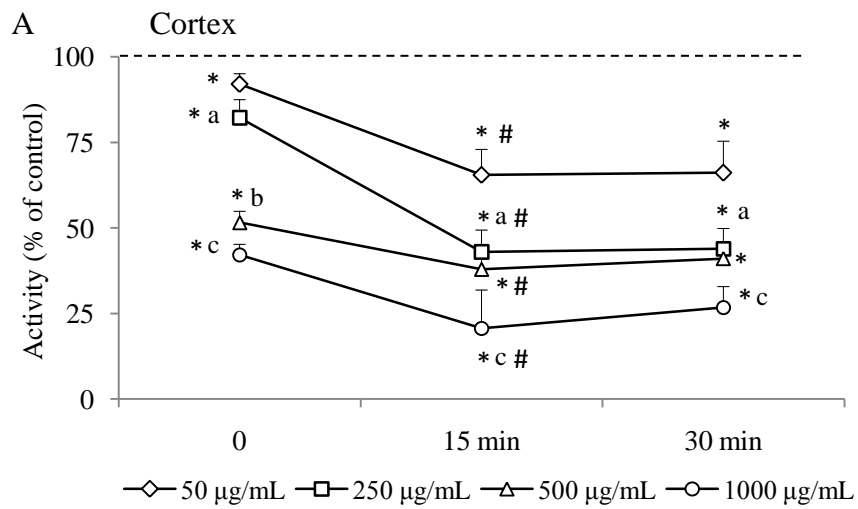


Figure 3.

Effect of *Lycopodium thyoides* AE (50, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$) on AChE activity in rat cortex, striatum and hippocampus. AChE activity (as percentage of the DMSO control group) at 0, 15 and 30 min of incubation. Each value represents mean \pm S.E.M. (n = 5).

* $p < 0.05$ vs. control, paired Student's t test; a = $p < 0.05$ vs. 50 $\mu\text{g/mL}$, b = $p < 0.05$ vs. 250, c = $p < 0.05$ vs. 500, ANOVA/Duncan; # = $p < 0.05$ vs. previous incubation time, ANOVA/Duncan.

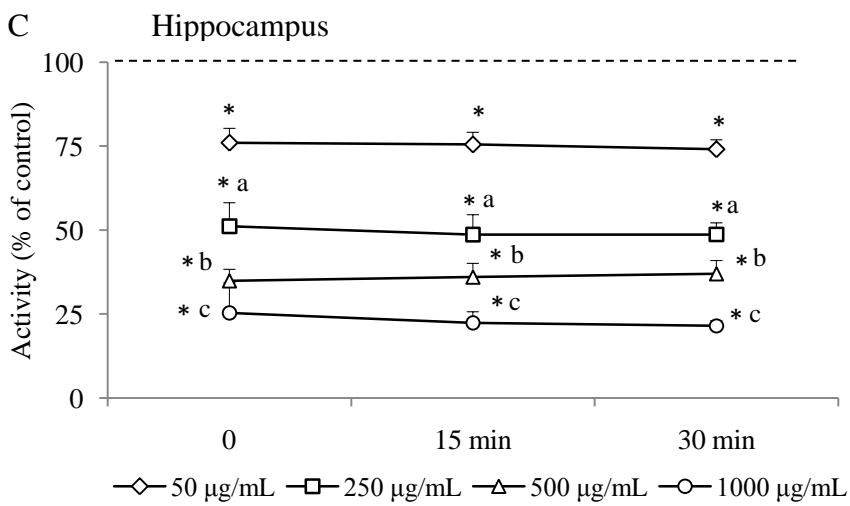
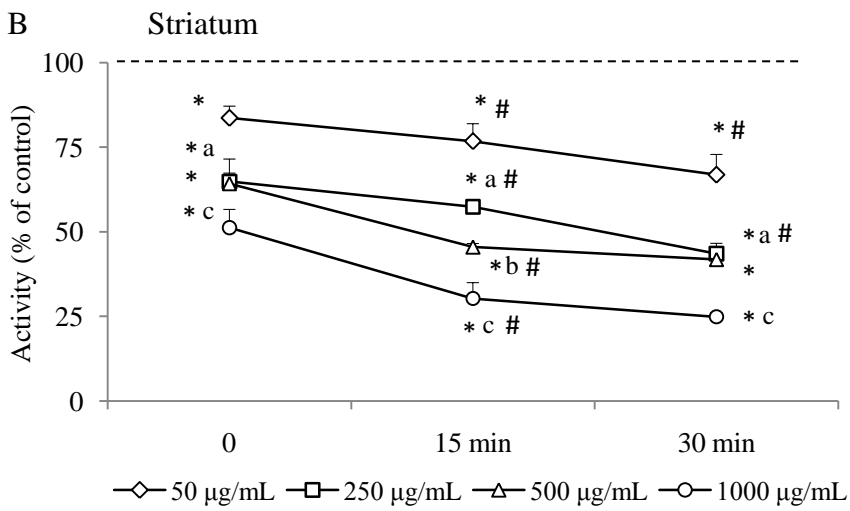
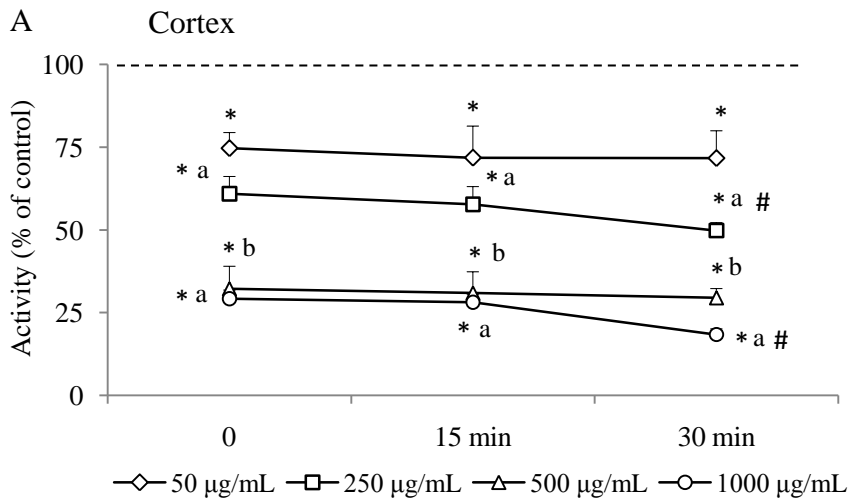


Figure 4.

Lineweaver-Burk plots of AChE activity over a range of substrate concentrations (0.01 to 0.08 mM) from striatum samples, in the absence or presence of AE (50, 100 and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of *Lycopodium clavatum* (Fig. 4A) and *Lycopodium thyoides* (Fig. 4B).

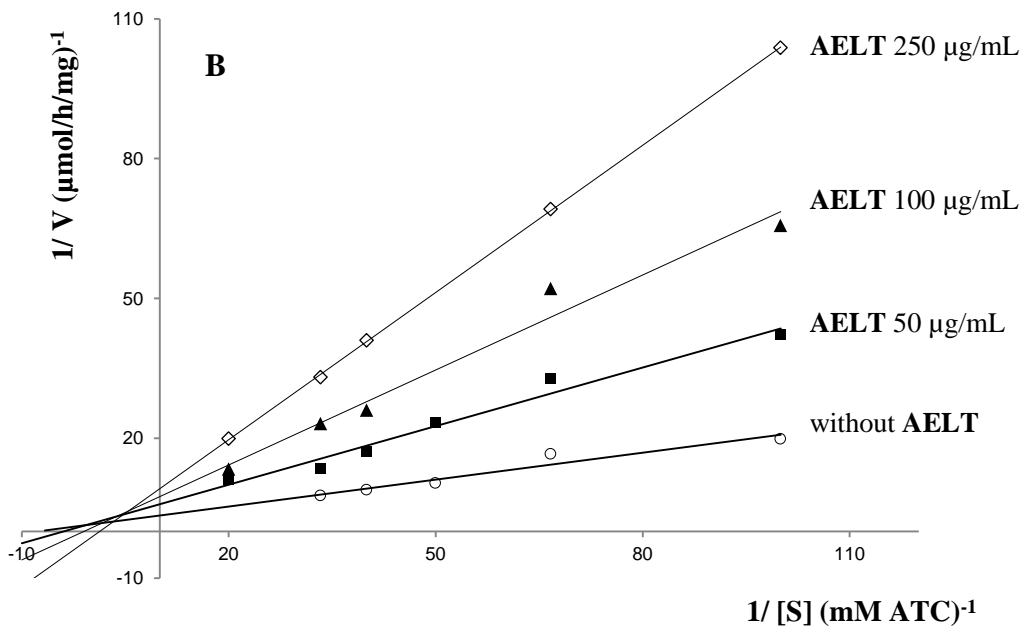
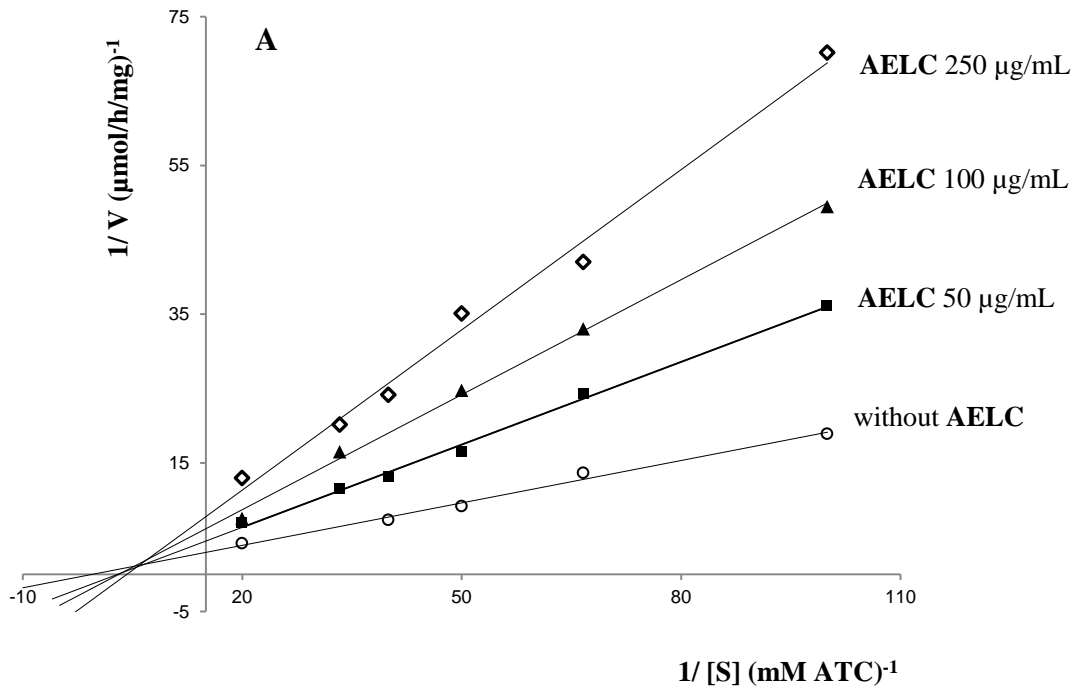


Figure 5

Effects of *Lycopodium clavatum* and *Lycopodium thyoides* AE (10 and 25 mg/kg) on lipid damage (thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) in brain regions from aging mice. Data is expressed as percentage of saline (mean \pm S.E.M.). The absolute mean TBARS values for saline group were 0.26 ± 0.04 (cortex), 0.19 ± 0.03 (hippocampus) and 0.27 ± 0.01 (cerebellum) (nmol MDA/ mg protein). ANOVA followed by Duncan's test ($p < 0.05$), *as compared to saline group, + as compared to previous dose.

