



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



JÓSQUIA DOS SANTOS BARBOSA

FLAVONOIDES DE *Barbacenia blanchetii* (VELLOZIACEAE) E
AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO SOBRE
BUTIRILCOLINESTERASE

JÓSQUIA DOS SANTOS BARBOSA

**FLAVONOIDES DE *Barbacenia blanchetii* (VELLOZIACEAE) E
AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO SOBRE
BUTIRILCOLINESTERASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Branco

Feira de Santana, BA
2012

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Rosilene Moretti Marçal
(Universidade Federal de Sergipe)

Dr^a. Mariana Borges Botura
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Dr. Alexsandro Branco
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana - BA
2012

AGRADECIMENTOS

A Deus, ser soberano!

Ao professor Alexsandro Branco, pelo incentivo, orientação e compreensão neste trabalho. Mas, principalmente, por todos esses anos de convívio, que me fizeram crescer em atitudes e responsabilidades. Obrigada por tudo!

Ao botânico Francisco Haroldo, pela disponibilidade e boa vontade na realização da coleta do material vegetal.

À professora Carla Rodrigues pelo auxílio nas análises por CLAE-DAD e pela paciência e carinho.

À professora Rosilene e a sua orientanda Rosiane pela receptividade no laboratório da Universidade Federal de Sergipe.

Aos componentes do Laboratório de Fitoquímica pela convivência, experiências compartilhadas e amizade, em especial a Jener e a Tony por nossas longas conversas e a Dayse, pelo apoio neste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia UEFS/FIOCRUZ-BA.

Agradecimento especial aos meus pais, que com sabedoria transmitiram valores fundamentais ao meu caráter. Minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos, pela preocupação quando nem tudo era perfeito e por compartilhar minhas angústias e alegrias nessa etapa da minha vida.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste momento!

*"A curiosidade, instinto de complexidade infinita,
leva por um lado a escutar atrás das portas e por
outro a descobrir a América."*

(Eça de Queirós)

RESUMO

Velloziaceae é uma família de monocotiledôneas que representa uma importante fonte de flavonoides. Entre os gêneros dessa família, *Barbacenia* comumente apresenta flavonoides com grupos metoxilas e/ou unidades de açúcar. Os flavonoides são metabólitos secundários que podem efetuar ação farmacológica no Sistema Nervoso Central (SNC) e, desse modo inibir a butirilcolinesterase (BuChE) cerebral. Esta enzima desempenha papel importante na degradação da acetilcolina em cérebros humanos normais e especialmente nos acometidos pela doença de Alzheimer. Neste sentido, a busca por inibidores da BuChE tem sido uma das estratégias mais recentes para elevar os níveis de acetilcolina em indivíduos portadores da doença, principalmente, nos estágios mais avançados da patologia, quando ocorre diminuição da expressão da acetilcolinesterase (AChE) e aumento da BuChE. Dessa forma, o presente trabalho descreve a análise de flavonoides de *B. blanchetii* e avalia a inibição da atividade da BuChE por extratos, frações e pelo flavonoide isolado a partir desta espécie. Os extratos em hexano, acetato de etila e metanol foram monitorados por CLAE-DAD e os espectros de UV apresentaram absorções em regiões características de compostos da classe dos flavonoides. O extrato metanólico mostrou ser rico em flavonoides e apresentou significativo efeito máximo na inibição da BuChE em relação aos demais extratos. O extrato metanólico foi fracionado e entre os flavonoides presentes, o 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona foi isolado e identificado através de técnicas cromatográficas e espectrométricas (CLAE-DAD/EM/EM e RMN 1D e 2D). Os extratos inibiram a atividade da BuChE de forma concentração-dependente. As frações provenientes do extrato em metanol também apresentaram inibição concentração-dependente, entretanto o flavonoide 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona não apresentou efeito inibitório significativo.

PALAVRAS-CHAVE: *Barbacenia blanchetii*, flavonoides, butirilcolinesterase.

ABSTRACT

Velloziaceae is a family of monocotyledons that represents an important source of flavonoids. Among this family genus, *Barbacenia* usually presents flavonoids with methoxy groups and/or sugar units. The flavonoids are secondary metabolites that can have pharmacological effects on the Central Nervous System (CNS), and as consequence, inhibit the butyrylcholinesterase (BuChE). This enzyme plays an important role in acetylcholine release in normal human brains and especially on those affected by Alzheimer's disease. In this sense, the search for BuChE inhibitors has been one of the strategies to enhance acetylcholine levels in patients affected by this disease, mainly, in advanced pathological stages, when happens a low expression of acetylcholinesterase (AChE) and an improvement of BuChE. This work describes the analysis of flavonoids from *B. blanchetii* and evaluates the inhibition of BuChE activity by extracts, fractions and by the isolated flavonoid from this specie. The methanolic, ethyl acetate and methanol extracts were monitored by HPLC-DAD and the UV spectra showed absorptions in specific regions of flavonoid compounds. The methanolic extract showed high presence of flavonoids and significant maximum effect of BuChE inhibition in relation to the rest of the extracts. The methanolic extract was fractionated and among the present flavonoids, the 4',5,7-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone was isolated and identified by chromatographic and spectrometric techniques (HPLC-DAD/MS/MS and NMR 1D and 2D). The extracts inhibit the BuChE activity in a dose-dependent. The fractions from methanolic extract also showed dose-dependent inhibition, although the flavonoid 4',5,7-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone didn't showed significant inhibitory effect.

KEY WORDS: *Barbacenia blanchetii*, flavonoids, butyrylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esqueleto básico de flavonoide e suas diferentes classes	19
Figura 2 -	Reação de biossíntese da acetilcolina	24
Figura 3 -	Mecanismo de ação dos anticolinesterásicos	29
Figura 4 -	<i>Barbacenia blanchetii</i>	31
Figura 5 -	Reações envolvidas no método de Ellman	34
Figura 6 -	Cromatograma por CLAE-DAD do extrato hexano de <i>B. blanchetii</i>	37
Figura 7 -	Espectros de UV dos picos do cromatograma do extrato hexano de <i>B. blanchetii</i>	38
Figura 8 -	Cromatograma por CLAE-DAD do extrato AcOEt de <i>B. blanchetii</i>	39
Figura 9 -	Espectros de UV dos picos do cromatograma do extrato AcOEt de <i>B. blanchetii</i>	40
Figura 10 -	Cromatograma por CLAE-DAD do extrato MeOH de <i>B. blanchetii</i>	41
Figura 11 -	Espectros de UV dos picos do cromatograma do extrato MeOH de <i>B. blanchetii</i>	42
Figura 12 -	Sobreposição dos cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos AcOEt e MeOH de <i>B. blanchetii</i> e espectro de UV do pico majoritário em 320nm	43
Figura 13 -	CLAE-DAD/EM/EM do flavonoide isolado com tempo de retenção e fragmentação do flavonoide de interesse, em destaque	45
Figura 14 -	Espectro de RMN de ^1H do flavonoide isolado (300MHz, DMSO_d_6)	47
Figura 15 -	Ampliação do Espectro de RMN de ^1H (300MHz, DMSO_d_6) entre 6,0 e 6,8 ppm	48
Figura 16 -	Espectro bidimensional [^1H - ^1H -COSY] do flavonoide isolado (300MHz, DMSO_d_6) e ampliação entre 5,8 e 7,8 ppm	49
Figura 17 -	Espectro de RMN de ^{13}C do flavonoide isolado (300MHz, DMSO_d_6)	50
Figura 18 -	Ampliação do Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, DMSO_d_6) entre 20 e 190 ppm e atribuições dos sinais aos carbonos	50

Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 do flavonoide isolado (300 MHz, DMSO_d_6)	52
Figura 20 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (300 MHz, DMSO_d_6) entre 25 e 110 ppm.	52
Figura 21 - Espectro de HMQC do flavonoide isolado (300 MHz, DMSO_d_6)	53
Figura 22 - Ampliação do espectro de HMQC ^1H - ^{13}C (300MHz, DMSO_d_6) entre 1,0 ppm e 8,0 ppm e entre 10 e 120 ppm	54
Figura 23 - Espectro de HMBC ^1H - ^{13}C do flavonoide isolado (300 MHz, DMSO_d_6)	55
Figura 24 - Ampliação do espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (300 MHz, DMSO_d_6) entre 3,5 ppm e 8,0 ppm e entre 90 e 125ppm	55
Figura 25 - Ampliação do espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (300 MHz, DMSO_d_6) entre 3,5 ppm e 8,0 ppm e entre 130 e 190 ppm	56
Figura 26 - Ampliação do espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (300 MHz, DMSO_d_6) entre 12,90 ppm e 13,06 ppm e entre 90 e 170 ppm	56
Figura 27 - Estrutura do flavonoide isolado de <i>B. blanchetii</i> , o 5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (tricina)	57
Figura 28 - Inibição da atividade da BuChE pela neostigmina	59
Figura 29 - Inibição da atividade da BuChE pelo extrato hexano	60
Figura 30 - Inibição da atividade da BuChE pelo extrato AcOEt	60
Figura 31 - Inibição da atividade da BuChE pelo extrato MeOH	61
Figura 32 - Comparação da atividade da BuChE na presença da neostigmina e dos extratos em hexano, AcOEt e MeOH de <i>B. blanchetii</i>	61
Figura 33 - Atividade da BuChE na presença da Fr 07 (A), 08 (B) e 10 (C) do extrato metanólico de <i>B. blanchetii</i>	62
Figura 34 - Atividade da BuChE na presença da tricina, isolado do extrato metanólico de <i>B. blanchetii</i>	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação botânica de Velloziaceae	17
Tabela 2 - Gradiente de solventes utilizados na análise por CLAE-DAD	32
Tabela 3 - Absorções máximas de UV (λ_{max}) e Tempo de Retenção (min) de padrões de flavonoides	36
Tabela 4 - Dados de RMN de ^{13}C do flavonoide isolado de <i>B. blanchetii</i> e dados da literatura	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	O GÊNERO <i>Barbacenia</i>	15
2.2	FLAVONOIDES NO GÊNERO <i>Barbacenia</i>	19
2.3	TÉCNICAS DE ANÁLISE DE FLAVONOIDES EM VELLOZIACEAE	21
2.4	ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DOS FLAVONOIDES	23
2.5	ACETILCOLINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	24
2.6	BUTIRILCOLINESTERASE (BuChE)	25
2.7	DOENÇA DE ALZHEIMER	26
2.8	INIBIDORES DAS COLINESTERASES NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER	28
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	REAGENTES	30
3.2	EQUIPAMENTOS	30
3.3	MATERIAL VEGETAL	31
3.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	32
3.5	ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CLAE-DAD	32
3.6	FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM METANOL	33
3.7	DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DO FLAVONOIDE ISOLADO	33
3.8	AValiação DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA BuChE	33
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	ANÁLISE DOS EXTRATOS DE <i>B. blanchetii</i> POR CLAE-DAD	36
4.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DO FLAVONOIDE DE <i>B. blanchetii</i>	44
4.3	AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA BuChE	58
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

O reino vegetal tem contribuído de forma significativa para a humanidade, especialmente no que se refere ao uso terapêutico de plantas. Geralmente os efeitos medicinais das plantas estão relacionados a um grupo de metabólitos diferenciados, os quais são denominados metabólitos secundários. Estes possuem como função adaptar o vegetal ao meio e representam a principal classe de substâncias vegetais de interesse farmacêutico.