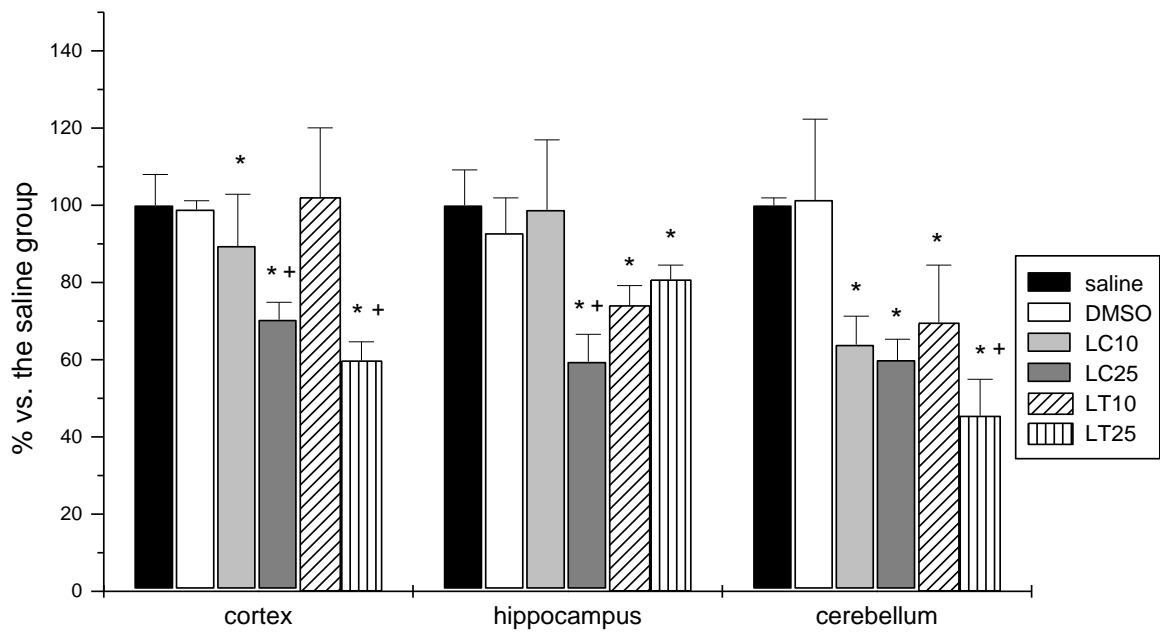
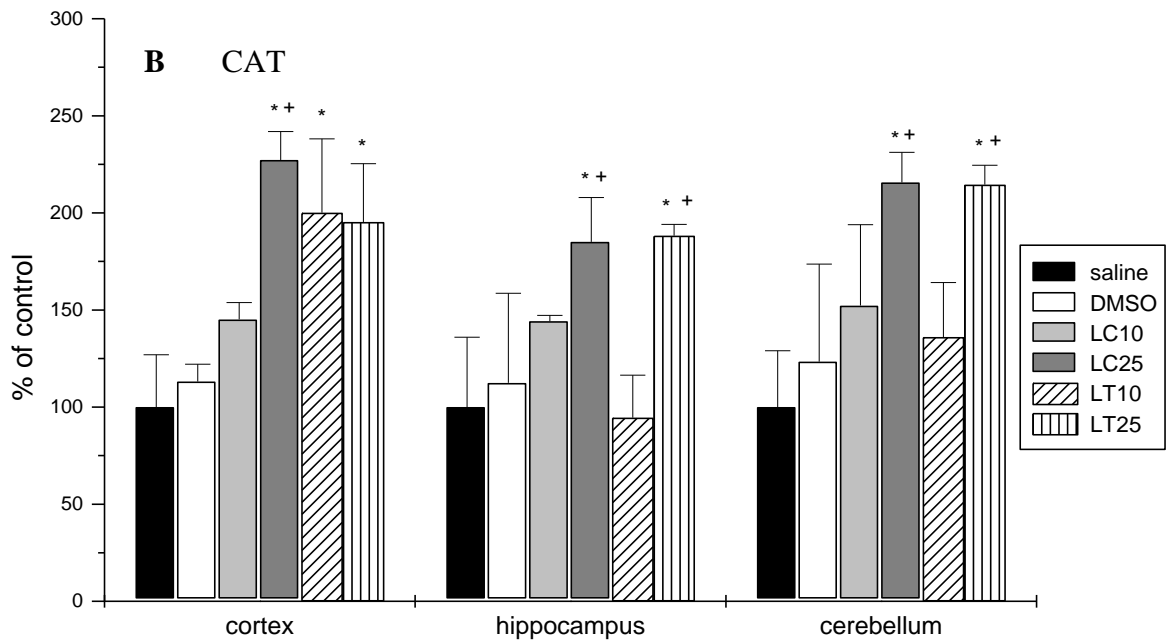
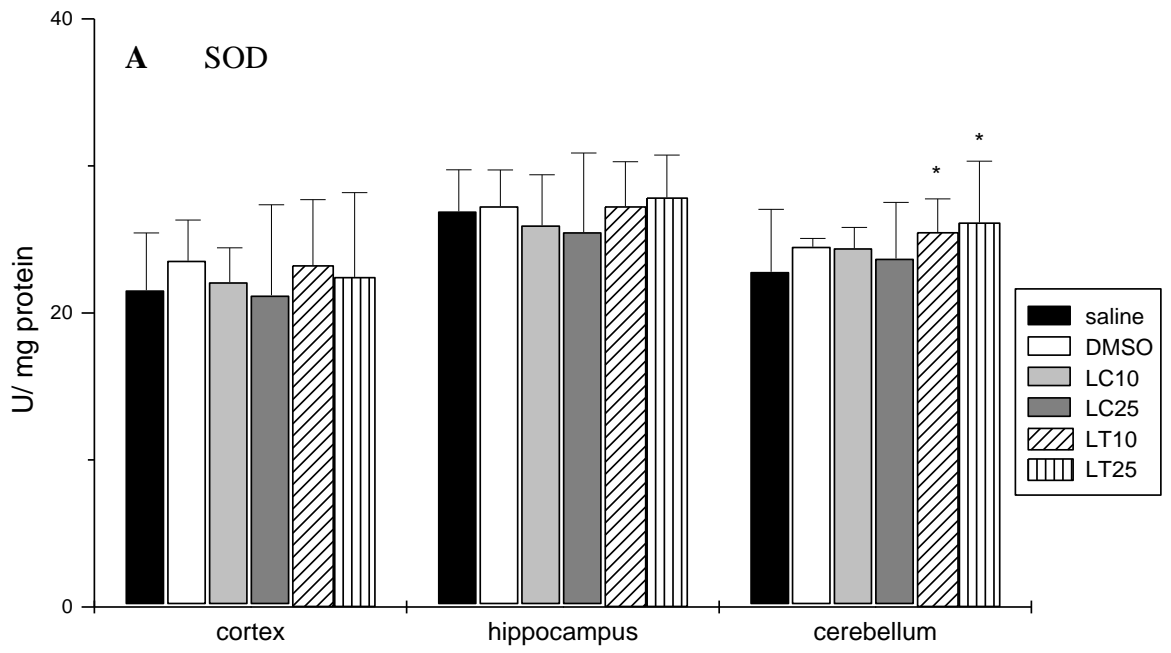


Figure 6

Effects of *Lycopodium clavatum* and *Lycopodium thyoides* AE on antioxidant enzymes (SOD 6A and CAT 6B) activities in brain regions from aging mice. The mean SOD values from saline groups were 19.5 ± 3.8 (cortex), 26.9 ± 2.8 (hippocampus) and 22.8 ± 4.2 U enzyme/ mg protein (cerebellum). The mean CAT values from saline groups were 1.1 ± 0.08 (cortex), 1.0 ± 0.4 (hippocampus) and 1.2 ± 0.5 U enzyme/ mg protein (cerebellum). ANOVA followed by Duncan's test ($p < 0.05$), * as compared to saline group, + as compared to previous dose.



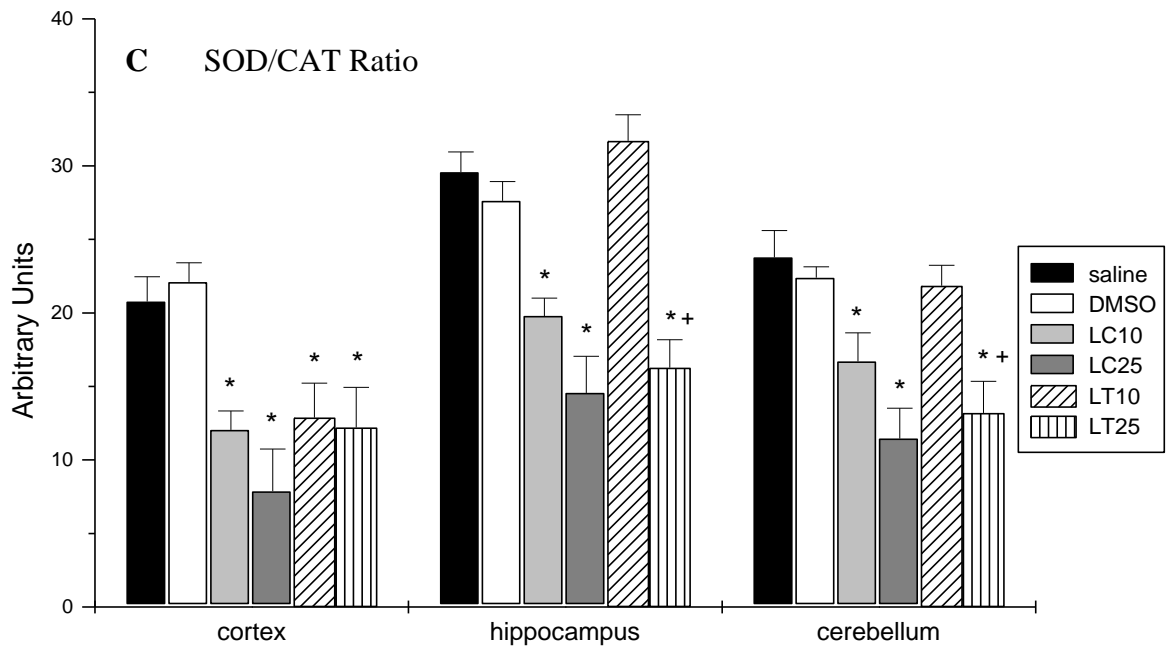


Table 1

Percentage of activity relative to the corresponding control induced by the AE of *Lycopodium clavatum* and *Lycopodium thyoides*, observed on 2-deoxyribose degradation, nitric oxide production, DPPH radical scavenging activity and total reactive antioxidant potential (TRAP) assays. ANOVA followed by Duncan's test ($p < 0.05$), * as compared to control group, + as compared to previous dose.

Treatment groups	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	2-deoxyribose degradation	Nitric oxide production	DPPH decoloration	TRAP assay
AELC	2500	$24.1 \pm 3.3^*$	$58.7 \pm 2.9^*$	-	$80.3 \pm 2.0^{*a}$
	1000	8.0 ± 1.8	$58.5 \pm 1.4^*$	-	$70.3 \pm 0.9^{*a}$
	500	4.7 ± 2.9	$52.7 \pm 2.6^{*a}$	$91.7 \pm 0.6^{*a}$	$47.5 \pm 2.0^{*a}$
	250	4.6 ± 0.3	$31.1 \pm 2.6^*$	$85.6 \pm 4.1^{*a}$	$24.3 \pm 0.6^{*a}$
	50	0.3 ± 1.7	1.7 ± 3.2	$50.1 \pm 3.2^*$	5.8 ± 0.9
AELT	2500	$32.2 \pm 5.9^*$	$49.1 \pm 6.2^*$	-	$84.7 \pm 5.4^{*a}$
	1000	$25.0 \pm 1.2^*$	$48.8 \pm 7.5^{*a}$	-	$76.2 \pm 4.9^{*a}$
	500	$24.4 \pm 1.9^*$	$32.5 \pm 6.0^*$	$83.1 \pm 1.3^{*a}$	$36.2 \pm 3.2^{*a}$
	250	$12.2 \pm 1.5^*$	$23.2 \pm 7.8^*$	$68.7 \pm 0.9^{*a}$	$20.9 \pm 7.7^{*a}$
	50	$5.5 \pm 0.5^*$	$19.7 \pm 1.6^*$	$43.8 \pm 0.2^{*a}$	4.2 ± 1.3

Table 2

Effects of acute administration of *Lycopodium clavatum* and *Lycopodium thyoides* AE (1, 10 and 25 mg/kg i.p.) and huperzine A (0.5 mg/kg i.p.) on AChE activity in mice cortex and hippocampus. All assays were performed in triplicate. Enzyme inhibition is expressed as percentage of control (DMSO-treated mice). Each value represents mean \pm S.E.M. (n = 6). * p <0.05, Student's t test for paired (control/ test) samples.

Treatment groups	Dose (mg/kg)	AChE inhibition (%)	
		Cortex	Hippocampus
AELC	25	46.5 \pm 3.5*	43.1 \pm 1.3*
	10	37.2 \pm 6.6*	18.7 \pm 7.2*
	1	20.1 \pm 6.9*	6.2 \pm 4.3
AELT	25	43.5 \pm 4.4*	54.7 \pm 12.4*
	10	40.7 \pm 7.8*	33.6 \pm 5.5*
	1	28.3 \pm 4.1*	10.0 \pm 2.1
Huperzine A	0.5	64.3 \pm 9.6*	47.5 \pm 0.7*

6. MANUSCRITO III

A ser submetido ao periódico **Biochemical Systematics and Ecology**

7. MANUSCRITO IV

Submetido ao periódico **Phytomedicine**

*HUPERZIA QUADRIFARIATA AND HUPERZIA REFLEXA ALKALOIDS
INHIBIT ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN VIVO*

E.L. Konrath^a, B.M. Neves^a, C.S. Passos^a, P.S. Lunardi^b, M.G. Ortega^c, J.L.
Cabrera^c, C.A. Gonçalves^b, A.T. Henriques^a.

^aPrograma de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre – RS, Brazil.

^bDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Prédio Anexo, 90035-003, Porto Alegre-RS, Brazil.

^cFarmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Cordoba, IMBIV (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, UNC-CONICET) Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina.

Corresponding author: Tel.: +55 51 3308 5258; fax: + 55 51 3308 5243.