Contudo, estima-se que das 250 a 500.000 espécies de plantas superiores existentes no planeta, apenas 1% tenham sido estudadas quanto a seu potencial farmacológico (MELENDÉZ; CAPRILES, 2006). Por outro lado, a região Nordeste do Brasil abriga em seu ecossistema uma grande biodiversidade, com *habitat* específico para plantas medicinais não encontradas em outras regiões do globo (QUEIROZ *et al*, 2006). Dessa forma, estudos relacionando a composição química de espécies endêmicas dessa região podem contribuir de modo efetivo na busca de novos compostos com potencial para fármacos.

A avaliação biológica foi um dos mais significantes avanços na área de produtos naturais nos últimos tempos. O entendimento dos mecanismos das doenças, acompanhado do aumento de testes com receptores e enzimas disponíveis, permitiram o desenvolvimento de bioensaios eficientes e rápidos. Entre os ensaios biológicos disponíveis, a utilização da enzima butirilcolinesterase tem sido útil em testes preliminares na detecção e seleção de compostos com ação anticolinesterase, que visa o uso terapêutico destes na doença de Alzheimer.

Sabe-se que a doença de Alzheimer é um problema de saúde pública de grande impacto socioeconômico, visto que é responsável por cerca de 50 a 60% do número total de casos de demência em pessoas acima dos 65 anos, acometendo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo mundo (VEIGAS-JUNIOR *et al*, 2004). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência da doença dobra a cada 5 anos, passando de 3% aos 70 anos para 20 a 30% aos 85 anos. Dessa forma, estima-se que o número de casos aumente para 114 milhões até 2050 (FORLENZA, 2005).

A doença de Alzheimer está associada à redução das taxas de acetilcolina no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical. A modulação dos níveis de

acetilcolina é realizada por duas enzimas, a acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) e dessa forma a principal estratégia terapêutica disponível se baseia na inibição destas colinesterases (SMALL; MAYEUX, 2002). A AChE está presente em fendas sinápticas colinérgicas e nos eritrócito, já a BuChE está presente no plasma, em diversos tecidos e em algumas sinapses do SNC, especialmente nas células da glia. (MUKHERJEE et al., 2007)

No entanto, com o desenvolvimento da doença de Alzheimer há um declínio dos níveis de expressão de AChE, associada a uma marcante elevação dos níveis de BuChE no SNC. Isto sugere que em pacientes portadores da doença de Alzheimer, os níveis de acetilcolina sejam controlados principalmente pela BuChE. Nesse contexto, fármacos que inibam a butirilcolinesterase podem ter efeitos benéficos em estágios mais avançados da doença (KATALINIC *et al*, 2010).

Os fármacos disponíveis no mercado para tratamento da doença de Alzheimer são: donpenezil (Aricept®; Eisai/Pfizer), rivastigmina (Exelon®; Novartis), galantamina (Razadyne®; Johnson & Johnson) e tacrina (Cognex®; First Horizon Pharmaceuticals), que são inibidores colinesterásicos (FREITAS *et al*, 2009).

A galantamina é um metabólito secundário da classe dos alcaloides isolado de plantas da família Amaryllidaceae, sendo o medicamento mais efetivo no tratamento da doença de Alzheimer. Entretanto, entre os compostos naturais presentes em espécies vegetais, os flavonoides constitui uma importante classe de metabólitos e podem exercer ação farmacológica no Sistema Nervoso Central (SNC). Isto demonstra que outras classes de compostos naturais, além dos alcaloides, poderiam proporcionar inibição enzimática das colinesterases e conseqüentemente, aumento da neurotransmissão e melhora cognitiva e comportamental na doença de Alzheimer (VIEGAS JUNIOR *et al*, 2004).

A família Velloziaceae consiste em uma fonte de compostos da classe dos flavonoides, com muitos destes compostos descritos apenas nesta família botânica. Vale mencionar que Velloziaceae é uma família essencialmente tropical, sendo os campos rupestres brasileiros o principal centro de diversidade. Na família, das 276 espécies descritas, 230 são endêmicas do Brasil, sendo que grande parte deste endemismo está concentrado nos campos rupestres da Serra do Cipó em Minas Gerais e na Chapada Diamantina, Bahia (MELO-SILVA, 2008).

Espécies de diferentes gêneros de Velloziaceae foram submetidas à investigação química, sendo detectados diversos flavonoides, os quais têm sido utilizados como marcadores quimiosistemático na família. Entre os flavonoides encontrados no gênero *Barbacenia*, a isoramnetina aparece com frequência e a quercetina 3- metil éter ocorre de forma ocasional. Flavonoides polimetoxilados e glicosilados também foram relatados neste gênero (WILLIAMS *et al*, 1994).

A espécie *Barbacenia blanchetii* Goethart & Henrard se destaca pelo elevado grau de endemismo, estando concentrada nos campos rupestres da Chapada Diamantina, BA. (BRASIL, 2010). Além disso, até o presente trabalho esta espécie era desprovida de informações a cerca de atividade biológica de seus metabólitos secundários. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e identificar flavonoides presentes em *B. blanchetii*, bem como avaliar a atividade anticolinesterase dos extratos, frações e do flavonoide isolado desta espécie em relação à enzima butirilcolinesterase.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O GÊNERO *Barbacenia*

O gênero *Barbacenia* pertence à família Velloziaceae e compreende aproximadamente 110 espécies vegetais (SMITH; AYENSU, 1976). Este gênero é representado por monocotiledôneas, em forma de arbustos e ervas perene com capacidade para habitar regiões de alta incidência solar e pouca disponibilidade de água (SALATINO *et al*, 1989; LUTTGE *et al*, 2007).

As espécies de *Barbacenia* residem em afloramentos rochosos ou solos arenosos, localizados em regiões de altitude elevada. É comum a ocorrência de *Barbacenia* em regiões tropicais, especialmente na América do Sul, onde muitas das espécies são endêmicas, cujo centro de diversidade é a Cadeia do Espinhaço no leste do Brasil, em que se destacam os campos rupestres da Serra do Cipó em Minas Gerais e a Chapada Diamantina, na Bahia (SMITH; AYENSU, 1976; MACHADO *et al*, 2007; CONCEIÇÃO *et al*, 2007; NEVES; CONCEIÇÃO *et al*, 2010).

Diversos estudos destacam a flora típica de campos rupestres dessas regiões, a qual está relacionada com características peculiares, como o isolamento entre serras, a grande quantidade de rocha exposta, longos períodos de deficiência hídrica, além de baixa capacidade de armazenamento de água, devido aos solos rasos, e elevada insolação. Entre estes estudos, muitos descrevem a ocorrência de espécies de *Barbacenia* como componentes da vegetação local (CONCEIÇÃO; GIULIETTI, 2002; LUTTGE *et al*, 2007; CONCEIÇÃO; PIRANI, 2007).

Em um trabalho sobre beija-flores e os recursos florais, Machado e colaboradores (2007) atestam a ocorrência de *B. blanchetii* na Chapada Diamantina, Bahia. De forma semelhante Neves e Conceição (2010) descrevem *B. blanchetii* como espécie endêmica dessa área. A referida espécie é muito frequente na região onde ocorre (ex. Morro da Mãe Inácia, Chapada Diamantina), ao mesmo tempo em que se ausenta em outras áreas (CONCEIÇÃO;

GIULIETTI, 2002). Segundo Conceição e Pirani (2007) essa é uma tendência comum, onde geralmente há domínio de uma ou duas espécies de Velloziaceae, que variam entre áreas.

Assim, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) no uso das suas competências destaca entre outras espécies *Barbacenia Blanchetii* Goethart & Henrard como espécie endêmica de Campos de Altitude, de acordo com a Resolução nº 423, de 12 de abril de 2010 (BRASIL, 2010).

Uma ampla discussão tem sido feita sobre as delimitações de gêneros e subfamílias de Velloziaceae. Neste contexto duas linhas de pensamento merecem destaque. De acordo com Smith e Ayensu (1976), Velloziaceae é dividida em duas subfamílias: Vellozioideae e Barbacenioidae. Sendo que, Vellozioideae apresenta dois gêneros: *Vellozia* e *Nanuzza* enquanto, Barbacenioidae é composta por quatro gêneros: *Barbaceniopsis*, *Talbotia*, *Xerophyta* e *Barbacenia*. Esta classificação, entretanto, difere da proposta de Menezes e colaboradores (1991), que consideram a subfamília Vellozioideae com dois gêneros: *Vellozia* (flores com nove ou mais estames e sem corola) e *Xerophyta* (flores com seis estames e sem corola). A subfamília Barbacenioidae, por sua vez, apresenta quatro gêneros: *Pleurostima*, *Aylthonia*, *Burlemaxia* e *Barbacenia*. Nesta última subfamília, as espécies apresentam flores com seis estames e corola.

A grande diferença entre esses dois sistemas de classificação proposto para Velloziaceae é que Menezes e outros (1991) priorizaram a presença ou ausência de corola e a constituição das bainhas dos feixes. Enquanto, Smith e Ayensu (1976) deram prioridade à morfologia do estigma e filete e para a posição dos apêndices florais em relação aos filetes. Ambos sistemas são intransigentes na escolha dos caracteres para classificação.

Contudo, em um estudo mais recente, Mello-Silva (2005) através de análises cladísticas, baseado em dados morfológicos, anatômicos e químicos com 47 espécies da família Velloziaceae, propõe nova classificação para as Velloziaceae. O autor optou por reconhecer apenas os gêneros *Barbacenia* (incluindo espécies pertencentes ao gênero *Pleurostima*, *Aylthonia*, *Burlemaxia*), *Talbotia*, *Vellozia* (incluindo a única espécie de *Nanuzza*) e *Xerophyta* (incluindo espécies pertencente a *Barbaceniopsis*). Nesta análise, *Acanthochalamys* aparece com parentesco próximo a Velloziaceae e por ser monotípico, foi incluso na família que fica assim composta por cinco gêneros: *Barbacenia*, *Talbotia*, *Vellozia*, *Xerophyta* e *Acanthochalamys*.

Neste contexto são notórias as mudanças de classificação do gênero *Barbacenia* na família Velloziaceae. A seguir o complexo histórico da classificação desta família (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação botânica de Velloziaceae

<i>Autor</i>	<i>Classificação</i>
Vandelli (1788)	<i>Barbacenia</i> : 6 estames, estigma oval-acuminado <i>Vellozia</i> : 15 estames, estigma capitado
Jussieu (1789)	<i>Xerophyta</i> : 6 estames, estigma oblongo e cálice tubuloso
Martius (1823)	<i>Barbacenia</i> : 6 estames e anteras dorsifixas <i>Vellozia</i> : 6 e 15 estames e anteras basifixas
Shultes (1829) e Sprengel (1827)	<i>Xerophyta</i> : incluem no gênero todas as espécies com 6 estames
Baker (1875)	<i>Xerophyta</i> : transfere as espécies brasileiras de <i>Vellozia</i> com 6 estames para o gênero
Baker (1898)	<i>Vellozia</i> : transfere espécies africanas para o gênero valorizando o comprimento do hipanto
Benttham e Hooker (1883)	Tranferem Velloziaceae para tribo Vellozie de Amarylidaceae baseando-se no comprimento do hipanto para distinguir <i>Barbacenia</i> e <i>Vellozia</i>
Pax (1888)	<i>Barbacenia</i> : 6 estames – seção <i>Xerophyta</i> : filetes lineares, seção <i>Barbacenia</i> : filetes aplanados. <i>Vellozia</i> : mais de 6 estames
Bailon (1895)	<i>Barbacenia</i> : abrange todas as espécies da família. 4 seções: <i>Barbacenia</i> , <i>Radia</i> , <i>Vellozia</i> e <i>Xerophyta</i> distintas pelo comprimento do hipanto
Balf (1868)	Descreve o gênero <i>Talbotia</i> para Amarylidaceae
Perrier (1930, 1946)	<i>Barbacenia</i> : 6 estames, estigma oval-acuminado <i>Vellozia</i> : 15 estames e estigma capitado <i>Xerophyta</i> : espécies de Madagascar
Seubert (1947)	<i>Barbacenia</i> : 6 estames, estigma oval-acuminado <i>Vellozia</i> : 15 e 6 estames