E-mail address: edukonrath@yahoo.com.br (E. L. Konrath)

Abstract:

Huperzine A, a *Lycopodium* alkaloid produced by Chinese folk herb *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae), has been shown to be a promising agent for the treatment of Alzheimer's disease for its potent acetylcholinesterase (AChE) activity, as well for its efficacy in the treatment of memory in aged patients. Thus, the effects of two *Huperzia* species of habitat in Brazil (*H. quadrifariata* and *H. reflexa*) with described *in vitro* AChE inhibition were now studied in relation to their effects on mice brain AChE inhibition after a single intraperitoneal (i.p.) injection. The alkaloids extracts were administered to mice in various doses (10, 1 and 0.5 mg/kg) and the acetylcholinesterase activity was measured *post mortem* in two brain areas using the Ellman's colorimetric method. The AChE activity was found to be significantly reduced in both cortex and hippocampus, although less potent than reference inhibitor huperzine A (0.5 mg/kg). Thus, it appears that *H. quadrifariata* and *H. reflexa* alkaloids extracts, shown to inhibit acetylcholinesterase *in vitro*, also has a very potent *in vivo* effect, suggesting that *Huperzia* species may still constitute a promising source of compounds with pharmaceutical interest for Alzheimer's disease.

Keywords: *Huperzia quadrifariata*, *Huperzia reflexa*, Lycopodiaceae, Acetylcholinesterase activity, *Lycopodium* alkaloids, Huperzine A.

Introduction

Cholinesterase inhibitors are currently still the only approved drugs for the treatment of patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease, a neurodegenerative disorder with progressive deficiency of memory and cognitive function (Bartus *et al.*, 1982; Cummings, 2004). The cholinergic hypothesis postulates that memory impairment in patients with Alzheimer's disease result from a deficit of cholinergic function in the brain. The most important changes observed are a decrease in the acetylcholine neurotransmitter as well as in the respective enzymes which synthesize and degrade acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase (AChE) (Perry *et al.*, 1977; Bowen *et al.*, 1982). This way, AChE inhibitors can restore the levels of acetylcholine by inhibiting AChE; however none of them have ability to stop the disease.

Huperzine A, an alkaloid isolated from the Chinese herb *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae), is a reversible, potent and selective AChE inhibitor with a longer duration of action and a better access through the blood-brain barrier. This compound induces significant improvement in the memory of aged patients with Alzheimer's disease with fewer noticeable side effects (Tang *et al.*, 1999; Tang and Han, 1999).

This way, in an attempt to find other AChE inhibitors of plant origin within the family Lycopodiaceae, we have recently screened alkaloids extracts from four *Huperzia* and one *Lycopodiella* species from Brazil for their enzymatic inhibitory effect (Konrath *et al.*, 2011). Among them, the extracts of *Huperzia reflexa* (Lam.) Trevis and *Huperzia quadrifariata* (Bory) Rothn. showed a marked anticholinesterase activity with a selectivity on true acetylcholinesterase, with $IC_{50} = 0.11$ and $2.0 \mu\text{g/mL}$, respectively. These effects are attributed to the *Lycopodium* alkaloids present in the extracts, a group of compounds obtained from club mosses belonging to Lycopodiaceae family, which were found to possess potent anticholinesterase activity (Liu *et al.*, 1986; Liu and Huang, 1994; Ma and Gang, 2004). Within this class of plant metabolites, only a few of them have been

demonstrated to be acetylcholinesterase inhibitors, like huperzine A, which has also reported effect on improving memory and learning (Vincent *et al.*, 1987; Zhang and Wang, 1990).

Considering all these antecedents, the aim of the present study was to conduct further investigations in order to better characterize the anticholinesterase effects through an *in vivo* model, in an attempt to correlate the results obtained, together with the chemical characterization of the above-mentioned extracts. The findings from the present work could suggest that *H. quadrifariata* and *H. reflexa* may be sources of candidate compounds for further research in the treatment of Alzheimer's disease.

Materials and methods

Standards and reagents

Acetylthiocholine iodate, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and huperzine A were obtained from SigmaChemical Co (USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and the buffer salts were purchased from Merck (Germany). Water was treated in a Milli-Q (Millipore, Bedford, Massachusetts) water purification system. All other reagents and organic solvents were of the highest grade available. The extracts were lyophilized and initially dissolved in DMSO; solutions were then diluted in saline immediately before each administration.

Plant material

Aerial parts of *H. quadrifariata* (0.58 kg) and *H. reflexa* (0.092 kg) were collected in Rio Grande do Sul, Brazil, in April 2009 and July 2008, respectively. The material was identified and authenticated by Prof. Dr. Sérgio de Loreto Bordignon from Centro Universitário La Salle. Voucher specimens (HAS 47475 and 45877)

have been deposited in the Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul Herbarium for future reference.

Preparation of extracts and chemical composition

Air dried aerial parts were ground and separately defatted with *n*-hexane using a Soxhlet extractor during 2 days. The remaining plant materials were subsequently extracted with EtOH by the same procedure, until the eluate was negative to Dragendorff's reagent. The EtOH extracts were concentrated under vacuum; the dry residues were suspended in 5% HCl and washed with CH₂Cl₂. The aqueous layers thus obtained were basified with NH₄OH (pH 11) and partitioned with CH₂Cl₂, affording, after filtration under Na₂SO₄, the crude alkaloid extracts (AE). *Huperzia quadrifariata* AE (HQAE) and *Huperzia reflexa* AE (HRAE) were then submitted to a GC-MS analysis on a Perkin-Elmer Qmass-910 apparatus with a capillary column SE 30, 30 m in length in order to verify the chemical composition. The injection volume was 0.5 µL with He as carrier, with the flow rate being 1 ml/min. Temperature program: 140 °C (3 min), 140-250 °C at 5 °C/min, 250 °C (5 min), 250-280 °C at 5 °C/min, 280 °C (5 min). The temperatures of injector, interface and ion source were 300, 280 and 280 °C respectively. The ionization energy was 70 eV and individual alkaloid identifications were made by comparing breakdown patterns with those found in the literature (MacLean, 1963; Alam *et al.*, 1964; Sun *et al.*, 1993; Ortega *et al.*, 2004).

Animals

Swiss albino male mice, CF1 strain (25-35 g) obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) were used. Animals were housed in plastic cages and maintained at 22-23 °C under a 12h light/ dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with free access to food and water. All experiments were conducted blind to the treatment condition of the animals and following the USA *National Institute of*

Health Guidelines for Animal Care and Use and approved by the Animal Care and Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Acetylcholinesterase inhibitory ex vivo assay

Groups of six Swiss albino male mice were treated i.p. (0.1 mL/ 10 g) with different doses of HRAE (10, 1, 0.5 and 0.1 mg/kg), HQAE (10, 1 and 0.5 mg/kg) and huperzine A (0.5 mg/kg). The control animals received the same volume of saline and DMSO 20% (vehicle of administration). Mice were sacrificed 60 min later, brains were quickly removed on ice-cold plate; cortex and hippocampi were dissected out and homogenized in 10 volumes of cold 20 mM phosphate buffer (pH 7.4). The homogenates were centrifuged at 10.000 x g for 10 min and the supernatants were employed as sources of enzyme. All steps were carried out at 4 °C and the total AChE activity was determined using the spectrophotometric method of Ellman *et al.* (1961). Each using brain homogenate preparation was mixed with a buffered solution of Ellman's reagent (10 mM DTNB) and acetylthiocholine at a concentration of 0.8 mM. Hydrolysis rates were measured at 415 nm for 3 min with 30 s intervals, monitored by the formation of the thiolate dianion of DTNB. Percentages of inhibitions were calculated by comparing AChE activity in the aliquots of brain homogenates with activity of mice likewise treated with DMSO.

Protein assay

Total protein concentrations were determined as described by Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

All assays were performed in triplicate and the mean was used for statistical analysis. Data were analyzed by ANOVA followed by the Duncan's multiple range test when the F test was significant. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

Results and discussion

After the discovery that the alkaloid huperzine A is a potent acetylcholinesterase inhibitor and, consequently, very important for the symptomatic treatment of Alzheimer's disease, the interest in the isolation and characterization of alkaloids from Lycopodiaceae has increased exponentially (Liu *et al.*, 1986; Ma and Gang, 2004). In this respect, we initiated the study of some species belonging to this family with habitat in Brazil, and the results of our previous studies showed a promising *in vitro* effect for acetylcholinesterase inhibition (Konrath *et al.*, 2011), which prompted us to further *in vivo* models investigations in order to better characterize such effects.

Figures 1 and 2 show the effects of HQAE (10 - 0.5 mg/kg) and HRAE (10 - 0.1 mg/kg) on AChE activity in hippocampus and cortex of mice. The experimental conditions were validated with huperzine A (0.5 mg/kg), which inhibited the enzyme in all brain regions (64% in cortex and 47.5% in hippocampus) ($p < 0.05$). As already reported, DMSO was devoid of effect ($p > 0.05$) (Siqueira *et al.*, 2003), with no significant differences when compared to saline-treated groups. HQAE inhibited enzyme activity in the cortex, in all doses tested (Fig. 1A), achieving 50.4, 33 and 17% of inhibition ($p < 0.05$), for 10, 1 and 0.5 mg/kg, respectively, while in hippocampus the effect was less marked, with significant inhibitory values of 31 and 20.5% for 10 and 1 mg/kg (Fig. 1B). The AChE activity was also markedly affected by HRAE administration, with a 74, 56 and 43% of inhibition ($p < 0.05$) in

cortex (Fig. 2A) and 53, 22 and 17% in hippocampus (Fig. 2B) for 10 - 0.5 mg/kg, respectively. Only after the administration of the AE in a lower dose (0.1 mg/kg) the extract showed no significant activity on enzyme in brain structures ($p > 0.05$), proving that alkaloidal content in *Huperzia reflexa* possesses a better anticholinesterase inhibitory profile when compared to *Huperzia quadrifariata*.

The results obtained in the current paper suggest that one or more alkaloids present in the extracts following the intraperitoneal administration reach the brain, crossing the blood-brain barrier and inhibit cholinesterase in selected brain areas, consistent with evidence of the already described inhibition of the brain enzyme *in vitro*. The profile of inhibition demonstrated that AChE was preferentially affected in mice cortex following the alkaloids injection. Although spatial learning and memory are closely related to hippocampal function in rodents (Moser *et al.*, 1993), cholinergic deficits in both hippocampus and cortex may occur in Alzheimer's disease, together with atrophy of surviving cholinergic neurons in basal forebrain in aged animals (Muir, 1997).

Ten *Lycopodium* alkaloids belonging to lycopodane and flabellidane groups were detected in the extracts by means of GC-MS (Fig. 3). Among them, clavolonine, acetylclavolonine, lycopodine, 6-hydroxylycopodine and sauroine in HQAE, while in HRAE the presence of the alkaloids lycopodine, 6-hydroxylycopodine, lycodoline, anhydrolycodoline, α -obscurine, des-*N*-methyl- α -obscurine, sauroine and lycodine was confirmed, along with other alkaloid compounds whose structures have not yet been determined. It has been reported that approximately 200 alkaloids were isolated from different species of this family; some of them exhibit a prominent anticholinesterase activity including huperzine B, *N*-demethylhuperzine and sieboldine A (Shen and Chen, 1994; Hirasawa *et al.*, 2003). In this study, we demonstrated that alkaloids present in the extracts manifested AChE inhibitory activity, although they are less potent than huperzine A. However, none of alkaloids detected in the extracts surprisingly correspond with any known acetylcholinesterase inhibitor within this class of compounds. In addition, the observed levels of inhibition are comparable to or greater than those

reported for donepezil and rivastigmine (30 – 46%) by using the same analytical method (Kosasa *et al.*, 1999). Nevertheless, one has to bear in mind that active doses of the extracts are likely to be diminished with further purification of active compounds. Following this line, a bioassay-guided fractionation of the extracts will be conducted in order to identify and isolate the active alkaloid/s, since only few of them have reported anti-AChE activity through *in vitro* assays, and none of them *in vivo*.

Thus, our study demonstrated that *Huperzia quadrifariata* and *Huperzia reflexa* appear as new species of the genus with important anticholinesterase activity, corroborating our previous results. Further research is also necessary to define the actual potential of use in humans, using other models of Alzheimer's disease, and the pharmacological evaluation with isolated alkaloids is in progress in our laboratory.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge financial support received from CAPES, CNPq and FAPERGS (Brazil), SeCyT-UNC and FONCyT (Argentina). The authors are grateful to Prof. Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon (Centro Universitário La Salle, Brazil) and Dr. Rosana M. Sena (Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul) for the identification of the species under study.

References

Alam, S.N., Adams, A.H., MacLean, D.B., 1964. *Lycopodium* alkaloids XV Structure and mass spectra of some minor alkaloids of *Lycopodium flabelliforme*. Can. J. Chem. 42, 2456–2466.

Bartus, B.T., Dean, R.L., Beer, B., Lippa, A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science 217, 408-417.

Bowen, D.M., Benton, J.S., Spillane, J.A., Smith, C.C., Allen, S.J., 1982. Choline acetyltransferase activity and histopathology of frontal neocortex from biopsies of demented patients. *J. Neurol Sci* 57, 191-202.

Cummings, J.L., 2004. Alzheimer's disease. *New English Journal of Medicine* 351, 56-67.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andre Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 27-30.

Hirasawa, Y., Morita, H., Shiro, M., Kobayashi J., 2003. Sieboldine A, a novel tetracyclic alkaloid from *Lycopodium sieboldii*, inhibiting acetylcholinesterase. *Org. Lett.* 5, 3991-3993.