Continuação Tabela 1 - Classificação botânica de Velloziaceae

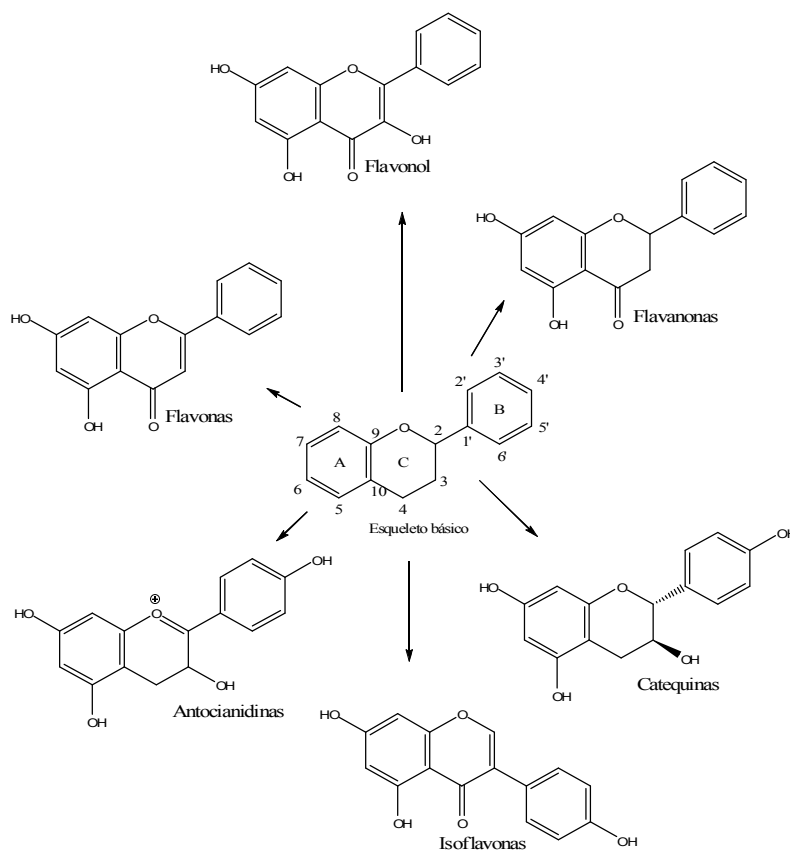
<i>Autor</i>	<i>Classificação</i>
Smith (1962)	<i>Barbaceniopsis</i> : anteras dorsifixas, filete achatado <i>Barbaceniopsis</i> : descreve o gênero que possui anteras dorsifixas com filete cilíndrico <i>Vellozia</i> : anteras basifixas
Menezes (1971A)	<i>Aylthonia</i> : Barbacenioideae <i>Barbacenia</i> : Barbacenioideae <i>Vellozia</i> : Vellozioideae <i>Xerophyta</i> : redelimita o gênero incluindo espécies brasileiras, pertence à Vellozioideae
Menezes(1980A, 1980B, 1991)	<i>Aylthonia</i> : Barbacenioideae <i>Barbacenia</i> : Barbacenioideae <i>Barbaceniopsis</i> : <i>Xerophyta</i> sect. <i>Xerophyta</i> <i>Burlemarxia</i> : descreve o gênero, único de Barbacenioideae cujas anteras não são sésseis <i>Nanuza</i> : <i>Xerophyta</i> sect. <i>Talbotia</i> <i>Pleurostima</i> e <i>Graziela</i> : Barbacenioideae <i>Talbotia</i> : <i>Xerophyta</i> sect. <i>Talbotia</i> <i>Vellozia</i> : Velloziaoideae. 2 seções: <i>Vellozia</i> e <i>Radia</i> <i>Xerophyta</i> : Velloziaoideae. 2 seções: <i>Xerophyta</i> e <i>Talbotia</i>
Mello-Silva (2005)	<i>Acanthochlamys</i> : inclui o gênero na família <i>Barbacenia</i>: inclui espécies de <i>Aylthonia</i>, <i>Barbacenia</i>, <i>Burlemarxia</i> e <i>Pleurostima</i> <i>Talbotia</i> : aceita o gênero <i>Vellozia</i> : inclui <i>Nanuza</i> e <i>Vellozia sensu</i> Smith & Ayensu <i>Xerophyta</i> : inclui espécies de <i>Xerophyta sensu</i> Smith & Ayensu e <i>Barbaceniopsis</i>

Fonte: CATTAI, 2007(adaptada)

2.2 FLAVONOIDES NO GÊNERO *Barbacenia*

Os flavonoides representam uma das classes de metabólitos secundários que mais impressiona pela considerável variedade e complexidade estrutural. Estes compostos são produzidos por via biossintética mista: a via chiquimato e a via acetato. A via chiquimato origina o anel B e os três átomos de carbono que formam o anel C (núcleo C3-C6), enquanto a via acetato dá origem ao anel A (ZUANAZZI, MONTANHA, 2007). Reações enzimáticas de oxidação, redução e alquilação produzem variações sobre o esqueleto básico dos flavonoides dando origem às diferentes classes, como por exemplo, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, antocianinas e catequinas (DEWICK, 2002). O núcleo do flavonoide e suas diferentes classes estão representados na Figura 1.

Figura 1 - Esqueleto básico de flavonoide e suas diferentes classes



Fonte: DEWICK, 2002.

A utilização de flavonoides como marcadores quimissistemático na família Velloziaceae tem sido útil para a classificação infragenérica da mesma. Williams e colaboradores (1991) analisaram o perfil flavonoídico foliar de 99 espécies de Velloziaceae das quase 270 espécies descritas, revelando a ocorrência de flavonas C-glicosídeos na subfamília Vellozioideae o que a distinguiria da subfamília Barbacenioideae.

Neste estudo, embora a quercetina tenha sido detectado em todas as espécies analisadas de *Barbacenia*, o composto flavonoídico específico deste gênero é a isoramnetina. Uma vez que *Barbacenia* distingue-se dos demais gêneros pela presença regular de isoramnetina e ocasional presença de quercetina 3-metil éter (WILLIAMS *et al*, 1991).

A presença de isoramnetina é característico para todas as espécies *Barbacenia*, exceto *B. aff. globata* e também se apresenta em três espécies consideradas como *Aylthonia* por Menezes: *B. gardneri*, *B. paranaensis* e *B. riedeliana*. Isoramnetina está ausente em *Aylthonia* ss, *Burlemarxia* e cinco espécies de *Barbacenia* consideradas *Aylthonia* por Menezes: *B. blanchetii*, *B. coronata*, *B. umbrosa*, *B. Graminifolia* e *B. pulverulenta*. As duas últimas espécies expressam quercetina 3-metil éter (WILLIAMS *et al*, 1991)

O canferol foi encontrada em mais de 50% de espécies *Barbacenia*, por outro lado o 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona, conhecida como tricina, foi encontrada em apenas uma especie de *Barbacenia*, a saber: *B. riedeliana* (WILLIAMS *et al*, 1991).

Em outro trabalho realizado com a família Velloziaceae, foram detectadas flavonas C-glicosídeos em três membros de Barbacenioideae, sendo duas espécies de *Barbacenia* (diglicosídeos) e uma em *Aylthonia riedeliana* (monoglicosídeos). No entanto, a subfamília Vellozioideae, ainda pode ser distinguida de Barbacenioideae pelo acúmulo de monoflavona C-glicosídeos ao invés de di-C-glicósídeos e de flavonoides lipofílicos tanto no interior quanto na superfície das folhas (WILLIAMS *et al*, 1994).

Dentro de Barbacenioideae, todos os quatro gêneros reconhecido por Menezes (1980) têm perfis distintos de flavonoides. Assim, é possível distinguir *Aylthonia* e *Barbacenia* pela presença de flavonas mono-C-glicosídeos e da maior frequência de canferol em comparação com a isoramnetina. Do mesmo modo *Barbacenia* podem ser distinguida de *Burlemarxia* pela presença de isoramnetina, embora ambos os gêneros sintetizem flavonas di-C-glicosídeos. O

gênero *Pleurostima*, por sua vez, se diferencia os demais pelo acúmulo de 6-hidroxi flavonoides e ausência de glicoflavonas (WILLIAMS *et al*, 1994).

Ainda neste estudo, padrões complexos de flavonol *O*-glicosídeos foram descobertos em folhas de espécies de *Barbacenia*. Assim, em *Barbacenia conicostigma* três mono e 10 diglicosídeos foram detectados, incluindo uma mistura de dois novos compostos, isoramnetina 3-apiosilgalactosídeo e 3-apiosilglucosídeo e uma mistura de análogos de quercetina. Em *B. rubro-virens*, os principais constituintes *O*-glicosídicos foram caferol e isoramnetidina 3-galactosídeo e 3-digalactosídeo, além de quercetina 3-glicosídeo. Neste estudo, *Barbacenia conicostigma* apresentou perfil semelhante ao dos flavonoides das espécies estudadas de *Barbacenia*, como *B. rubro-virens*, isto é, uma mistura complexa de *O*-flavonolglicosídeos, éteres metílicos de flavonoides e os duas flavonas di-*C*-glicosídeos, apoiando assim a permanência dessa espécie no gênero *Barbacenia* (WILLIAMS *et al*, 1994).

2.3 TÉCNICAS DE ANÁLISE DE FLAVONOIDES EM VELLOZIACEAE

O estudo fitoquímico de extratos vegetais emprega técnicas cromatográficas variadas, com diferente grau de inovação tecnológica, desde colunas abertas com suportes cromatográficos diversos, como por exemplo, sílica-gel, celulose e poliamida, até técnicas instrumentais, como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Estas técnicas têm como objetivo principal o fracionamento dos extratos vegetais.

Após o fracionamento e isolamento dos compostos, o trabalho fitoquímico prossegue com a elucidação da estrutura química das moléculas. Assim, são empregados métodos espectrométricos, que incluem técnicas de Ultravioleta (UV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM) entre outras. Comumente a elucidação estrutural é realizada após o isolamento das substâncias, contudo, as possibilidades atuais do emprego de técnicas hífenadas ou acopladas podem auxiliar na etapa de identificação de produtos naturais em mistura.

A introdução da tecnologia de Detecção por Arranjo de Diodos (DAD), na década de 1980, por exemplo, aumentou o poder de análise de flavonoides por CLAE, uma vez que é

possível identificar subclasses desses compostos, ou até mesmo o composto em si, com o auxílio de espectros de UV (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

A equipe de Harbone avaliou o uso de CLAE-DAD no isolamento de amplo número de flavonóis do gênero *Vellozia*, como por exemplo, flavonóis metil éteres e derivados isoprenilados e concluíram que o tempo de retenção em coluna e o espectro de UV são eficientes na identificação de flavonoides lipofílicos em mistura, especialmente quando são empregadas co-eluições de padrões no método cromatográfico (GREENHAM *et al*, 1995). De forma semelhante outro trabalho realizado por esta equipe expandiu a investigação de compostos da classe dos flavonóis e inclui análises de compostos da classe das flavonas por CLAE-DAD, sendo obtido igual sucesso (GREENHAM *et al*, 2003).

Por outro lado, a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) permitem a determinação estrutural precisa de muitos compostos, incluindo a aplicação de experimentos bidimensionais (2D) tais como: ^1H - ^1H -COSY; ^1H - ^1H -NOESY, HMBC ^1H - ^{13}C e HMQC ^1H - ^{13}C

O trabalho realizado por Branco e colaboradores (1998) descreve com êxito o isolamento e a identificação de flavonoides lipofílicos em mistura, a partir de *Vellozia graminifolia* por combinação de técnicas cromatográficas e espectrométricas. A elucidação estrutural dos componentes em mistura foi baseada em análises de espectros, incluindo técnicas de RMN como HMQC, HMBC e ^1H - ^1H -NOESY. Como resultado, dois flavonóis monoisoprenilados foram identificados velloquercetina 3',4'-dimetil éter e velloquercetina 3,3',4'-trimetil éter.

Outros flavonoides lipofílicos foram isolados do extrato etéreo das folhas de *Vellozia candida* Mikan (Velloziaceae): os flavonóis 3',4',5,7-tetrahydroxi-3,6-dimetoxi-8-metilflavona e 3',4',5-triidroxi-3,6,7-trimetoxi-8-metilflavona. Estes compostos foram identificados em mistura através de seus dados espectrais, incluindo RMN 2D e EM-EM. O derivado 5-hidroxi-3,3',4',6,7-pentametoxi-8-metilflavona foi obtido por metilação usando diazometano (BRANCO *et al*, 2002).

Branco e colaboradores (2001) relataram um diferente derivado de velloquercetina de *V. graminifolia* através de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução e Alta Temperatura (CGAR-AT) e CGAR-AT/EM. A utilização desses métodos resultaram na detecção, isolamento e

caracterização de um flavonol 3,5,4'-trimetoxi-3'-hidroxi-6,7-(2'')- isopropenildihidrofurano) flavona. Neste estudo a CGAR-AT e CGAR-AT/EM surgiram como ferramentas úteis na rápida identificação de flavonoides presentes em misturas complexas, comum na família Velloziaceae (BRANCO *et al*, 2001). Além disso, essa técnica permite analisar compostos de elevada massa molecular e alto ponto de ebulição, sem que seja necessário a derivatização dos compostos (PEREIRA *et al*, 1996).

2.4. AÇÃO ANTICOLINESTERÁSICA DOS FLAVONOIDES

O interesse nos flavonoides advém do fato destes compostos possuírem uma grande diversidade de funções biológicas. Neste sentido os flavonoides podem atuar como antialérgicos, hepatoprotetores, antiespasmódicos, anti-hipertensivos, diuréticos, hipoglicemiantes, entre outros (BRUNETON, 2001; ARAUJO *et al*, 2005; SHARMA *et al*, 2008; DORNAS *et al*, 2007). Apesar de serem numerosas as atividades biológicas descritas na literatura, existem quatro atividades principais pelos quais os flavonoides são bem conhecidos, são elas: atividade antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e antitumoral (SARTI; CARVALHO, 2004; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Entretanto, os flavonoides têm se destacado pela inibição enzimática das colinesterases. Em um estudo desenvolvido por Guo e colaboradores (2010), vinte e um flavonoides de subclasses diferentes (flavononas, flavonas, flavonóis e isofalvonas), foram testados quanto ao seu potencial de inibição *in vitro* da atividade da AChE e os resultados sugerem que os flavonoides podem ser candidatos potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Alzheimer. Entre os flavonoides testados, a galangina isolada a partir dos rizomas de *Alpiniae officinarum* (Hance.) mostrou maior efeito inibitório sobre a atividade da AChE com inibição de mais de 55% e IC₅₀ de 120 µM.

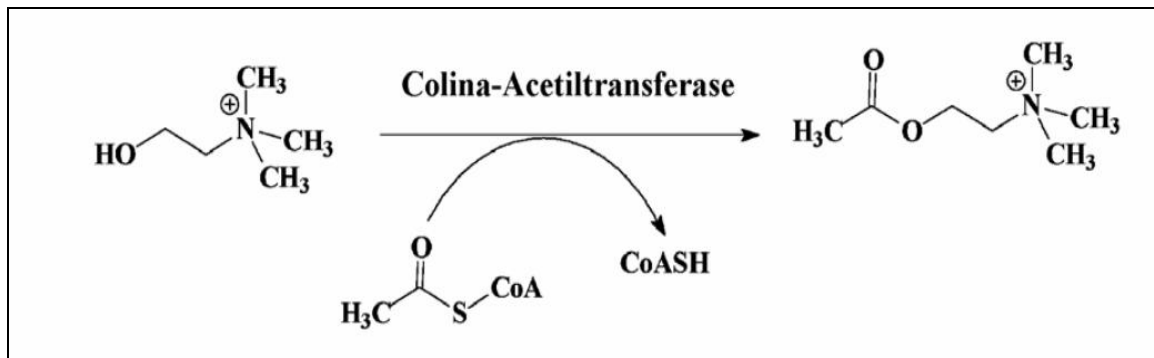
Outro estudo realizado por Katalinic e colaboradores (2010) demonstrou que os flavonoides galangina, canferol, quercetina, miricetina, fisetina, apigenina, luteolina e rutina, em concentrações não citotóxicas modulam a atividade da butirilcolinesterase (BuChE) humana, trazendo boa perspectiva para o tratamento dos sintomas de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer.

De acordo com este estudo, as características estruturais de um flavonoide com bom potencial de inibição sobre o sítio ativo da BuChE, envolvem o número e a posição dos grupos hidroxilas, que podem formar múltiplas ligações de hidrogênio no sítio da enzima. Contudo, a presença de glicosídeos, representa um impedimento estérico para a acomodação do flavonoide no sítio ativo da BuChE, o que pode resultar em menor potência de inibição. Vale mencionar que entre os flavonoides testados a galangina mostrou seletividade 12 vezes maior para interação com a BuChE do que para a AChE (KATALINIC *et al*, 2010).

2.5. ACETILCOLINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A acetilcolina é uma molécula sintetizada no citosol, a partir da colina e da acetil Coenzima A (acetil-CoA) através da ação catalítica da enzima colina acetiltransferase (Figura 2). A acetil-CoA é sintetizada nas mitocôndrias, que estão presentes nas terminações nervosas. A colina é transportada do líquido extracelular para terminação neuronal por um transportador de membrana sódio-dependente. Uma vez sintetizada, a acetilcolina é transportada do citosol dentro das vesículas por um antiportador que remove prótons. A sua liberação depende da presença de cálcio extracelular e ocorre quando o potencial de ação atinge seu fim e desencadeia um influxo suficiente de cálcio (KATZUNG, 2005).

Figura 2 - Reação de biossíntese da acetilcolina



Fonte: VIEGAS JUNIOR *et al*, 2004.

Após a liberação da acetilcolina na terminação pré-sináptica, as suas moléculas podem ligar-se ao receptor da acetilcolina e ativá-lo. Por fim, toda acetilcolina liberada difunde-se dentro de uma faixa de alcance das colinesterases. Estas enzimas clivam a acetilcolina em colina e acetato, que são desprovidos de efeito transmissor significativo, o que resulta na interrupção da ação do transmissor (KATZUNG, 2005).

A acetilcolina possui efeitos principalmente excitatórios, que são mediados por vários subtipos de receptores nicotínicos (NN, NM) ou muscarínicos (M1, M2, M3, M4, M5). As principais funções atribuídas às vias colinérgicas estão relacionadas com o alerta, aprendizado, a memória e o controle motor. Os neurônios colinérgicos têm fundamental importância em distúrbios neurodegenerativos, como a demência e o Mal de Parkinson (RANG *et al*, 2004). Na doença de Alzheimer ocorre degeneração de neurônios colinérgicos, com redução de enzimas que sintetizam e biotransformam a acetilcolina. Fármacos como a tacrina, donepezil e rivastigmina preservam a acetilcolina por serem anticolinesterásicos (THADDEU, 2006).

2.6 BUTIRILCOLINESTERASE

A butirilcolinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8), também conhecida como pseudo colinesterase ou colinesterase não neuronal, é extensamente distribuída em diferentes tecidos do corpo humano, tais como fígado, pulmão, coração, além de estar presente no plasma, nas células sanguíneas e nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central. Esta enzima é muito semelhante à acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) em sequência e estrutura terciária e catalisa a hidrólise de ésteres de colina, incluindo a acetilcolina (KALMAN *et al*, 2004).

Em relação ao aspecto molecular a AChE e a BuChE compartilham 65% de homologia na sequência de aminoácidos e são codificados por diferentes genes nos cromossomos humanos 7 (especificamente 7q22) e 3 (especificamente 3q22), respectivamente (LANE *et al*, 2006).

Ambas as colinesterases possuem um sítio acessível através de um canal com aproximadamente 20 Å de profundidade, o qual é constituído por uma tríade catalítica (serina, histidina e glutamato) essencial para atividade enzimática. Entretanto, o volume interno do sítio ativo da AChE é relativamente pequeno (302 Å³), ao passo que BuChE possui um sítio ativo de volume consideravelmente maior (502 Å³). Essa diferença é consequência dos diferentes aminoácidos presentes em cada um dos sítios e está diretamente ligada à acomodação e seletividade dos diferentes inibidores da AChE ou da BuChE (LANE *et al*, 2006).

A AChE é a forma mais abundante de colinesterases no cérebro humano e o papel menor da BuChE geralmente é negligenciado. Contudo, tem sido sugerido que a BuChE presente no cérebro desempenhe um papel adicional importante na transmissão colinérgica e exerça influencia na expressão da AChE (KALMAN *et al*, 2004).

Vale mencionar que durante o desenvolvimento da doença de Alzheimer a atividade BuChE, aumenta em 40-90% nas áreas cerebrais mais afetadas, como a córtex temporal e hipocampo, enquanto ocorre declínio da atividade da AChE. Portanto, a inibição da BuChE pode ter significante benefícios clínicos no tratamento dos sintomas neurodegenerativos e de demência, como ocorre na doença de Alzheimer (KATALINIC *et al*, 2010).

2.7 DOENÇA DE ALZHEIMER

A demência, embora possa ocorrer nas idades jovens por enfermidades cerebrais variadas, está associada principalmente ao fenômeno de envelhecimento cerebral, acometendo indivíduos com idade superior a 60 anos. (TREVISAN; MACEDO, 2003). Entende-se por demência um estado ou condição anormal progressiva e degenerativa do funcionamento cerebral, que compromete a função cognitiva, a memória, o estado emocional e a operacionalidade de tarefas cotidianas de um indivíduo (NASCIMENTO, 2009).

No Brasil, com o aumento da expectativa de vida, o número de pessoas com mais de 60 anos tende a aumentar exponencialmente nos próximos 30 anos. Nesta faixa de idade, 40% da população é acometida por alguma forma de demência e, deste grupo, 10 a 15% sofrem de

uma doença degenerativa de causa não totalmente conhecida denominada doença de Alzheimer (NASCIMETO, 2009).

As características básicas da doença de Alzheimer foram inicialmente descritas por Alois Alzheimer (1864-1915). Este médico alemão relatou o caso de uma paciente de 51 anos de idade que apresentava declínio progressivo das funções cognitivas, sintomas focais, alucinações, ilusões e comprometimento psicossocial. A autópsia da paciente revelou em seu cérebro lesões nunca antes vistas. Tratava-se, macroscopicamente, de um cérebro bastante atrofiado e, microscopicamente, havia placas estranhas e fibras retorcidas, entrelaçadas umas nas outras. Desde então, este tipo de degeneração ficou conhecido como placas senis, uma das características fundamentais da doença de Alzheimer.