Kosasa, T., Kuriya, Y., Matsui, K., Yamanishi, Y., 1999. Inhibitory effects of donepezil hydrochloride (E2020) on cholinesterase activity in brain and peripheral tissues of young and aged rats. *Eur. J. Pharmacol.* 386 (1), 7-13.

Liu, J.S., Huang, M.F., 1994. The alkaloids huperzines C and D and huperzine from *Lycopodium casuarinoides*. *Phytochemistry* 37, 1759-1761.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Ma, X., Gang, D.R., 2004. The *Lycopodium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 21, 752-772.

MacLean, D.B., 1963. *Lycopodium* alkaloids XIII. Mass spectra of representative alkaloids. *Can. J. Chem.* 41, 2654-2670.

Moser, E., Moser, M.B., Andersen, P., 1993. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci.* 13, 3916–3925.

Muir, J.L., 1997. Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56 (4), 687–696.

Ortega, M.G., Agnese, A.M., Cabrera, J.L., 2004. Anticholinesterase activity in alkaloids extract of *Huperzia saururus*. *Phytomedicine* 11, 539–543.

Ortega, M.G., Vallejo, M.G., Cabrera, J.L., Pérez, M.F., Almirón, R.S., Ramirez, O.A., Agnese, A.M., 2006. *Huperzia saururus*, activity on synaptic transmission in the hippocampus. *Journal of Ethnopharmacology* 104, 374-378.

Perry, E.K., Perry, T.H., Blessed, G., Tomlinson, B.E., 1977. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* 1, 189.

Shen, Y. Ch., Chen, Ch. H., 1994. Alkaloids from *Lycopodium casuarinoides*. *J. Nat. Prod.* 57, 824-826.

Siqueira, I.R., Fochesatto, C., da Silva, A.L., Nunes, D.S., Battastini, A.M., Netto, C.A., Elisabetsky, E., 2003. *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian “nerve tonic”, possesses anticholinesterase activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 645–650.

Sun, C.M., Ho, L.K., Sun, M.L., 1993. Revised stereochemistry of so-called isoselagine and spectroscopic analysis of 6 α -hydroxylycopodine from *Lycopodium serratum* var. *longipetiolatum*. *Planta. Med.* 59, 467–471.

Tang, X.C., Han, Y.F., 1999. Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from Chinese herb. *C.N.S. Drug Rev.* 5, 281-300.

Tang, X.C., He, X.C., Bai, D.L., 1999. Huperzine A: a novel AChE inhibitor. *Drugs Fut.* 24, 647-663.

Vincent, G.P., Rummennick, L., Cumin, R., Martin, J., Sepinwall, J., 1987. The effects of huperzine A, an acetylcholinesterase inhibitor, on the enhancement of memory in mice, rats and monkeys. *Neuroscience Abstracts* 13, 844.

Zhang, C.L., Wang, G.Z., 1990. Effects of huperzine A tablet on memory. *New Drugs and Remedies* 9, 339-341.

Figure 1

Effect of acute administration of alkaloidal extract of *H. quadrifariata*, HQAE (0.5, 1 and 10 mg/kg i.p.) and huperzine A (0.5 mg/kg i.p.) on AChE activity in mice cortex and hippocampus. Enzyme activity is expressed as percentage of control (DMSO treated mice), all assays were performed in triplicates. Each value represents mean \pm S.E.M. (N = 6). * $p < 0.05$ vs control (DMSO); # $p < 0.05$ vs previous dose in Duncan's test comparison after ANOVA.

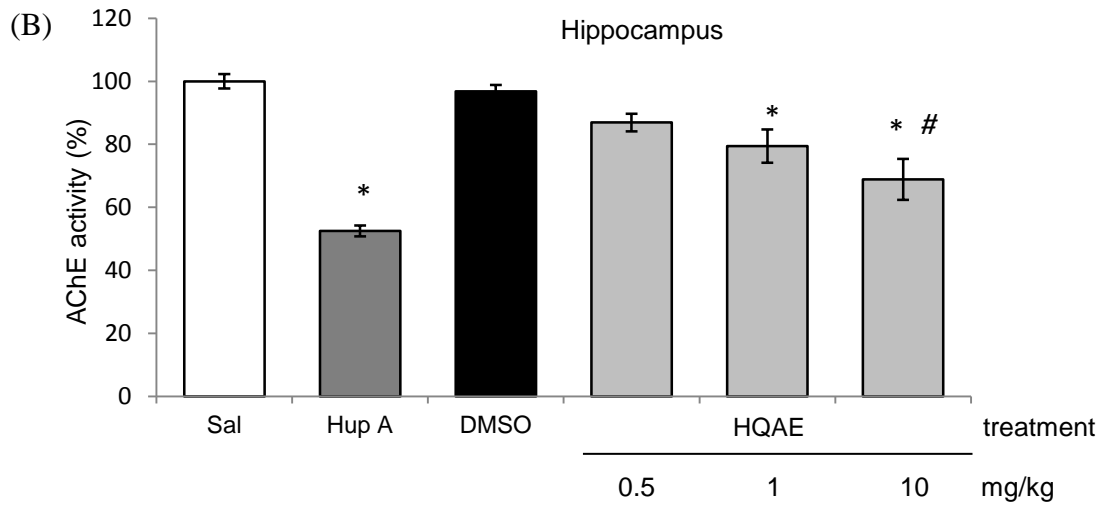
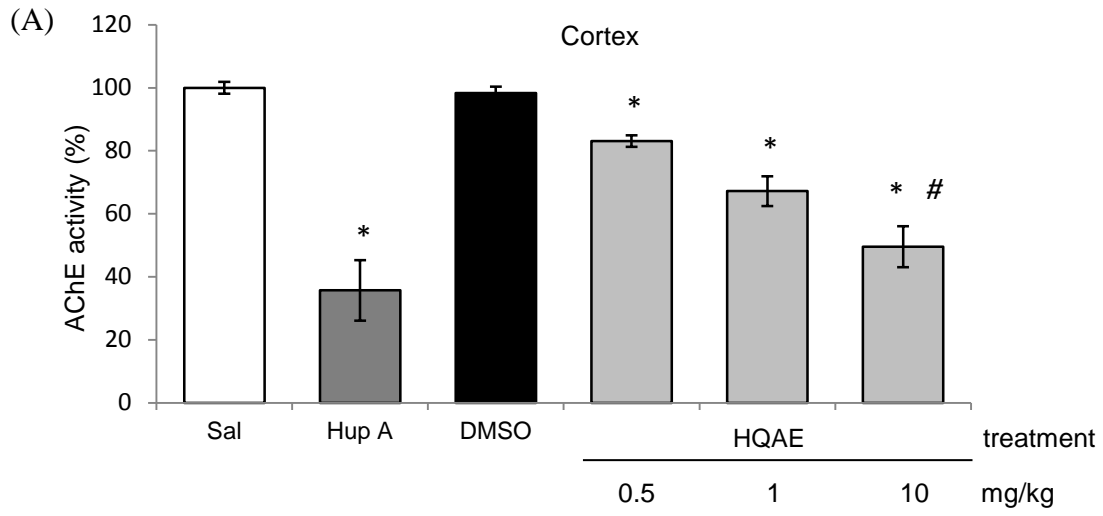


Figure 2

Effect of acute administration of alkaloidal extract of *H. reflexa*, HRAE (0.5, 1 and 10 mg/kg i.p.) and huperzine A (0.5 mg/kg i.p.) on AChE activity in mice cortex and hippocampus. Enzyme activity is expressed as percentage of control (DMSO treated mice), all assays were performed in triplicates. Each value represents mean \pm S.E.M. (N = 6). * $p < 0.05$ vs control (DMSO); # $p < 0.05$ vs previous dose in Duncan's test comparison after ANOVA.

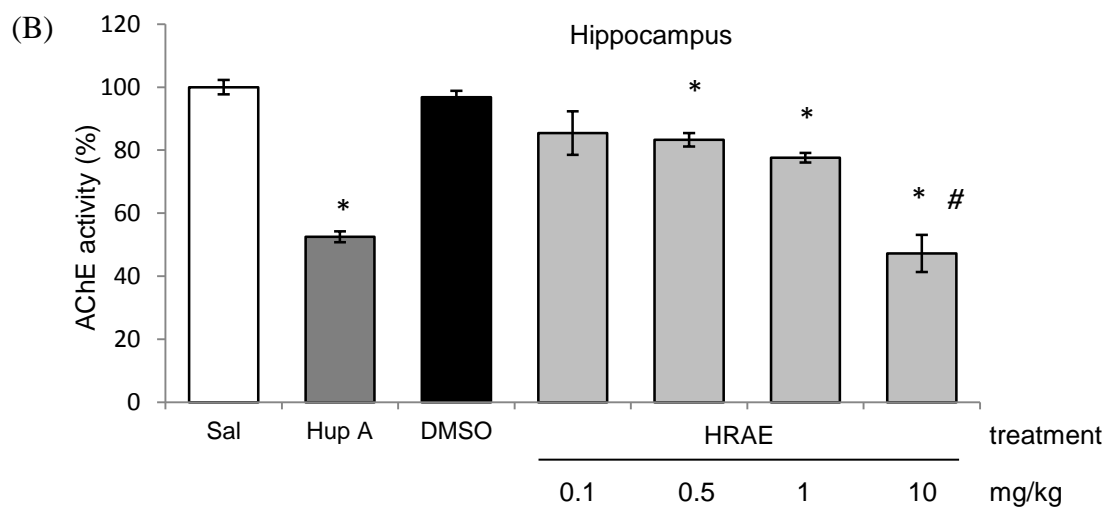
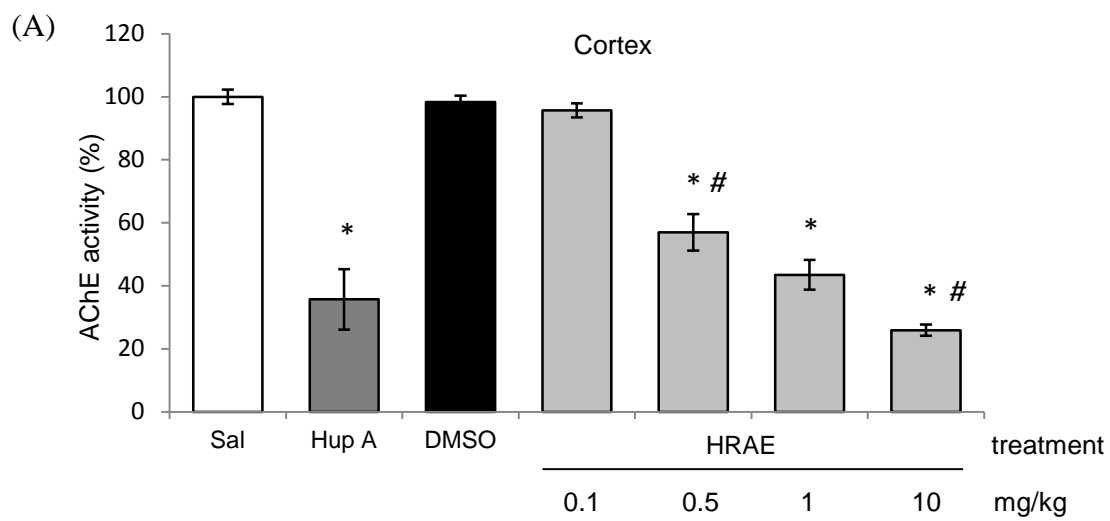
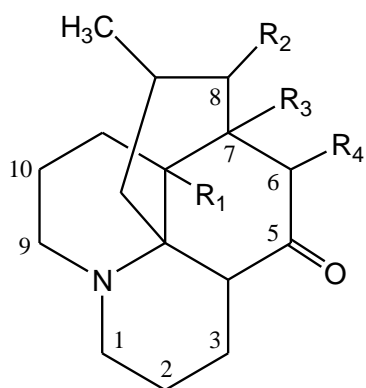


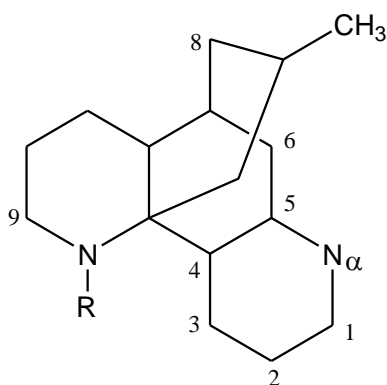
Figure 3

Structures of the *Lycopodium* alkaloids identified in *Huperzia quadrifariata* and *Huperzia reflexa* alkaloidal extracts through CG/MS.