Dentre as causas mais evidentes da gênese desta doença estão a ocorrência de deposição extracelular de peptídeo β -amilóide (derivado do precursor amilóide de proteína – APP) em plaquetas senis e a formação errática de neurofibrilas intracelulares (contendo uma forma anormal, fosforilada, de uma proteína associada a microtúbulos - tau). Em nível celular, a doença de Alzheimer está associada à redução das taxas de acetilcolina no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical, além de outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P em menor extensão (VIEGAS JUNIOR *et al*, 2004).

Os aspectos neuropatológicos observados em cérebros de indivíduos com doença de Alzheimer incluem: depósitos fibrilares amilóides, placas senis, acúmulo de filamentos anormais da proteína tau e conseqüente formação de novelos neurofibrilares. Além disso, observa-se degeneração dos neurônios colinérgicos, ocorrendo também uma redução dos marcadores colinérgicos, com redução da colina acetiltransferase e da acetilcolinesterase (VIEGAS JUNIOR *et al*, 2004).

Diante do exposto, duas hipóteses complementares têm sido propostas, a fim de explicar a etiologia da doença. De acordo com a hipótese da cascata amiloidal, a neurodegeneração na doença de Alzheimer inicia-se com a clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide (APP) e resulta na produção, agregação e deposição da substância β -amilóide e placas senis. De acordo com a hipótese colinérgica, a disfunção do sistema colinérgico é capaz de produzir uma deficiência de memória, ocasionando a doença de Alzheimer (FREITAS *et al*, 2009).

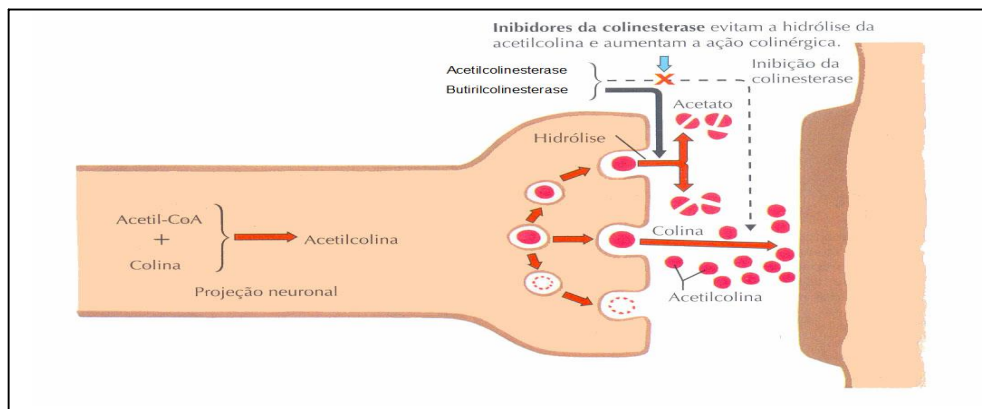
2.8 INIBIDORES DE COLINESTERASES NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

O tratamento da doença de Alzheimer inclui abordagens farmacológicas e não farmacológicas combinadas, ou isoladas. Em caso de tratamento não farmacológico têm-se técnicas de reabilitação cognitiva como orientação para a realidade, treinamento da memória e técnicas de estimulação por meio da arte e de outras terapias ocupacionais, sociais e de recreação (MACHADO, 2006).

Em relação ao tratamento farmacológico da doença de Alzheimer, o mesmo pode ser definido em quatro níveis: (1) terapêutica específica, que tem como objetivo reverter processos patofisiológicos que conduzem à morte neuronal e à demência; (2) abordagem profilática, que visa retardar o início da demência ou prevenir declínio cognitivo adicional, uma vez deflagrado processo; (3) tratamento sintomático, que visa restaurar, ainda que parcial ou provisoriamente, as capacidades cognitivas, as habilidades funcionais e o comportamento dos pacientes portadores de demência; e (4) terapêutica complementar, que busca o tratamento das manifestações não-cognitivas da demência, tais como depressão, psicose, agitação psicomotora, agressividade e distúrbio do sono (FORLENZA, 2005).

A terapia frequentemente utilizada para o tratamento da doença de Alzheimer é sintomática e envolve o uso dos inibidores das colinesterases, que aumentam a neurotransmissão colinérgica, uma vez que atua corrigindo a deficiência de acetilcolina cerebral. Estes inibidores atuam aumentando os níveis de acetilcolina na fenda sináptica pela ação sobre as colinesterases, visto que estas enzimas são responsáveis pela degradação da acetilcolina em acetato e colina, por hidrólise enzimática (Figura 3). O resultado é a melhoria dos sintomas cognitivos, comportamentais e funcionais relacionados às demências hipocolinérgicas, que têm a doença de Alzheimer como a principal representante (SMALL; MAYEUX, 2002).

Figura 3 - Mecanismo de ação dos anticolinesterásicos



Fonte: RAFFA *et al*, 2006 (adaptada)

Atualmente há quatro fármacos no mercado: donepezil (Aricept®; Eisai/Pfizer), rivastigmina (Exelon®; Novartis), galantamina (Razadyne®; Johnson & Johnson) e tacrina (Cognex®; First Horizon Pharmaceuticals) como inibidores de colinesterases. Estes inibidores podem ser classificados com base na seletividade, reversibilidade e duração da inibição (FREITAS *et al*, 2009).

A tacrina, a galantamina e o donepezil, por exemplo, são inibidores reversíveis da acetilcolinesterase de curta, intermediária e longa duração, respectivamente. Enquanto que a inibição desta enzima tem duração intermediária para o inibidor pseudo-irreversível (ou lentamente reversível) rivastigmina, e longa duração para o inibidor irreversível metrifonato. Este último teve os seus estudos clínicos descontinuados, devido à sua toxicidade. Tacrina e rivastigmina inibem também a butirilcolinesterase, o que pode representar benefícios adicionais ao tratamento (FORLENZA, 2005).

A diversidade estrutural dos conhecidos inibidores das colinesterases e a possibilidade de se explorar modos de ação distintos sobre estas enzimas têm estimulado o estudo fitoquímico de várias espécies vegetais, que possam fornecer novos modelos de substâncias anticolinesterásicas. Neste sentido, vários exemplares da biodiversidade têm sido estudados em decorrência da utilização popular ou de dados etnobotânicos relacionados a esta finalidade (VIEGAS JUNIOR *et al*, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES

Sílica gel 60 (70-230 mesh), Vetec[®] e solventes orgânicos (hexano, acetato de etila e metanol) foram utilizados na cromatografia em coluna. Cromatofolhas de alumínio, Merck[®] e eluente tolueno/ácido acético (4:1) foram utilizados na cromatografia em camada delgada. Os compostos foram revelados em câmara de luz ultravioleta (254 e 366nm) e solução metanólica de H₂SO₄ a 10%, seguida de aquecimento a 100°C. A fase móvel composta por solução aquosa de H₂O/H₃PO₄ a 0,1% e MeOH, grau analítico foi utilizada na análise de CLAE-DAD

Butirilcolinesterase (BuChE), acetiltiocolina (ACTI), e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich[®], assim como a Albumina de Soro Bovino (BSA). A neostigmina foi adquirida da RBI[®] e o tampão TRIS-HCl e TRIS-HCl-BSA foi preparado com o sal TRIS e HCl comercializados pela VETEC[®].

3.2. EQUIPAMENTOS

As análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas em cromatógrafo líquido Merck-Hitachi[®] LaChrom Elite, equipado com Detector de Arranjo de Diodos (DAD). A coluna utilizada foi LiCospher 100 RP18 (5 µm, com as dimensões 250 mm x 04 mm), Merck[®].

Os ensaios em CLAE-DAD acoplada a Espectroscopia de Massas (EM/EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados pela central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP). Na CLAE-DAD/EM/EM foi utilizado equipamento Esquire 3000 Plus-Bruker Daltonics, com ionização electrospray, capilar de 4000V, nebulizador: 27psi, gás seco de 7 litros/min e temperatura de 320 °C. Os espectros de

RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em equipamento DPX-300 (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 300 MHz), em tubos de 5 mm, sendo as amostras solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado e o tetrametilsilano (TMS) utilizado como referência interna. Os seguintes espectros de RMN foram obtidos: ^1H ; ^1H - ^1H -COSY; ^{13}C , ^{13}C DEPT 135, HMBC ^1H - ^{13}C e HMQC ^1H - ^{13}C .

A atividade enzimática foi mensurada através da absorbância em um leitor de placas da marca Thermo-Scientific[®], modelo MultiSkan FC. Foram utilizados também balança (Marte[®], AY220), lavadora ultra-sônica (Ultra Cleaner[®], 800 A) e agitador de tubos do tipo vórtex (Phoenix[®], AP56); além de pipetas automáticas de volume variável (Nichiryo[®], Nichipet[®] 7000).

3.3. MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *Barbacenia blanchetii* foram coletadas no município de Morro do Chapéu, Chapada Diamantina, Bahia. A espécie foi identificada pelo professor PhD. Renato de Mello- Silva do Departamento de Biologia da Universidade de São Paulo (USP). Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana com o código: HUEFS 170612.

Figura 4 - *Barbacenia blanchetii*



3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O material coletado de *B. blanchetii* foi seco em estufa a 50°C e pulverizado em moinho de facas, perfazendo 01 Kg da planta moída. Os constituintes químicos foram extraídos por maceração em hexano, acetato de etila e metanol, sucessivamente. Os solventes foram removidos em rotaevaporador à pressão reduzida e temperatura controlada (60°C) para obtenção dos extratos em hexano (63g), em acetato de etila (78g) e em metanol (82g).

3.5. ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CLAE-DAD

Os extratos de *B. blanchetii* foram analisados por CLAE-DAD. Inicialmente as amostras foram resuspensas em MeOH grau analítico (1mg/mL), e em seguida homogeneizadas em ultrassom e filtradas através de membranas Millipore® de 0,45 µm. O volume de injeção da amostra foi de 20µL e a fase móvel utilizada composta por solução aquosa de H₂O/H₃PO₄ a 0,1% e MeOH, na forma de gradiente, conforme a Tabela 2. O fluxo foi mantido a 1,0mL/min e a temperatura da coluna à 30°C Os cromatogramas foram monitorados a 320nm e os dados tratados pelo Programa EZChrom Elite.

Tabela 2 - Gradiente de solventes utilizados na análise por CLAE-DAD

Tempo (min)	Solvente %	
	H ₃ PO ₄ (aq) 0,1%	MeOH
0-19	75	25
20 – 24	0	100
25 – 35	75	25

3.6. FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM METANOL

Cerca de 50g do extrato metanólico foi fracionamento em Cromatografia em Coluna aberta empacotada com sílica gel. Para isto, o extrato foi adsorvido em sílica gel para confecção da pastilha e eluído por solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol). As frações resultantes, 10 frações, foram monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) comparativa e por CLAE-DAD.