Lycopodine group

$R_1=R_2=R_3=R_4=H$	Lycopodine
$R_1=OH; R_2=R_3=R_4=H$	Lycodoline
$R_2=OH; R_1=R_3=R_4=H$	Clavolonine
$R_2=OAc; R_1=R_3=R_4=H$	Acetylclavolonine
$R_1=R_2=R_3=H; R_4=OH$	6-hydroxylycopodine
$R_2=R_3=OH; R_1=R_4=H$	Sauroine
$R_1=R_2=R_3=R_4=H; \Delta^{11,12}$	Anhydrolycodoline



Lycodine group

$\Delta^{N\alpha,1}; \Delta^{2-3}; \Delta^{4-5}; R=H$	Lycodine
$\Delta^{4,5}; R=CH_3; C_1=O$	α -obscurine
$\Delta^{4,5}; R=H; C_1=O$	Des- <i>N</i> -methyl- α -obscurine

**8. ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS COM ALCALÓIDES E
EXTRATOS DE ALCALÓIDES DE LYCOPODIACEAE**

DISCUSSÃO GERAL

CONCLUSÕES

- No extrato de alcalóides totais de *Huperzia acerosa* foi identificada a presença de licopodina, licodina e flabelina;
- No extrato de alcalóides totais de *Huperzia hetercarpon* nenhum alcalóide pôde ser identificado a partir do perfil de fragmentação obtido;
- No extrato de alcalóides totais de *Huperzia quadrifariata* foi detectada a presença de licopodina, 6-hidróxi licopodina, licodolina, clavolonina, sauroína, juntamente com acetilclavolonina, um alcalóide inédito quanto a sua presença em fonte natural;
- No extrato de alcalóides totais de *Huperzia reflexa* foi detectada a presença de licopodina, licodina, anidrolícolina, lícolina, 6-hidróxi licopodina, α -obscurina/sauroxina e des-*N*-metil- α -obscurina;
- Em *Huperzia quadrifariata*, um alcalóide de M^+ 272 foi isolado na forma de uma mistura com seu possível isômero, ainda não identificado;
- Em *Huperzia reflexa*, um alcalóide de M^+ 245 desconhecido foi detectado no extrato de alcalóides totais, permanecendo não identificado;
- No extrato de alcalóides totais de *Lycopodiella cernua* foi detectada a presença de cernuína e licocernuína;
- No extrato de alcalóides totais de *Lycopodium clavatum* foi detectada a presença de licopodina, acetildiídrolicopodina, lícolina, α -obscurina, licodina, clavolonina e *N*-metil lícolina, um produto inédito para a espécie;
- No extrato de alcalóides totais de *Lycopodium thyoides* foi detectada a presença de licopodina, acetildiídrolicopodina, flabeliformina, lícolina, flabelidina, lícolina e α -obscurina;
- Quanto à inibição *in vitro* para a acetilcolinesterase, a ordem de inibição dos extratos é *Huperzia reflexa* > *Huperzia quadrifariata* > *Huperzia acerosa* > *Huperzia hetercarpon* > *Lycopodiella cernua*;
- Quanto à inibição *in vitro* para a butirilcolinesterase, a ordem de inibição dos extratos é *Huperzia quadrifariata* > *Huperzia reflexa* > *Huperzia*

heterocarpon, sendo esta espécie mais seletiva quanto à inibição para esta enzima quando comparada à acetilcolinesterase;

- Os EAT de *Lycopodium clavatum* e *Lycopodium thyoides* inibiram de maneira dose- e tempo-dependente a enzima acetilcolinesterase *in vitro* em homogenatos de córtex, hipocampo e estriato de ratos, assim como promoveram inibição após administração por via i.p. em córtex e hipocampo de camundongos;
- Os EAT de *Lycopodium clavatum* e *Lycopodium thyoides* também demonstram efeito antioxidante *in vitro* em distintos métodos, assim como após administração por via i.p. em córtex, cerebelo e hipocampo de camundongos, quanto às enzimas CAT, SOD e o método de TBARS;
- Similaridades químicas e biológicas foram verificadas para espécies de *Lycopodium clavatum* e *Lycopodium thyoides* coletadas no Brasil e na Argentina;
- O EAT de *Lycopodium clavatum* é mais ativo que *Lycopodium thyoides*, embora ambos sejam muito menos potentes que os demais extratos analisados;
- Os EAT de *Huperzia quadrifariata* e *Huperzia reflexa* promoveram um potente efeito anticolinesterásico *in vivo* a partir de sua administração por via i.p. em camundongos;
- Dentre os alcalóides isolados neste trabalho (acetildiidrolicopodina, licopodina, cernuína, licocernuína e clavolonina), apenas cernuína e acetildiidrolicopodina obtiveram efeitos significativos sobre a inibição da enzima acetilcolinesterase;
- Em relação à toxicidade celular, os EAT são ativos em concentrações inferiores às aquelas onde efeitos tóxicos foram observados em uma linhagem celular de gliomas C6 durante 24 horas de incubação, com a exceção dos extratos de *Lycopodium*.

PERSPECTIVAS

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

- Realização de estudos de determinação dos efeitos sobre a transmissão sináptica hipocampal através de ensaios de latenciação de longa duração (LTP) a fim de se complementar o entendimento do mecanismo de ação dos extratos de alcalóides mais ativos frente à inibição da AChE;
- Prosseguimento do processo de isolamento dos alcalóides presentes nos extratos de *Huperzia quadrifariata* e *Huperzia reflexa*, para determinar quais são os responsáveis pelo grande efeito inibitório observado;
- Isolamento dos compostos de M+ 272 e M+ 245 ainda desconhecidos e presentes nos extratos de alcalóides;
- Investigação da relação entre a atividade inibitória para a AChE e a cognição e memória através de ensaios in vivo para os extratos;
- Realização de estudos de citotoxicidade com outras linhagens celulares ou outros modelos de estudo a fim de verificar com mais detalhes os possíveis efeitos tóxicos de *Lycopodium clavatum* e *Lycopodium thyoides*;
- Determinação do perfil metabolômico para diferentes espécies de Lycopodiáceas de ocorrência no Brasil e no México, realizadas através de espectroscopia de RMN- ^1H e de análise multivariada de dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.; GMÜNDER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age-related brain disorders – a survey of ethnobotanical literature. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 363- 381, 2007.

ADSERSEN, A.; KJØLBYE, A.; DALL, O.; JÄGER, A.K. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 179-182, 2007.

AISEN, P.S. The development of anti-amyloid therapy for Alzheimer's disease: from secretase modulators to polymerization inhibitors. *CNS Drugs*, v. 19, p. 989-996, 2005.

ALAM, S.N., ADAMS, A.H., MACLEAN, D.B. *Lycopodium* alkaloids XV Structure and mass spectra of some minor alkaloids of *Lycopodium flabelliforme*. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 42, p. 2456–2466, 1964.

ALCALÁ, M.; VIVAS, N.; HOSPITAL, S.; CAMPS, P.; MUÑOZ-TORRERO, D.; BADÍA, A. Characterisation of the anticholinesterase activity of two new tacrine-huperzine A hybrids. *Neuropharmacology*, v. 44, p. 749-755, 2003.

ANET, F.A.L.; EVES, C.R. Lycodine, a new alkaloid of *Lycopodium annotinum*. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 36, p. 902–909, 1958.

AYER, W.A.; BROWNE, L.M.; ELGERSMA, A.W.; SINGER, P.P. Identification of some L-numbered *Lycopodium* alkaloids. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 68, p. 1300-1304, 1990.

AYER, W.A.; DIKKO, S. Alkaloids of *Lycopodium thyoides* and *L. contiguum*. *Phytochemistry*, v. 13, p.653-654, 1974.

AYER, W.A.; JENKINS, J.K.; PIERS, K.; VALVERDE-LOPEZ, S. The alkaloids of *Lycopodium cernuum* L11. The stereochemistry of cernuine and lycocernuine. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 45, p. 445-450, 1967.

AYER, W.A.; TRIFONOV, L.S. The *Lycopodium* alkaloids. In: BROSSI, A. (Ed.), *The Alkaloids*, v. 45. New York: Academic Press, p. 233. (1994).

BALLARD, C.G.; GREIG, N.H.; GUILLOZET-BONGAARTS, A.L.; ENZ, A.; DARVESH, S. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Current Alzheimer Research*, v. 2, p. 307-318, 2005.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARINAGA, M. Missing Alzheimer's gene found. *Science*. v. 269, p. 917-918, 1995.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. In: BARREIRO, E. J.; FRAGA, C.A.M. (Ed.) *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, 1ª. Ed. Porto Alegre: Artmed Editora (2001).

BARROS, I.C.L.; SANTIAGO, A.C.P.; XAVIER, S.R.S.; SILVA, M.R.; LUNA, C.P.L. Diversidade e aspectos ecológicos das pteridófitas (avencas, samambaias e plantas afins) ocorrentes em Pernambuco. In: TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (Eds.). *Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco*. Editora Massangana e Sectma, Recife, p. 172. (2002).

BARTUS, R.T.; EMERICH, D.F. Cholinergic markers in Alzheimer's disease. *Journal of the Medical Association*, v. 282, p. 2208–2209, 1999.

BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L.; SWEET, W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, v. 161, p. 370-371, 1968.

BERG, L.; McKEEL, D.W.; MILLER, J.P.; BATY, J.; MORRIS, J.C. Neurophatological indexes of Alzheimer's disease in demented and nondemented persons aged 80 years and older. *Archives of Neurology*, v. 50, n. 4, p. 349-358, 1993.

BLASCHEK, W.; HÄNSEL, R.; KELLER, K.; REICHLING, J.; RIMPLER, H.; SCHNEIDER, G. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1998.

BLENNOW, K.; DE LEON, M.J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. *The Lancet*, v. 368, p. 387–403, 2006.

BLISS, T.V.P., COLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature*, v. 361, p. 31–39, 1993.

BRAEKMAN, J.C.; NYEMBO, L.; BOURDOUX, P.; KAHINDO, N.; HOOTELE, C. Distribution des alcaloides dans le genre *Lycopodium*. *Phytochemistry*, v. 13, p.2519-2528, 1974.

BRUCE J.G. Gametophytes and subgeneric concepts in *Lycopodium*. *American Journal of Botany*, v. 63, p. 919-924, 1976.

BRUNETON J. In: BRUNETON, J. (Ed.) *Pharmacognosie et Phytochimie de Plantes médicinales*. Paris: Technique & Documentation, 3^{ème} éd. (1999).

BRUNETON, J. Alcaloides. In: BRUNETON, J. (Ed.) *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Zaragoza: Acribia, 2^a. ed., pp. 594. (1993).

BURNS, A.; BYRNE, E.J.; MAURER, K. Alzheimer's disease. *The Lancet*, v. 360, p.163-165, 2002.

CAMPS, P.; EL ACHAB, R.; GÖRBIG, D. M.; MORRAL, J.; MUÑOZ-TORRERO, D.; BADÍA, A.; BAÑOS, J.; VIVAS, N.; BARRIL, X.; OROZCO, M.; LUQUE, F. Synthesis, *in vitro* pharmacology, and molecular modeling of very potent tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, p. 3227-3242, 1999.

CANTUTI-CASTELVETRI, I.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 18, p. 367-381, 2000.

CASSERLY, I. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. *The Lancet*, v. 9415, p. 1139-1146, 2004.

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M.L.; MINARINI, A.; ROSINI, M.; TUMIATTI, V.; RECANATINI, M.; MELCHIORRE, C. Multi-target-directed-ligands to combat neurodegenerative diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, p. 347-372, 2008.

CHEN H.S.; LIPTON, S.A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry*, v. 97, p. 1611-1626, 2006.

CHIU, S. S.; LALONE, S.; GOBLE, L. Pharmacology of huperzine A, an alkaloid isolated from *Huperzia serrata*, a novel cognition enhancer with dual cholinergic and NMDA action. Implications in schizophrenia and dementia. *Journal of Complementary and integrative Medicine*, v. 4, p. 1-14, 2007.

CHIU, H.F.; ZHANG, M. Dementia research in China. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 15, p. 947-953, 2000.

CHOO, C.Y.; HIRASAWA, Y.; KARIMATA, C.; KOYAMA, C.; SEKIGUSHI, M.; KOBAYASHID, J.; MORITA, H. Carinatumins A-C, new alkaloids from *Lycopodium carinatum* inhibiting acetylcholinesterase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 1703-1707, 2007.

CHURCHER, I. Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 6, p. 579-595, 2006.

CITRON, M. Emerging Alzheimer's disease therapies: inhibition of β -secretase. *Neurobiology of Aging*, v. 23, p. 1017-1022, 2002.

CITRON, M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 5, p. 677-685, 2004.

COLOMBRES, M.; SAGAL, J.P.; INESTROSA, N.C. An overview of the current and novel drugs for Alzheimer's disease with particular reference to anti-cholinesterase compounds. *Current Pharmaceutical Design*, v. 10, p. 3121-3130, 2004.

CONWAY, K.A.; BAXTER, E.W.; FELSENSTEIN, K.M.; REITZ, A.B. Emerging β -amyloid therapies for the treatment of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, v. 9, p. 427-447, 2003.

CONROY, H. Biogenesis of *Lycopodium* alkaloids. *Tetrahedron Letters*, p. 34-37, 1960.

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

COYLE J.T. *Alzheimer's disease*. In: ADELMAN, G (Ed.) *Encyclopedia of Neuroscience*. Birkhäuser, Boston, v. 1, p. 29-31. (1987).

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.

CUMMINGS, J.L. The role of cholinergic agents in the management of behavioural disturbances in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 3, p. 21-29, 2000.

CUTLER, N.R.; SRAMEK, J.J. Review of the next generation of Alzheimer's disease therapeutics: challenges for drug development. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 25, p. 27-57, 2001.

DAVIES, P.; MALONEY, A.J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *The Lancet*, v. 2, 1403. 1976.

DE FELICE, F.G.; WU, D.; LAMBERT, M.P.; FERNANDEZ, S.J.; VELASCO, P.T.; LACOR, P.N.; BIGIO, E.H.; JERECIC, J.; ACTON, P.J.; SHUGHRUE, P.J.; CHEN-DODSON, E.; KINNEY, G.G.; KLEIN, W.L. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A β oligomers. *Neurobiology of Aging*, v. 29, p. 1334-1347, 2008.

DE STROOPER, B.; ANNAERT, W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *Journal of Cellular Science*, v. 113, p. 1857-1870, 2000.

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

DOOLEY, M.; LAMB, H.M. Donepezil: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs & Aging*, v. 16, p. 199-226, 2000.

DUGAN, L.L.; CHOI, D.W. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In: SIEGEL, G. J., AGRANOFF, B. W., ALBERS, R. W., MOLINOFF, P. B. (Ed.) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. New York: Raven Press, 6th.ed., 1080 pp. (1999).

DUKE, J.A.; AYENSU, E.S. *Medicinal plants of China* Vol II. Michigan: Reference Publications Inc., pp.125. (1985).

ELLEMANN, L. Appendix to plants used by the Saraguros. In: BALSLEV, H. & B. ØLLGARD (Eds). *Plants Used by the Saraguros*. Botanisk Institut, Aarhus Universitet, Aarhus, pp. 1-46, 1990.

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

ERDŐ, S.L., MOLNÁR, P., LAKICS, V., BENCE, J.Z. TÖMÖSKÖZI, Z. Vincamine and vincanol are potent blockers of voltage-gated Na⁺ channels. *European Journal of Pharmacology*, v. 314, p.69-73, 1996.

FALLARERO, A.; OINONEN, P.; GUPTA, S.; BLOM, P.; GALKIN, A.; MOHAN, C.G.; VUORELA, P.M. Inhibition of acetylcholinesterase by coumarins: the case of coumarin 106. *Pharmacological Research*, v. 58, p. 215-228, 2008.

FANG, L.; KRAUS, B.; LEHMANN, J.; HEILMANN, J.; ZHANG, Y.; DECKER, M. Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 18, p. 2905-2909, 2008.

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

FERRI, C.P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C.; BRODATY, H.; FRATIGLIONE, L.; GANGULI, M.; HALL, K.; HASEGAWA, K.; HENDRIE, H.; HUANG, Y.; JORM, A.; MATHERS, C.; MENEZES, P.R.; RIMMER, E.; SCAZUFCA, M.; Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*, v. 366, p. 2112–17, 2005.

FORETTE, F.; ANAND, R.; GHARABAWI, G.; A phase II in patients with Alzheimer disease to assess the preliminary with efficacy and maximum tolerated dose of rivastigmine (Exelom). *European Journal of Neurology*, v. 6, p. 423-429, 1999.

FORMAN, H.J. Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 42, p. 926-932, 2007.

FORMAN, M.S.; TROJANOWSKY, J.Q.; LEE, V.M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine*, v. 10, n. 10, p. 1055-1063, 2004.

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

GALATI, G.; SAVZEBARI, O.; WILSON, J.; O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxy radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, v. 177, p. 91-104, 2002.

GANELLIN, C.R. General approaches to discovering new drugs: an historical perspective. In: GANELLIN, C.R.; ROBERTS, S.M. (Ed.) *Medicinal Chemistry: The Role of Organic Chemistry in Drug Research*. London: Academic, 2nd. Ed., pp. 302. (1993).

GARCÍA-PÉREZ, M.E.; ROYER, M.; DUQUE-FERNANDEZ, A.; DIOUF, P.N.; STEVANOVIC, T.; POULIOT, R. Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 132, p. 251-258, 2010.

GAUTHIER, S.; SCHELTENS, F. Can we do better in developing new drugs for Alzheimer's disease? *Alzheimer's and Dementia*, v. 5, p. 489-491, 2009.

GEBHARDT, R. *In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. *Planta Medica*, v. 66, p. 99-105, 2000.

GERARD, R.; MACLEAN, D.B. GC/MS examination of four *Lycopodium* species for alkaloid content. *Phytochemistry*, v. 25, p. 1143-1150, 1986.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease therapy: from tacrine to future applications. *Neurochemistry International*, v. 32, p. 413-419, 1998.

GIFFORD E.M., FOSTER A.S. *Morphology and evolution of vascular plants*, 3rd ed., W. H. Freeman and Company, New York, 1989.

GOMES, N.G.M.; CAMPOS, M.; ÓRFÃO, J.M.C.; RIBEIRO, C.A.F. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 33, p. 1372-1789, 2009.

GREIG, N.H.; SAMBAMURTI, K.; YU, Q.S.; BROSSI, A.; BRUINSMA, G.B.; LAHIRI, D.K. An overview of phenserine tartrate, a novel acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, v. 2, p. 281-290, 2005.

HAASS, C.; DE STROOPER, B. The presenilins in Alzheimer's disease - proteolysis holds the key. *Science*, v. 286, p. 916-919, 1999.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of Epidemiology*, v. 15, p. 686-699, 2005.

HALLDORSÐOTTIR, E.S.; JAROSZEWSKI, J.W.; OLAFSDOTTIR, E.S. Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the Icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. *alpestre*. *Phytochemistry*, v. 71, p. 149-157, 2010.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or prooxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 476, p. 107-112, 2008

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, v. 97, p. 1634- 1658, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 1-63, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. (Eds) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University, 3rd ed., 636 p. (1999).

HARDMAN J.G., LIMBIRD L.E., GILMAN A.G. Anticholinesterase agents. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., MacGraw-Hill, New-York (2001).

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

HATTERS, D.M.; PETERS-LIBEU, C.A.; WEISGRABER, K.H. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 31, p. 445-454, 2006.

HEBERT, L.E.; SCHERR, P.A.; BIERRLAS, J.R.; BENNETT, D.A.; EVANS, D.A. Alzheimer disease in the U.S. population: prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of Neurology*, v. 60, p. 1119-1122, 2003.

HELMUTH, L. New therapies. New Alzheimer's treatments that may ease the mind. *Science*, v. 297, n. 5585, p. 1260-1262, 2002.

HEMSCHEIDT, T.; SPENSER, I.D. A classical paradigm of alkaloid biogenesis revisited: acetonedicarboxylic acid as an intermediate in the biosynthesis of lycopodium. *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, 1799–1800, 1996.

HIRASAWA, Y.; MORITA, H.; SHIRO, M.; KOBAYASHI J. Sieboldine A, a novel tetracyclic alkaloid from *Lycopodium sieboldii*, inhibiting acetylcholinesterase. *Organic Letters*, v. 5, p. 3991-3993, 2003.

HOCK, F.J. Therapeutic approaches for memory impairments. *Behavioural Brain Research*, v. 66, p. 143-150, 1995.

HOFFMAN, C.; RICE, D.; SUNG, H.Y. Persons with chronic conditions. Their prevalence and costs. *Journal of the American Medical Association*, v. 276, p. 1473-1479, 1996.

HOLUB, J. *Lycopodiella*, eine neue Gattung der Ordnung *Lycopodiales*. *Preslia*, v. 36, p. 16-22, 1964.

HOLUB, J. Transfers of *Lycopodium* species to *Huperzia*: with a note on generic classification in Huperziaceae. *Folia Geobotanica*, v. 20, p. 67-80, 1985.

HOLUB, J. Some taxonomic changes within *Lycopodiales*. *Folia Geobotanica*, v. 26, p. 81-94, 1991.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. A procura dos princípios ativos. In: HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C (Ed.) *Princípios ativos de plantas Superiores*. São Carlos: EdUFSCar, 152 pp. (2003).

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

HOWES, M.R.; HOUGHTON, P.J. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 75, p. 513-527, 2003.

HOWES, M.R.; PERRY, N.S.; 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.

HOYER, S. Memory function and brain glucose metabolism. *Pharmacopsychiatry*, v. 36, p. S62-S67, 2003.

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

HURREL, J.; DE LA SOTA, E. Etnobotánica de las pteridófitas de los pastizales de altura de Santa Victoria (Salta, Argentina). *Revista Museo La Plata XIV*, Ser. Botánica 343-364, 1996.

JEON, S.Y.; BAE, K.; SEONG, Y.H.; SONG, K.S. Green tea catechins as a BACE1 (β -secretase) inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 13, p. 3905-3908, 2003.

JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B.; DENISOVA, N.A.; PRIOR, R.L.; CAO, G.; MARTIN, A.; TAGLIALATELA, G.; BICKFORD, P.C. Long-term dietary strawberry, spinach or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *Journal of Neurosciences*, v. 18, p. 8047-8055, 1998.

JUNG, H.A.; MIN, B.S.; YOKOSAWA, T.; LEE, J.H.; KIM, Y.S.; CHOI, J.S. Anti-alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis rhizoma* alkaloids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 32, p. 1433-1438, 2009.

KENNEDY, G.J.; GOLDE, T.E.; TARIOT, P.N.; CUMMINGS, J.L. Amyloid based interventions in Alzheimer's disease. *CNS Spectrums*, v. 12, p. 1-14, 2007.

KERBER, K.T.B.; WINDISCH, P.G. Sinopse das espécies de Lycopodiaceae (Pteridophyta) ocorrentes no estado do Rio Grande do Sul. In: 56° Congresso Nacional de Botânica. Curitiba: Resumos do 56° Congresso Nacional de Botânica. (2005).

KLEIN, W.L. A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochemistry International*, v. 41, p. 345-352, 2002.

KOBAYASHI, J.; MORITA, H. The *Lycopodium* alkaloids. In: Cordell, G. A (Ed.), *The Alkaloids*. Academic Press, New York, v. 61, p. 1-58. (2005).

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, n. 3, p. 206–220, 2005.

KOH, J. Y.; CHOI, D. W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 20, p. 83-90, 1987.

KOH, J. Y.; COTMAN, C. W. Programmed cell death: its possible role in calcium channel antagonist neurotoxicity. *Brain Research*, v. 587, p. 233-240, 1992.

KORKINA, G.I.; PASTORE, S.; DE LUCA, C.; KOSTYUC, V.A. Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects. *Current Drug Metabolism*, v. 9, p. 710-729, 2008.

KOZIKOWSKI, A.P.; TÜCKMANTEL, W. Chemistry, pharmacology, and clinical efficacy of the Chinese nootropic agent huperzine A. *Accounts of Chemical Research*, v. 32, n. 8, p. 641-650, 1999.

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

KWAK, H.M.; JEON, S.Y.; SOHNG, B.H.; KIM, J.G.; LEE, J.M.; LEE, K.B.; JEONG, H.H.; HUR, J.M.; KANG, Y.H.; SONG, K.S. β -secretase (BACE1) inhibitors from pomegranate (*Punica granatum*) husk. *Archives of Pharmacal Research*, v. 28, p.1328-1332, 2005.

LABIAK, P.H.; PRADO, J. Pteridófitas epífitas da Reserva Volta Velha, Itapoá – Santa Catarina, Brasil. *Boletim do Instituto de Botânica*, v. 11, p. 1-79, 1998.

LEE, H.J.; SEONG, Y.H.; BAE, K.; KWON, S.H.; KWAK, H.M.; NHO, S.K.; KIM, K.A.; HUR, J.M.; LEE, K.B.; KANG, Y.H.; SONG, K.S. β -secretase (BACE1) inhibitors from *Sanguisorbae radix*. *Archives of Pharmacal Research*, v. 28, p. 799-803, 2005.

LIANG, Y.Q.; TANG, X.C. Comparative effects of huperzine A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholine level and acetylcholinesterase activity in rats. *Neuroscience Letters*, v. 361, p. 56-59, 2004.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DELCASTILLO, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radical Research Communications*, v. 17, n. 5, p. 299-311, 1992.

LITTLEHALES, C. Protecting wildlife. *Analytical Chemistry*, v. 71, p. 749-752, 1999.

LIU, J.S.; HUANG, M.F. The alkaloids huperzines C and D and huperzine from *Lycopodium casuarinoides*. *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p. 1759-61, 1994.

LIU, J.S.; ZHU, Y.L.; YU, C.M. The structure of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 64, p. 837-839, 1986 .

LLEO, A.; BEREZOVSKA, O.; GROWDON, J.H.; HYMAN, B.T. Clinical, pathological, and biochemical spectrum of Alzheimer's disease associated with PS-1 mutations. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 12, p. 146-156, 2004.

LLEO, A.; GREENBERG, S.M.; GROWDON, J.H. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine*, v. 57, p. 513-533, 2006.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods*, v. 96, p. 147-152, 2000.

LOIZZO, M.R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; MENICHINI, F. Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative diseases: an update. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 1209-1228, 2008.

LOO, D. T.; RILLEMA, J. R. Measurement of cell death. *Metabolic Cellular Biology*, v. 57, p. 251-264, 1998.

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

LOVELL, M.A.; EHMANN, W.D.; BUTLER, S.M.; MARKESBERY, W.R. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*, v. 45, p. 1594-1601, 1995.

LOYOLA, L.A., MORALES, G.Y., CASTILLO, M. Alkaloids of *Lycopodium magellanicum*. *Phytochemistry*, v. 18, p. 1721-1723, 1979.