3.7. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO FLAVONOIDE ISOLADO

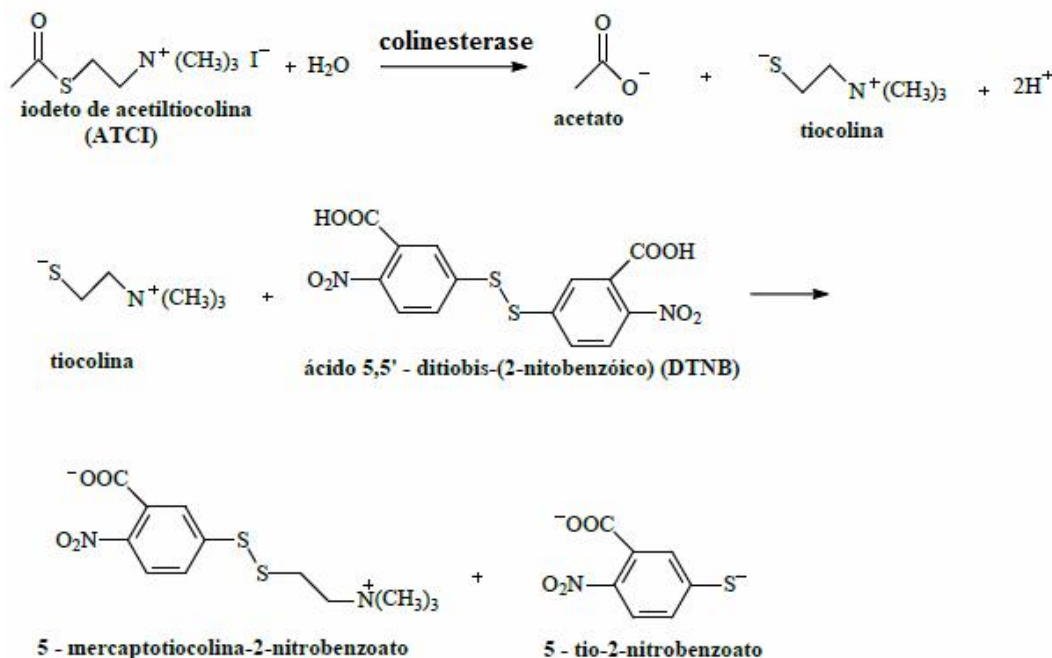
A estrutura química do flavonoide isolado a partir de *B. blanchetii* foi determinada com base nos dados espectrométricos de ultravioleta, espectroscopia de massas e de ressonância magnética nuclear. Os resultados obtidos foram comparados com informações da literatura.

3.8. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA BuChE

A atividade da butirilcolinesterase (BuChE) foi avaliada de acordo com o método de Ellman (1961), com pequenas adaptações para microescala. O método de Ellman baseia-se na conversão da acetilticolina em tiocolina, a qual é catalisada pelas colinesterases. O produto da reação (a tiocolina) interage com o DTNB, ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), formando um ânion amarelo cuja absorbância é medida em espectrofotômetro em 405 nm (Figura 5).

Para avaliar a inibição da atividade da butirilcolinesterase foi adotado protocolo cuja concentração do substrato permanece constante, enquanto a concentração da amostra é variável. A aplicação deste protocolo permitiu avaliar a concentração que inibe 50% da atividade da butirilcolinesterase (IC₅₀) e também a inibição máxima (E_{max}) dessa enzima.

Figura 5 – Reações envolvidas no método de Ellman



Os extratos, frações e o flavonoide isolado de *B. blanchetii* foram solubilizados em água e metanol 1:1, sendo obtidas soluções a 10mg/mL. A partir dessa concentração foram realizadas diluições seriadas para obtenção de concentrações que variaram de 10^{-2} a 10^{-7} mg/ml. As soluções foram submetidas à agitação em ultrassom com aquecimento a 50 °C.

Nas placas de 96 poços, foram pipetadas em triplicata, tampão TRIS-HCl (pH 8,0) contendo 0,1% de BSA (q.s.p. 300 μ L), a amostra (0,1 μ g/mL – 10mg/mL; concentração final na placa), a enzima BuChE 50 μ L; (concentração final 0,002 U/mL). Essa mistura foi incubada durante 20 minutos e após a incubação, adicionou-se 62 μ L de DTNB (concentração final 2,98 mM) e 50 μ L de ACTI (concentração final 0,791 mM). O volume final da reação foi de 300 μ L e uma triplicata contendo todas as substâncias, com exceção do inibidor, foi utilizada para os cálculos como 100% da reação. A absorbância foi lida nos tempos 0, 30 e 60 minutos após a adição do substrato, sendo o tempo zero considerado o branco da reação. Todos os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes.

Um ensaio com neostigmina a 1 μ g/mL (concentração final na placa) foi efetuado em todas as placas em triplicata como controle positivo. Além disso, curvas concentraçõ-

inibição para a neostigmina com concentrações de 1 nM a 0,1 mM foram realizadas como controle positivo, seguindo o mesmo protocolo utilizado para os extratos, frações e para o flavonoide isolado.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As IC_{50} e os E_{max} foram determinados por regressão não-linear. Os dados foram expressos como média e desvio padrão para os E_{max} ou média e intervalo de confiança para as IC_{50} . Os gráficos foram expressos em % de atividade *versus* Log da Concentração. O E_{max} apresentado equivale a $(100\%) - (\% \text{ de atividade})$. As diferenças de inibição entre os tempos 30 e 60 foram analisadas pelo teste-*t* de Student. Um nível de significância de 5% foi estabelecido para todas as análises. O programa GraphPad PrismTM (versão 5.0) foi utilizado para as análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DOS EXTRATOS DE *B. blanchetii* POR CLAE-DAD

O presente trabalho analisou por CLA-DAD os extratos de *B. blanchetii*, visando caracterizar a presença de flavonoides através do tempo de retenção comparativo em coluna e pela análise dos espectros de ultravioleta dos picos eluídos. Em relação ao Tempo de Retenção (Tr) para compostos da classe dos flavonoides, nota-se que a maior afinidade pela fase estacionária apolar - fase reversa (octadecilsilica-C18) resulta em maior Tr em decorrência de substituintes apolares, como por exemplo grupos metoxila. Neste caso, as unidades de glicosídeo, teriam maior afinidade pela fase móvel e, portanto menor tempo de retenção na coluna (GREENHAM *et al*, 1995).

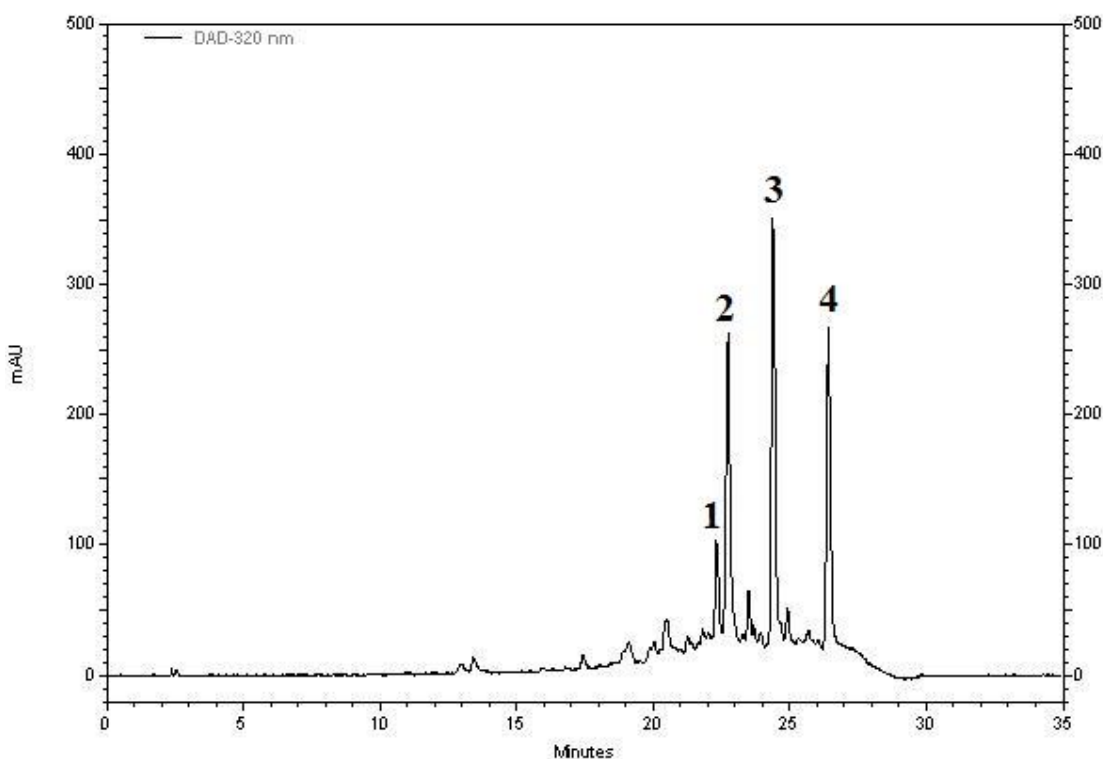
Este raciocínio pôde ser confirmado através da análise realizada com padrões de flavonoides (Tabela 3), em que as amostras foram injetadas nas mesmas condições cromatográficas que os extratos de *B. blanchetii*. Observou-se que os flavonoides glicosilados (hesperidina e rutina) apresentaram menor tempo de retenção (Tr = 12,53 e 12,81 minutos), enquanto que o flavonoide hidroxilado (quercetina) apresentou tempo de retenção intermediário (Tr = 15,64 minutos) e o flavonoides polimetoxilado (5 hidroxi-3,7,3', 4' tetrametoxiflavona) apresentou Tr elevado (Tr = 20,02 minutos).

Tabela 3 - Absorções máximas de UV (λ_{\max}) e Tempo de Retenção (min) de padrões de flavonoides

Amostra	Banda I (λ_{\max})	Banda II (λ_{\max})	Tr (min)
Hesperidina	327	284	12,53
Rutina	354	256	12,81
Quercetina	370	255	15,64
5 hidroxi-3,7,3', 4' tetrametoxiflavona	339	278	20,02

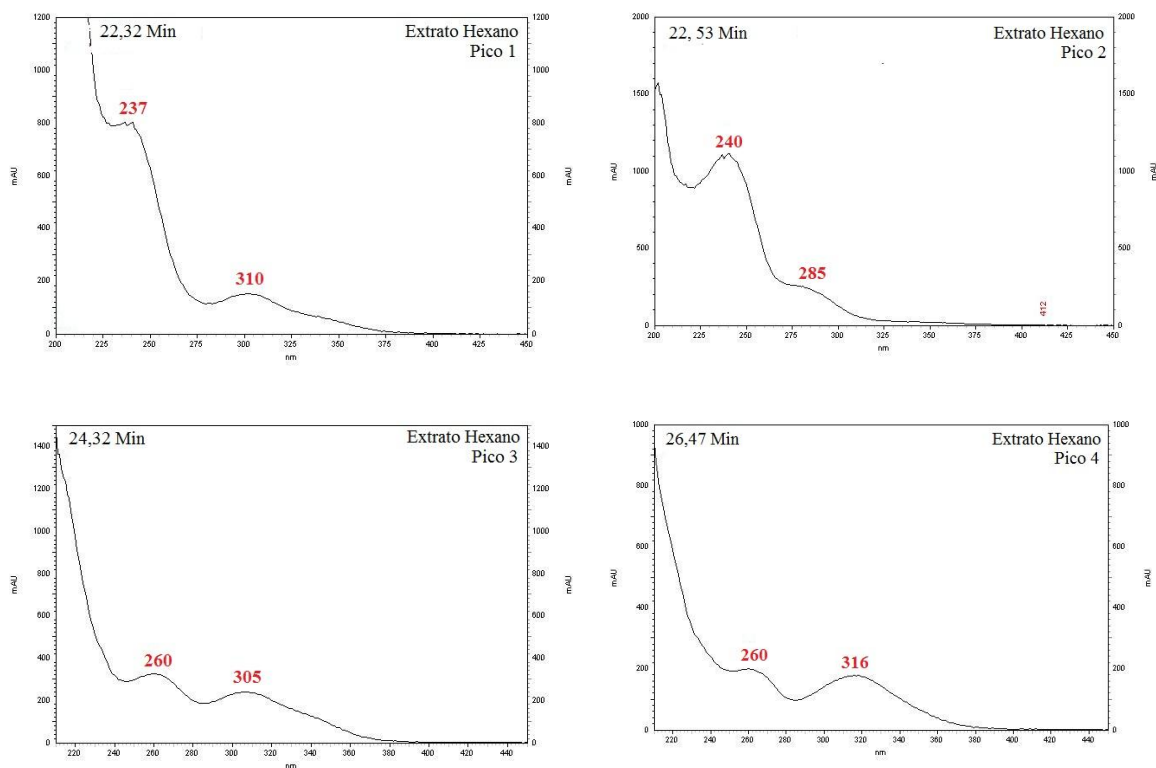
O cromatograma do extrato hexânico de *B. blanchetii* obtido por CLAE-DAD e monitorado em 320 nm (Figura 6), apresentou 4 picos principais com tempo de retenção entre 22 e 27 minutos. O tempo de retenção destes picos quando comparado ao do padrão 5 hidróxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona sugere a presença de compostos com caráter lipofílico.