MA, X.; GANG, D.R. The *Lycopodium* alkaloids. *Natural Product Reports*, v. 21, p. 752- 772, 2004.

MA, X.Q.; JIANG, S.H.; ZHU, D.Y. Alkaloid patterns in *Huperzia* and some related genera of Lycopodiaceae sensu lato occurring in China and their contribution to classification. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 26, p. 723-728, 1998.

MA, X.; TAN, C.; ZHU, D.; GANG, D. R. A survey of potential huperzine A natural resources in China: the Huperziaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, p. 54-67, 2006.

MACLEAN, D.B. *Lycopodium* alkaloids. In: MANSKE, R.H.F. (Ed.), *The alkaloids*. Academic Press, New York, pp. 305. (1967).

MACLEAN, D.B. *Lycopodium* alkaloids. In: MANSKE, R.H.F. (Ed.), *The alkaloids*. Academic Press, New York, pp. 241. (1985).

MACLEAN, D.B. *Lycopodium* alkaloids XIII. Mass spectra of representative alkaloids. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 41, p. 2654-2670, 1963.

MAELICKE, A.; SAMOCHOCKI, M.; JOSTOCK, R.; FEHRENBACHER, A.; LUDWIG, J.; ALBUQUERQUE, E. X.; ZERLIN, M. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*, v. 49, p. 279-288, 2001.

MAELICKE, A.; SCHRATTENHOLTZ, A.; SAMOCHOCKI, M.; RADINA, M.; ALBUQUERQUE, E. X. Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, v. 113, p. 199- 206, 2000.

MANCUSO, M.; ORSUCCI, D.; LOGERFO, A.; CALSOLARO, V.; SICILIANO, G. Clinical features and pathogenesis of Alzheimer's disease: involvement of mitochondria and mitochondrial DNA. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 685, p. 34-44, 2010.

MANGIALASCHE, F.; POLIDORI, M.C.; MONASTERO, R.; ERCOLANI, S.; CAMARDA, C.; CECCHETTI, R.; MECOCCI, P. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Research Reviews*, v. 8, p. 285-305, 2009.

MARCUS, D.L.; THOMAS, C.; RODRIGUEZ, C.; SIMBERKOFF, K.; TSAI, J.S.; STRAFACI, J.A.; FREEDMAN, M.L. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, v. 150, p. 40-44, 1998.

MARKESBERY, W.R.; CARNEY, J.M. Oxidative alteration in Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, v. 9, p. 133-146, 1999.

MATTSON, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, v. 430, p. 631-640, 2004.

MAURER K.; VOLK S.; GERBALDO H. Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet*, v. 349, p.1546-1549, 1997.

MCMURTRAY, A.M.; RINGMAN, J.; CHAO, S.Z.; LICHT, E.; SAUL, R.E.; MENDEZ, M.F. Family history of dementia in early-onset versus late-onset Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 21, p. 597-598, 2006.

MELNIKOVA, I. Therapies for Alzheimer's disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 6, p. 341-342. 2007

MENICHINI, F.; TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; BONESI, M.; MARRELLI, M.; STATTI, G.A.; MENICHINI, F.; CONFORTI, F. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition of ethanolic extract and monoterpenes from *Pimpinella anisoides* V. Brig. (Apiaceae). *Fitoterapia*, v. 80, p. 297-300, 2009.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTEITH, D.K.; EMMERLING, M.R.; GARVIN, J.; THEISS, J.C. Cytotoxicity study of tacrine, structurally and pharmacologically related compounds using rat hepatocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 19, p. 71-84, 1996.

MOREIRA, P.I.; ZHU, X.; NUNOMURA, A.; SMITH, M.A.; PERRY, G. Therapeutic options in Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 6, p. 897-910, 2006.

MORITA, H.; ARISAKA, M.; YOSHIDA, N.; KOBAYASHI, J. Serratezomines A-C, new alkaloids from *Lycopodium serratum* var. *serratum*. *Journal of Organic Chemistry*, v. 65, p. 6241-6245, 2000.

MORITA, H.; HIRASAWA, Y.; SHINZATO, T.; KOBAYASHI, J. New phlegmarane-type, cernuane-type and quinolizidine alkaloids from two species of *Lycopodium*. *Tetrahedron*, v. 60, p. 7015-7023, 2004.

MORITA, H.; HIRASAWA, Y.; YOSHIDA, N.; KOBAYASHI, J. Senepodine A, a novel C₂₂N₂ alkaloid from *Lycopodium chinense*. *Tetrahedron letters*, v. 42, p. 4199-4201, 2001.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, p. 6523-6543, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

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

NAVARRETE, H.; LEÓN, B.; GONZALES, J.; AVILES, D.K.; LECARO, J.S.; MELLADO, F.; ALBAN, J.; ØLLGAARD, B. Helechos. In: Moraes R., B. Øllgaard, Kvist, L.P., Borchsenius, F., Balslev, H., *Botánica Económica de los Andes Centrales*, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, pp. 385-411, 2006.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 7, p. 1022–1037, 2003.

NIU, Q.; ZHAO, C.; JING, Z. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, v. 251, p. 11–19, 2001.

NUÑEZ, C.; CANTERO, J. Las plantas medicinales del sur de la provincia de Córdoba. Córdoba: Ed. Fundación Universidad Nacional Río Cuarto, p. 1-144, (2000).

NUNOMURA, A.; CASTELLANI, R.J.; ZHU, X.; MOREIRA, P.I.; PERRY, G.; SMITH, M.A. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 65, p. 631-641, 2006.

ØLLGAARD, B. A revised classification of the Lycopodiaceae sens. lat. *Opera Botanica*, v. 92, p. 153-178, 1987.

ØLLGAARD, B. Lypodiaceae. In: Kubitzki, K. (Ed.) *The Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin: Springer Verlag, 1^a. ed., pp. 404. (1990).

ØLLGAARD, B. Neotropical Lycopodiaceae – an overview. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 79, p. 687-717, 1992.

ORHAN, I.; ASLAN, M. Appraisal of scopolamine-induced anti-amnesic effect in mice and *in vitro* antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 122, p. 327-332, 2009.

ORHAN, I.; KÜPELİ, E.; SENER, B.; YESİLADA, E. Appraisal of anti-inflammatory potential of the clubmoss, *Lycopodium clavatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, p. 146-150, 2006.

ORHAN, I.; OZCELIK, B.; ASLAN, S.; KARTAL, M.; KARAOGLU, T.; SENER, B.; TERZIOGLU, S.; CHOUDHARY, M. Antioxidant and antimicrobial actions of the clubmoss *Lycopodium clavatum* L. *Phytochemistry Reviews*, v. 6, p.189-196, 2007.

ORHAN, I.; ŞENER, B.; CHOUDHARY, M.I.; KHALID, A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, p. 57-60, 2004.

ORHAN, I.; TERZIOGLU, S.; SENER, B. α -onocerin: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum*. *Planta Medica*, v. 69, p.265-267, 2003.

ORTEGA, M.G.; AGNESE, A.M.; CABRERA, J.L. Anticholinesterase activity in an alkaloid extract of *Huperzia saururus*. *Phytomedicine*, v. 11, p. 539-543, 2004.

ORTEGA, M.G.; VALLEJO, M.G.; CABRERA, J.L.; PÉREZ, M.; ALMIRÓN, R.; RAMÍREZ, O.A.; AGNESE, A.M. *Huperzia saururus*, activity on synaptic transmission in the hippocampus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, p. 374-378, 2006.

PAGE, C.N. The diversity of ferns. An ecological perspective. In: DYER, A. F. (Ed.) *The experimental biology of the ferns*. London: Academic Press, p. 10-56. (1979).

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

PALOMERO, J.; GALÁN, A.I.; MUÑOZ, M.E.; TUÑÓN, M.J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; JIMÉNEZ, R. Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 30, p. 386- 845, 2001.

PARIHAR, M.S.; HEMNANI, T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 11, n. 5, p. 456-467, 2004.

PARK, C.H.; KIM, S.H.; CHOI, W.; LEE, Y.J.; KIM, J.S.; KANG, S.S.; SUH, Y.H. Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Medica*, v. 62, p. 405-409, 1996.

PARK, I.H.; JEON, S.Y.; LEE, H.J.; KIM, S.I.; SONG, K.S. A β -secretase (BACE1) inhibitor hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Planta Medica*, v. 70, p. 143-146, 2004.

PENG, W.H.; HSIEH, M.T.; WU, C.R. Effect of long-term administration of berberine on scopolamine-induced amnesia in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 74, p. 261-266, 1997.

PEREIRA, D.M.; FERRERES, F.; OLIVEIRA, J.M.A.; GASPAR, L.; FARIA, J.; VALENTÃO, P.; SOTTOMAYOR, M.; ANDRADE, P.B. Pharmacological effects of *Catharathus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. *Phytomedicine*, v. 17, p. 646-652, 2010.

PIMPLIKAR, S.W. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 41, p. 1261-1268, 2009.

POL, A.; BERGERS, M.; SCHALKWIJK, J. Comparison of anti-proliferative effects of experimental and established anti-psoriatic drugs on human keratinocytes using a simple 96-well plate assay. *In vitro Cellular Developmental Biology Animal*, v. 39, p. 36-42, 2003.

PRASAD K. N.; HOVLAND A. R.; COLE W. C.; PRASAD K. C.; NAHREINI P.; EDWARDS-PRASAD J.; ANDREATTA C. P. Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Alzheimer disease: analysis of biological rationale. *Clinical Neuropharmacology*, v. 23, n. 1, p. 2-13, 2000.

PRYER, K.M.; SCHUETTPELZ, E.; WOLF, P.G.; SCHNEIDER, H.; SMITH, A. R.; CRANFILL, R.. Phylogeny and evolution of ferns (Monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *American Journal of Botany*, v. 91 (10), p. 1582-1598, 2004.

PUANGTHONG, U.; HSIUNG, G.Y. Critical appraisal of the long-term impact of memantine in treatment of moderate to severe Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 5, p. 553-561, 2009.

QUIAN, B. C.; WANG, M.; ZHOU, Z. F. Pharmacokinetics of tablet huperzine A in six volunteers. *Chung Kuo Yao Li Hseueh Pao*, v. 16, p. 396-398, 1995 *apud* ZANGARA, A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, v. 75, p. 675-686, 2003.

QUICK, M.; JEYARASASINGAM, G. Nicotinic receptors and Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology*, v. 393, p. 223-230, 2000.

RAMASSAMY, C.; AVERILL, D.; BEFFERT, U.; THEROUK, L.; LUSSIER-CACAN, S.; COHN, J.S.; CHRISTEN, Y.; SCHOOF, A.; DAVIGNON, J.; POIRIER, J. Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. *Neurobiology*, v. 7, p. 23-37, 2000.

RANG H.P., DALE M.M., RITTER J.M. In: RANG H.P., DALE M.M., RITTER J.M (Eds.). *Pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 4th Ed, p. 304. (1999).

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Transmissão colinérgica. In: RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. (Ed.) *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4^a. ed., 703 pp. (2000)

REID O. Editorial. *Global Perspective*, v. 16, n. 2, 2006.

REITER, R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB Journal*, v. 9, p. 526-533, 1995.

REKKA, E.; KOUROUNAKIS, P.N. Effect of hydroxyethyl rutenosides and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity-some structural aspects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 43, p. 486-491, 1991.

RIEDERER, P.; DANIELCZYK, W.; GRÜNBLATT, E. Monoamine oxidase-B inhibition in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, v. 25, p. 271-277, 2004.

RODRIGUEZ-FRANCO, M.I.; FERNANDEZ-BACHILLER, M.I.; PEREZ, C.; HERNANDEZ-LEDESMA, B.; BARTOLOME, B. Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, p. 459-462, 2006.

ROLLINGER, J.; EWELT, J.; SEGER, C.; STURM, S.; ELLMERER, E.P.; STUPPNER, H. New insights into the acetylcholinesterase inhibitory activity of *Lycopodium clavatum*. *Planta Medica*, v.71, p.1040-1043, 2005.

ROSINI, M.; ANDRISANO, V.; BARTOLINI, M.; BOLOGNESI, M.L.; HRELIA, P.; MINARINI, A.; TAROZZI, A.; MELCHIORRE, C. Rational approach to discover multipotent anti-Alzheimer drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, p. 360–363, 2005.

ROTHMALER W. Pteridophyten-Studien I. *Feddes Repertorium*, v. 54, p. 55-82, 1944.

ROYCHAUDHURI, R.; YANG, M.; HOSHI, M.M.; TEPLow, D.B. Amyloid β -protein assembly and Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 4749-4753, 2009.

SALINO, A. *Estudos taxonômicos da família Thelypteridaceae (Polypodiopsida) no Estado de São Paulo, Brasil*, 2000. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SCARPINI, E.; SCHELTERNS, P.; FELDMAN, H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *The Lancet Neurology*, v. 2, p. 539-547, 2003.

SCHAUENBERG, P., PARÍS, F. *Guía de las plantas medicinales*. Ed. Omega, Barcelona, p. 1-364. (1972).

SCHIPPLING, S.; KONTUSH, A.; ARLT, S.; BUHMANN, C.; STURENBURG, H.J.; MANN, U.; THOMSEN, T.M.; BEISIEGEL, U. Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 28, p. 351–360, 2000.

SCHMIDT, B.; BAUMANN, S.; BRAUN, H.A.; LARBIG, G. Inhibitors and modulators of β - and γ -secretase. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 6, p. 377-392, 2006.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Ed.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 5^a.ed., 1102 pp. (2003)

SCOTT, L.J.; GAO, K.L. Galanthamine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*, v. 60, n. 5, p. 1095-1122, 2000.

SELKOE, D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*, v. 81, p. 741-766, 2001.

SCHROETER, H.; WILLIAMS, R.J.; MATIN, R.; IVERSEN, L.; RICE-EVANS, C.A. Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low density lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 29, p. 1222-1233, 2000.

SHEARMAN, E.; ROSSI, S.; SZASZ, B.; JURANYI, Z.; FALLON, S.; POMARA, N.; SERSHEN, H.; LAJTHA, A. Changes in cerebral neurotransmitters and metabolites induced by acute donepezil and memantine administrations: a microdialysis study. *Brain Research Bulletin*, v. 69, p. 204-213, 2006.

SHEN, Y. Ch.; CHEN, Ch. H. Alkaloids from *Lycopodium casuarinoides*. *Journal of Natural Products*, v. 57, p. 824- 826, 1994.

SHI, D.H.; WU, J.H.; GE, H.M.; TAN, R.X. Protective effect of hopeahainol A, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 28, p. 30-36, 2009.

SHIGETA, M.; HOMMA, A. Donepezil for Alzheimer's disease: pharmacodynamic, pharmacokinetic, and clinical profiles. *CNS Drug Reviews*, v. 7, p. 353-368, 2001.

SHINOTOH, H.; NAMBA, H.; FUKUSHI, K.; NAGATSUKA, S.; TANAKA, N.; AOTSUKA, A.; OTA, T.; TANADA, S.; IRIE, T. Progressive loss of cortical acetylcholinesterase activity in association with cognitive decline in Alzheimer's disease: a positron emission tomography study. *Annals of Neurology*, v. 48, p. 194-200, 2000.

SMITH, M.A.; NONOMURA, A.; ZHU, X.; TAKEDA, A., PERRY, G. Metabolic, metallic and mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 2, p. 413-420, 2000

SMITH, A.R.; PRYER, K.M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H.; WOLF, P.G. A classification for extant ferns. *Taxon*, v. 55 (3), p. 705-731, 2006.

SMITH, M.A.; SAYRE, L.M.; VITEK, M.P.; MONNIER, V.M.; PERRY, G. Early ageing and Alzheimer's. *Nature*, v. 374, p. 316–318, 1995.

SNAPE, M.F.; MISRA, A.; MURRAY, T.K.; DE SOUZA, R.J.; WILLIAMS, J.L.; CROSS, A.J.; GREEN, A.R. A comparative study in rats of the *in vitro* and *in vivo* pharmacology of the acetylcholinesterase inhibitors tacrine, donepezil and NXX-066. *Neuropharmacology*, v. 38, p. 181- 193, 1999.

SONKUSARE, S.K.; KAUL, C.L.; RAMARAO, P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders-memantine, a new hope. *Pharmacological Research*, v. 51, p. 1-17, 2005.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, p. 294-302, 2001.

SQUIER, T.C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental Gerontology*, v. 36, p. 1539-1550, 2001.

STAHL, S.M.; FELKER, A. Monoamino oxidase inhibitors: a modern guide to an unrequited class of antidepressants. *CNS Spectrums*, v. 13, p. 855-870, 2008.

STEPANICHEV, M.Y.; ONUFRIEV, M.V.; YAKOVLEV, A.A.; KHRENOV, A.I.; PEREGUD, D.I.; VORONTSOVA, O.N.; LAZAREVA, N.A.; GULYAEVA, N.V. Amyloid-beta (25–35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain. *Neurochemistry International*, v. 52, p. 1114–1124, 2008.

STERLING, J.; HERZIG, Y.; GOREN, T.; FINKELSTEIN, N.; CHOREV, M.; YODIM, M. B.; WEINSTOCK, M. Novel dual inhibitors of AChE and MAO derived from hydroxy aminoindan and phenethylamine as potential treatment for Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 5260–5279, 2002.

SUGIMOTO, H.; OGURA, H.; ARAI, Y.; IIMURA, Y.; YAMANISHI, Y. Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 89, p. 7–20, 2002.

SUN, C.M., HO, L.K., SUN, M.L. Revised Stereochemistry of so-called isoselagine and spectroscopic analysis of 6 α -hydroxylycopodine from *Lycopodium serratum* var. *longipetiolatum*. *Planta Medica*, v. 59, p. 467–471, 1993.

TABARRINI, O.; CECCHETTI, V.; TEMPERINI, A.; FILIPPONI, E.; LAMPERTI, M. G.; FRAVOLINI, A. Velnacrine thioanalogues as potential agents for treating Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 9, p. 2921-2928, 2001.

TAMAGNO, E.; BARDINI, P.; GUGLIELMOTTO, M.; DANNI, O.; TABATON, M. The various aggregation states of β -amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 41, p. 202-212, 2006.

TARIOT, P.N.; FEDEROFF, H.J. Current treatment for Alzheimer disease and future prospects. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, v. 17, p. S105-S113, 2003.

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G (Ed.) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw Hill, 10th. ed., 2148 pp. (2003).

TORI, M.; SHIMOJI, T.; SHIMURA, E.; TAKAOKA, S.; NAKASHIMA, K.; SONO, M.; AYER, W. Four alkaloids, lucidine B, oxolucidine A, lucidine A and lucidulinone from *Lycopodium lucidulum*. *Phytochemistry*, v. 53, p. 503-508, 2000.

TOWERS G.H.N., MAASS W.S.G. Phenolic acids and lignins in the Lycopodiales. *Phytochemistry*, v. 4, p. 57-66, 1965.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F. *Ferns and allies plants with special references to tropical America*. Springer-Verlag, New York, pp. 857. (1982).

TUBARO, F.; GHISELLI, A.; RAPUZZI, P.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 24, p. 1228-1234, 1998.

URBAIN, A.; MARSTON, A.; GRILO, L.S.; BRAVO, J.; PUREV, O.; PUREVSUREN, B.; BATSUREN, D.; REIST, M.; CARRUPT, P.A.; HOSTETTMANN, K. Xanthones from *Gentianella amarella* ssp. *acuta* with acetylcholinesterase and monoamine oxidase inhibitory activities. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 895-897, 2008.

UKELIS, U.; KRAMER, P.; OLEJNICZAK, K.; MUELLER, S.O. Replacement of *in vivo* acute oral toxicity studies by *in vitro* cytotoxicity methods: opportunities, limits and regulatory status. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 51, p. 108-118, 2008.

VALLEJO, M.G.; ORTEGA, M.G.; CABRERA, J.L.; CARLINI, V.P.; RUBIALES DE BARIOGLIO, S.; AGNESE, A.M. *Huperzia saururus* increases memory retention in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 685-687, 2007.

VALLEJO, M.G.; ORTEGA, M.G.; CABRERA, J.L.; CARLINI, V.P.; BARIOGLIO, S.R.; ALMIRÓN, R.S.; RAMÍREZ, O.A.; AGNESE, A.M. Sauroine, an alkaloid from *Huperzia saururus* with activity in Wistar rats in electrophysiological and behavioral assays related to memory retention. *Journal of Natural Products*, v. 72, p. 156-158, 2009.

VAN DER HEIJDEN, R.; JACOBS, D. I.; SNOEIJER, W.; HALLARD, D.; VEERPORTE, R. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 5, p. 607-628, 2004.

VARDY, E.R.L.C.; HUSSAIN, I.; HOOPER, N.M. Emerging therapeutics for Alzheimer's disease. *Expert Reviews of Neurotherapeutics*, v. 6, p. 695-704, 2006.

VED, H. S.; KOENIG, M. L.; DAVE, J. R.; DOCTOR, B. P. Huperzine A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces neuronal cell death caused by glutamate. *Neuroreport*, v. 8, p. 963-968, 1997.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

VOIRIN, B.; JAY, M. Contribution of flavone biochemistry to systematics of the Lycopodiales order (*Lycopodium* genus). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 6, p. 95-97, 1978.

WANCATA, J.; MUSALEK, M.; ALEXANDROWITZ, R.; KRAUGARTNER, M. Number of dementia sufferers in Europe between the years of 2000-2050. *European Psychiatry*, v. 18, p. 306-313, 2003.

WANG, R.; ZHANG, H. Y.; TANG, X. C. Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by β -amyloid protein in rat. *European Journal of Pharmacology*, v. 421, p. 149-156, 2001.

WANG, Y.; ZHENG, X. A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity *in vitro*. *Journal of Immunology Methods*, v. 268, p. 179–188, 2002.

WANG, Y. Needs for new plant-derived pharmaceuticals in the post-genome era: an industrial view in drug research and development. *Phytochemistry Reviews*, v. 7, p. 395-406, 2008.

WANG, T.; TANG, X.C. Reversal of scopolamine-induced deficits in radial maze performance by (-)- huperzine A: comparison with E2020 and tacrine. *European Journal of Pharmacology*, v.349, p. 137-142, 1998.

WANG, Y.P.; WANG, X.C.; TIAN, Q.; YANG, Y.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.Y.; ZHANG, Y.C.; WANG, Z.F.; WANG, Q.; LI, H.; WANG, J.Z. Endogenous overproduction of β -amyloid induces τ hyperphosphorylation and decreases the solubility of τ in N2a cells. *Journal of Neural Transmission*, v. 113, p. 1723-1732, 2006a.

WANG, R.; YAN, H.; TANG, X. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 27, p. 1-26, 2006b.

WEINER, H.L.; FRENKEL, D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, p. 404-416, 2006.

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

WEST, M.J.; COLEMAN, P.D.; FLOOD, D.G.; TRONCOSO, J.C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *The Lancet*, v. 344, p. 769–772, 1994.

WILCE, J.H. Lycopod spores, I. General spore patterns and the generic segregates of *Lycopodium*. *American Fern Journal*, v. 62, p. 65-79, 1972.

WILKINSON, D.G.; FRANCIS, P.T.; SCHWAM, E.; PAYNE-PARRISH, J. Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs & Aging*, v. 21, p. 453-478, 2004.

WINDISCH, P.G. Fern Conservation in Brazil. *Fern Gazette*, v. 16, p. 6-8, 2002.

WINDISCH, P.G. *Pteridófitas da região Norte-Occidental do Estado de São Paulo - Guia para excursões*. UNESP, São Paulo, pp. 110. (1992).

WU, Q.; GU, Y. Quantification of huperzine A in *Huperzia serrata* by HPLC-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. *Journal of the Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 40, p. 993-998, 2006.

YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 88, p. 93-113, 2000.

YAMAZAKI, T.; KOO, E. H.; SELKOE, D. J. Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *Journal of Cellular Science*, v. 109, p. 999-1008, 1996.

YOU DIM, M. B.; AMIT, T.; BAR-AM, O.; WEINREB, O.; YOGEV-FALACH, M. Implications of co-morbidity for etiology and treatment of neurodegenerative diseases with multifunctional neuroprotective neurorescue drugs; ladostigil. *Neurotoxicity Research*, v.10, p. 181–192, 2006.

YOUSSEF, I.; FLORENT-BE´ CHARD, S.; MALAPLATE-ARMAND, C.; KOZIEL, V.; BIHAIN, B.; OLIVIER, J.L.; LEININGER-MULLER, B.; KRIEM, B.; OSTER, T.; PILLOT, T. N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiology of Aging*, v. 29, p. 1319-1333, 2008.

YU, H.; LI, W.M.; CHEUNG, M.C.; ZUO, Z.; CARLIER, P.R.; GU, Z.M.; CHAN, K.; HUANG, M.; WANG, Y.T.; HAN, Y.F. Development and validation of an HPLC-DAD method for bis(12)-hupyrindone and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 49, p. 410-414, 2009.

YU, S.P.; CANZONIERO, L.M.; CHOI, D.W. Ion homeostasis and apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 13, p. 405-411, 2001.

XIAO, X.Q.; YANG, J.W.; TANG, X.C. Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydrogen peroxide-induced injury. *Neuroscience Letters*, v. 275, p. 73-76, 1999.

XU, S.S.; CAI, Z.Y.; QU, Z.; YANG, R.M.; CAI, Y.L.; WANG, G.Q.; SU, X. Q.; ZHONG, X.S.; CHENG, R.Y.; XU, W.A.; LI, J. X.; FENG, B. Huperzine A in capsules and tablets for treating patients with Alzheimer disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 20, p. 486-490, 1999.

ZANGARA, A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, v. 75, p. 675-686, 2003.

ZHANG, H.Y. One-compound-multiple-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *FEBS Letters*, v. 579, p. 5260-5264, 2005.

ZHOU, J.; FU, Y.; TANG, X.C. Huperzine A and donepezil protect rat pheochromocytoma cells against oxygen-glucose deprivation. *Neuroscience Letters*, v. 306, p. 53-56, 2001a.

ZHOU, J.; ZHANG, H.Y.; TANG, X.C. Huperzine A attenuates cognitive deficits and hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. *Neuroscience Letters*, v. 313, p. 137-140, 2001b.

ANEXOS