Figura 6 - Cromatograma por CLAE-DAD do extrato hexano de *B. blanchetii*



Neste cromatograma, os picos 3 e 4 apresentaram duas fortes absorções em regiões características de compostos da classe dos flavonoides (Figura 7). Os espectros de ultravioleta para compostos da classe dos flavonoides consistem tipicamente em duas bandas de maior absorção na região de 240 a 400 nm. A banda I absorve entre 300 e 400 nm e refere-se ao anel B (cinamoila). Já a banda II absorve entre 240 e 285 nm e representa o anel A (benzoila) (ZUANAZZI, MONTANHA, 2007).

Figura 7 - Espectros de UV dos picos do cromatograma por CLAE-DAD do extrato hexano de *B. blanchetii*



A posição das bandas fornecem informações importantes sobre a classe dos flavonoides. A Banda I de flavonas ocorre na faixa de 304 a 350 nm, enquanto que a Banda I de flavonóis ocorre em comprimento de onda maior (352 a 385 nm). Os di-hidroflavonóis, e isoflavonas exibem uma banda I de baixa intensidade, que frequentemente aparece como ombro da banda II. As flavanonas em geral, apresentam no espectro UV uma banda de absorção intensa entre 270 e 295 nm (banda II) e uma banda de menor intensidade entre 300 e 330 nm (banda I), devido à ausência de insaturação entre C-2 e C-3 (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

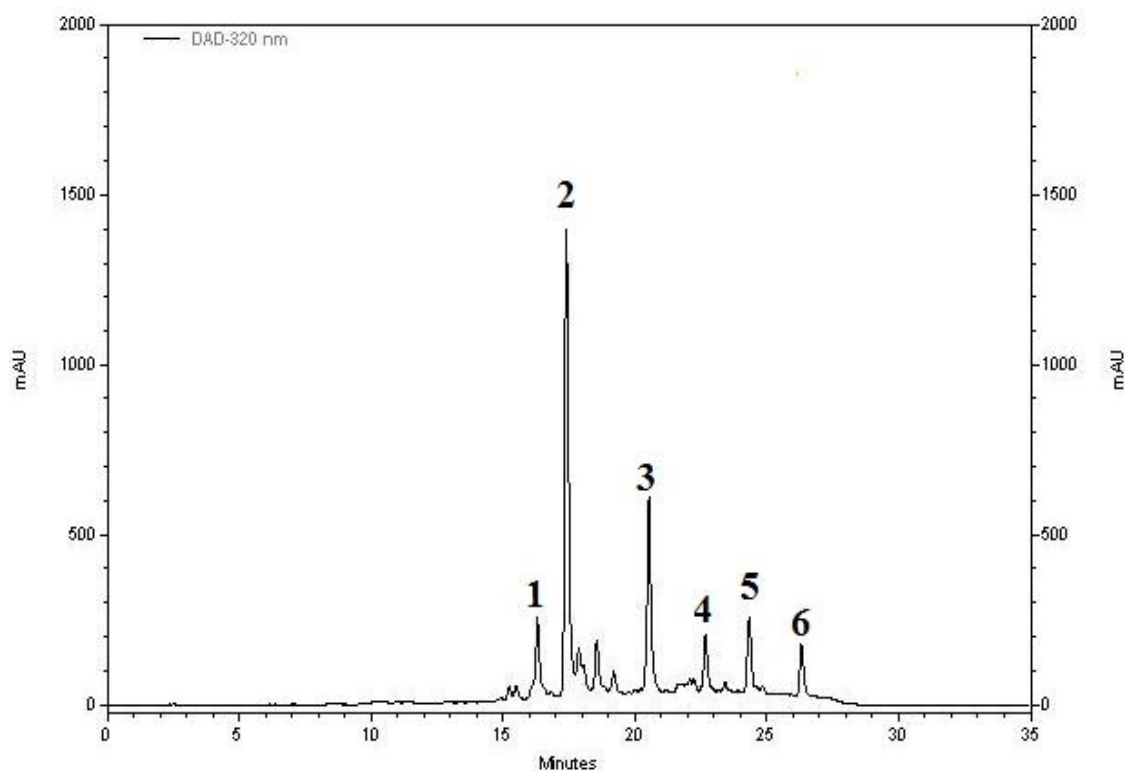
Enquanto que as chalconas e auronas apresentam espectro de UV com uma banda I dominante e uma banda II relativamente pequena. Em chalconas observa-se uma banda II com máximos entre 220 e 270 nm e banda I com máximos entre 340 e 390 nm. As antocianinas e antocianidinas apresentam uma banda I com máximo de absorção entre 465 e

550 nm e banda II representada por um sinal de pequena intensidade, ocorrendo entre 270 e 280 nm (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006). De acordo com esses dados, é provável que os picos 3 e 4 do cromatograma do extrato hexânico se refiram a flavonas.

O aumento do grau de oxigenação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico, ou seja, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda. No caso de flavonas oxigenadas apenas no anel A, os espectros de UV tendem a dar uma pronunciada Banda II e uma Banda I mais fraca. Já em moléculas semelhantes que também possuem oxigenação no anel B, a Banda I é mais pronunciada e aparece em comprimento de ondas maiores o que sugere que as flavonas referentes aos picos 3 e 4 apresentem oxigenação no anel B.

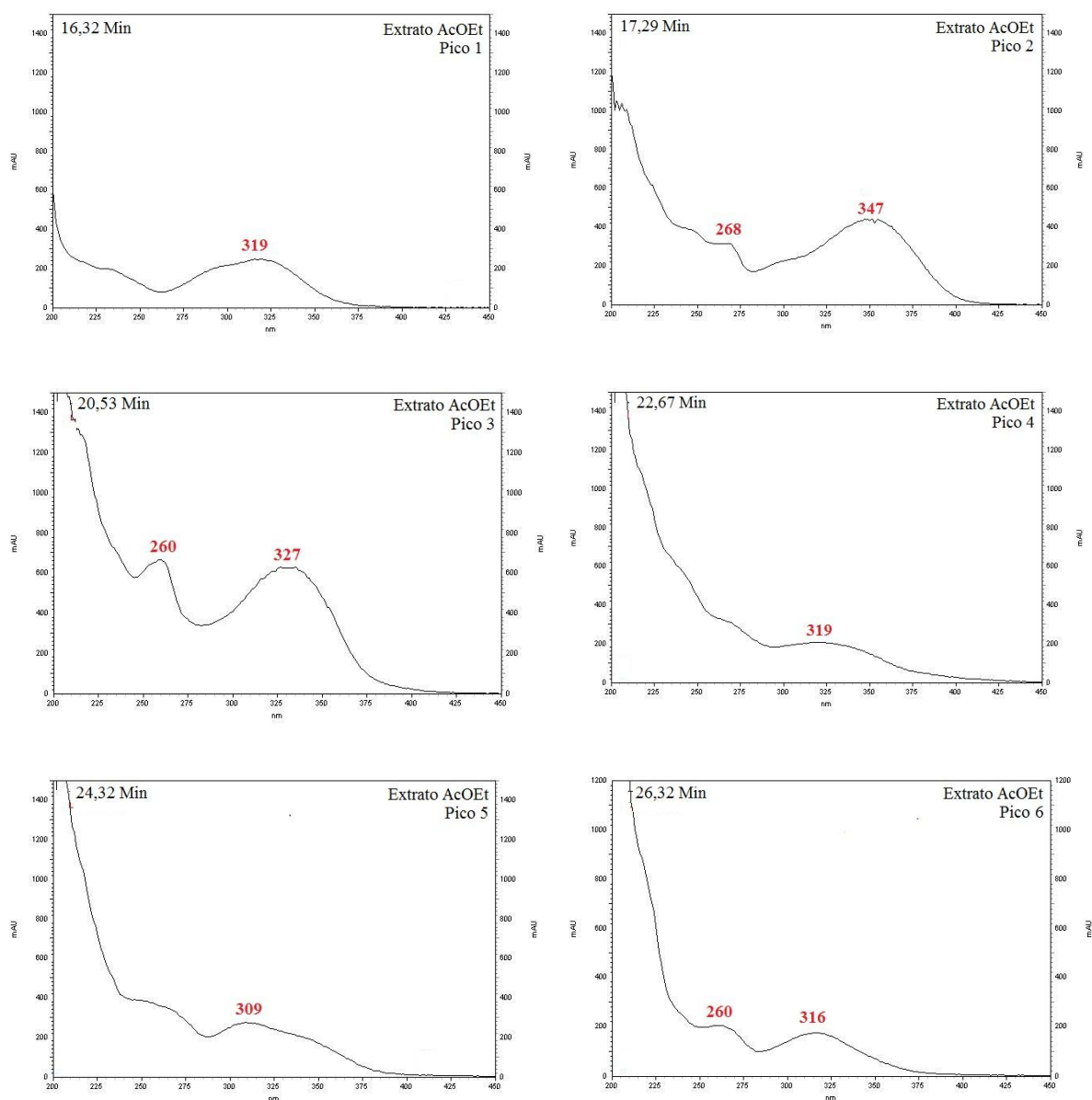
O cromatograma obtido por CLAE-DAD a partir do extrato em acetato de etila de *B. blanchetii* apresentou maior número de picos em relação ao extrato hexânico. Os picos foram eluídos entre 16 e 29 minutos, demonstrando a presença de compostos lipofílicos. O pico 2, eluído em torno de 17 minutos, se destaca devido a maior intensidade (em 320nm) em relação aos demais picos. Este cromatograma está representado na Figura 8.

Figura 8 - Cromatograma por CLAE-DAD do extrato AcOEt de *B. blanchetii*



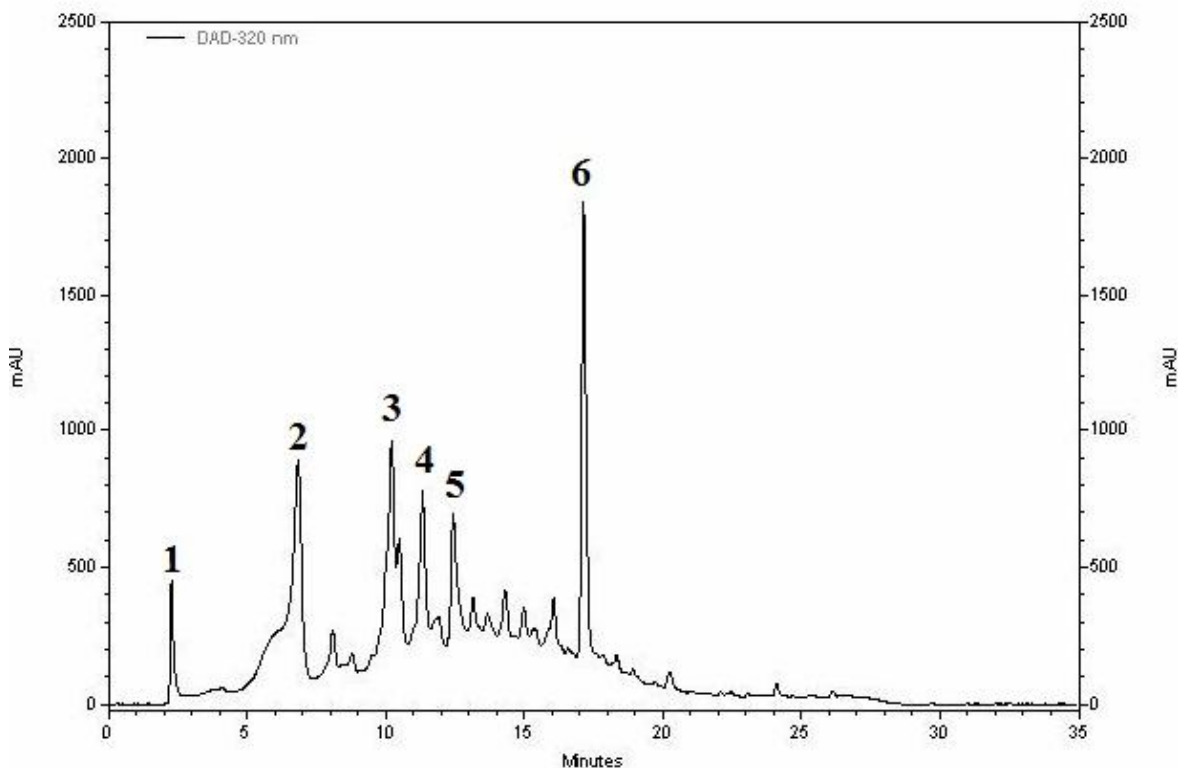
Os picos do extrato de acetato de etila apresentam duas fortes absorções de UV em região típica de compostos da classe dos flavonoides (Figura 9). Os espectros de UV dos picos 2 e 3 se destacam por apresentarem Banda I pronunciadas, o que sugere maior grau de oxigenação do anel B em relação ao dos outros compostos flavonoídicos. Observa-se ainda que os espectros de UV de todos os picos numerados apresentam absorções entre 304-350nm referentes à Banda I e, portanto, a tendência é que os picos desse cromatograma também se refiram a flavonas.

Figura 9 - Espectros de UV dos picos do cromatograma do extrato AcOEt de *B. blanchetii*



Na análise por CLAE-DAD do extrato em metanol, observa-se no cromatograma a presença de 6 picos principais em 320nm, os quais apresentam diferentes intensidades, contudo o pico 6 se destaca pela maior intensidade (Figura 10). Neste cromatograma os picos foram eluídos no intervalo entre 2 e 18 minutos, sendo que o pico majoritário eluiu em 17,29 minutos. Tendo em vista as mesmas condições cromatográficas, esse dado difere de modo significativo das análises anteriores e demonstra a presença de compostos de maior polaridade, uma vez que existem compostos com maior afinidade pela fase móvel polar ($T_r=2,33$ min).

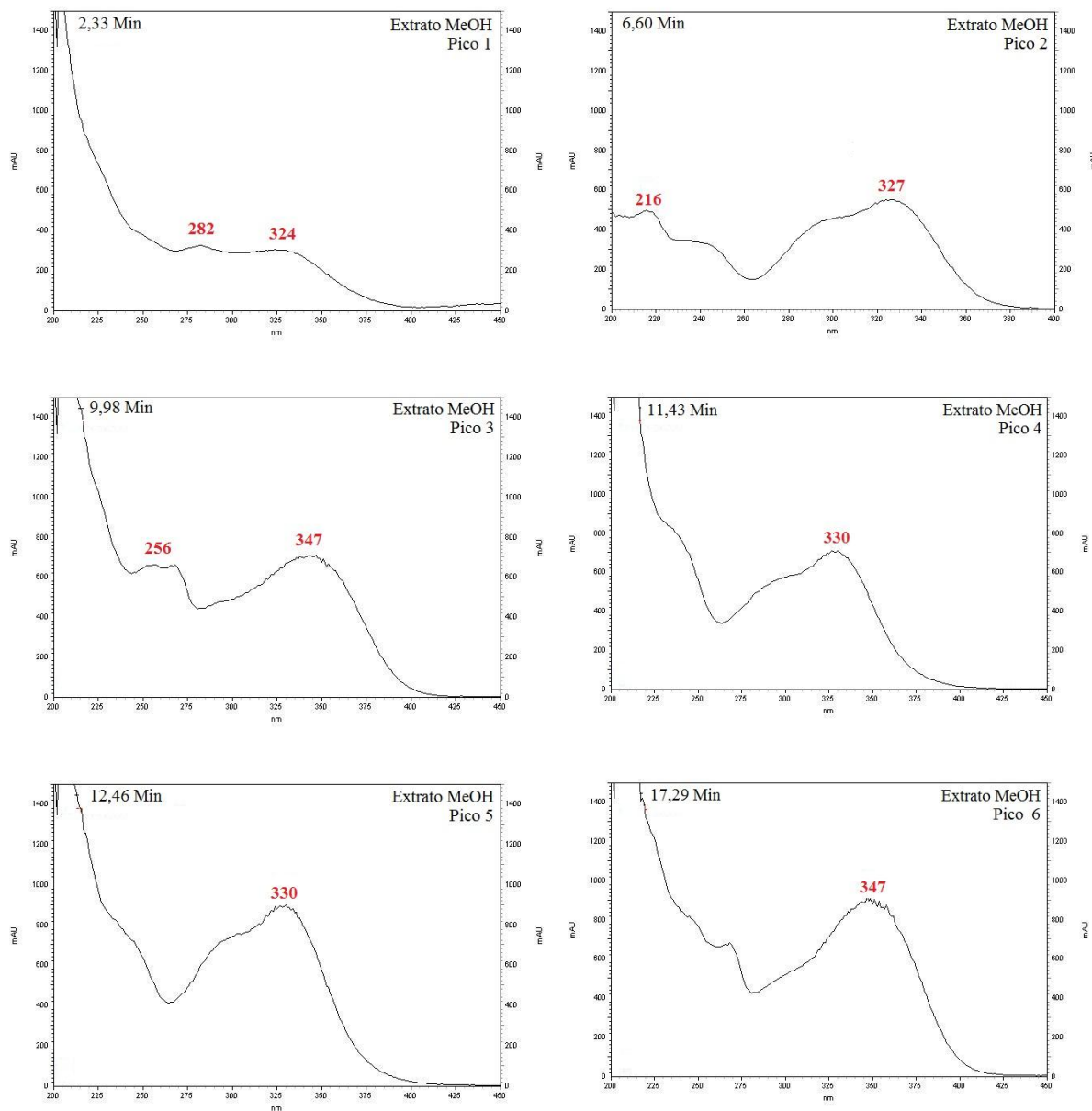
Figura 10 - Cromatograma por CLAE-DAD do extrato MeOH de *B. blanchetii*



Por outro lado, a análise dos espectros de UV dos picos do extrato metanólico (Figura 11) apresentam absorções que indicam a presença de flavonoides da classe das flavonas, com exceção apenas do Pico 1. Nesses picos, a Banda I é mais pronunciada, o que sugere oxigenação no anel A e B. Os espectros de UV dos picos 4 e 5 apresentam perfil semelhante.

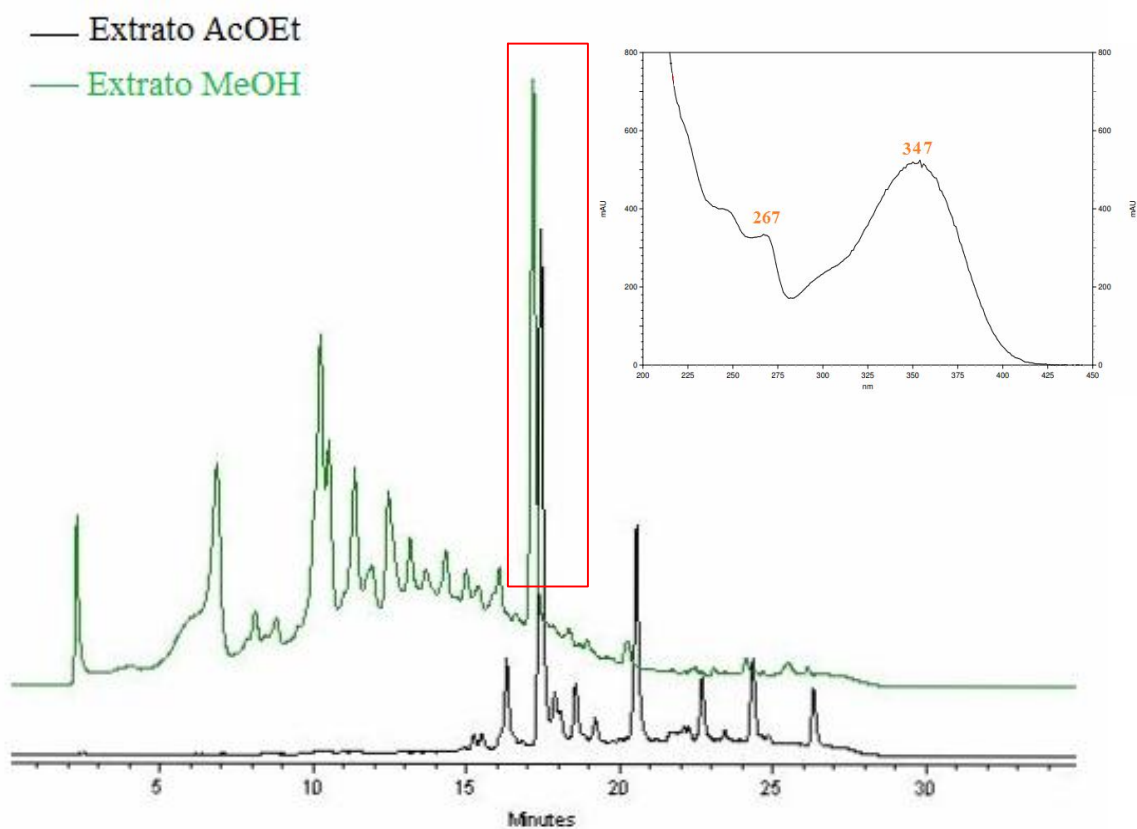
Esta informação aliada ao próximo tempo de retenção em coluna destes picos, sugere que se trata de compostos com elevado grau de similiaridade estrutural.

Figura 11 - Espectros de UV dos picos do cromatograma do extrato MeOH de *B. blanchetii*



A sobreposição dos cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol de *B. Blanchetii* (Figura 12) demonstra a presença de um pico majoritário em comum nestes extratos. Isto justifica a potência semelhante do extrato em acetato de etila e em metanol em relação à inibição da atividade da butirilcolinesterase, conforme item 4.3.

Figura 12- Sobreposição dos cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos AcOEt e MeOH de *B. blanchetii* e espectro de UV do pico majoritário em 320nm



O espectro de UV deste composto é característico de flavonoide da classe das flavonas, uma vez que a banda I absorve em 347 nm. Esta banda aparece de forma mais pronunciada em relação à Banda II, o que sugere oxigenação no Anel A e no Anel B. Entretanto, esta absorção fica praticamente no limite entre a classificação de flavonóis e

flavonas, trazendo a suspeita de ser um flavonol com baixo grau de oxigenação no anel B ou uma flavona com alto grau de oxigenação neste anel. A Banda II, por sua vez, apresenta absorção máxima em 267 nm e fornece informações importantes sobre o padrão de oxigenação do anel B, visto que nesta banda aparece um ombro no lado do pico referente à oxigenação em 3', 4', 5'.

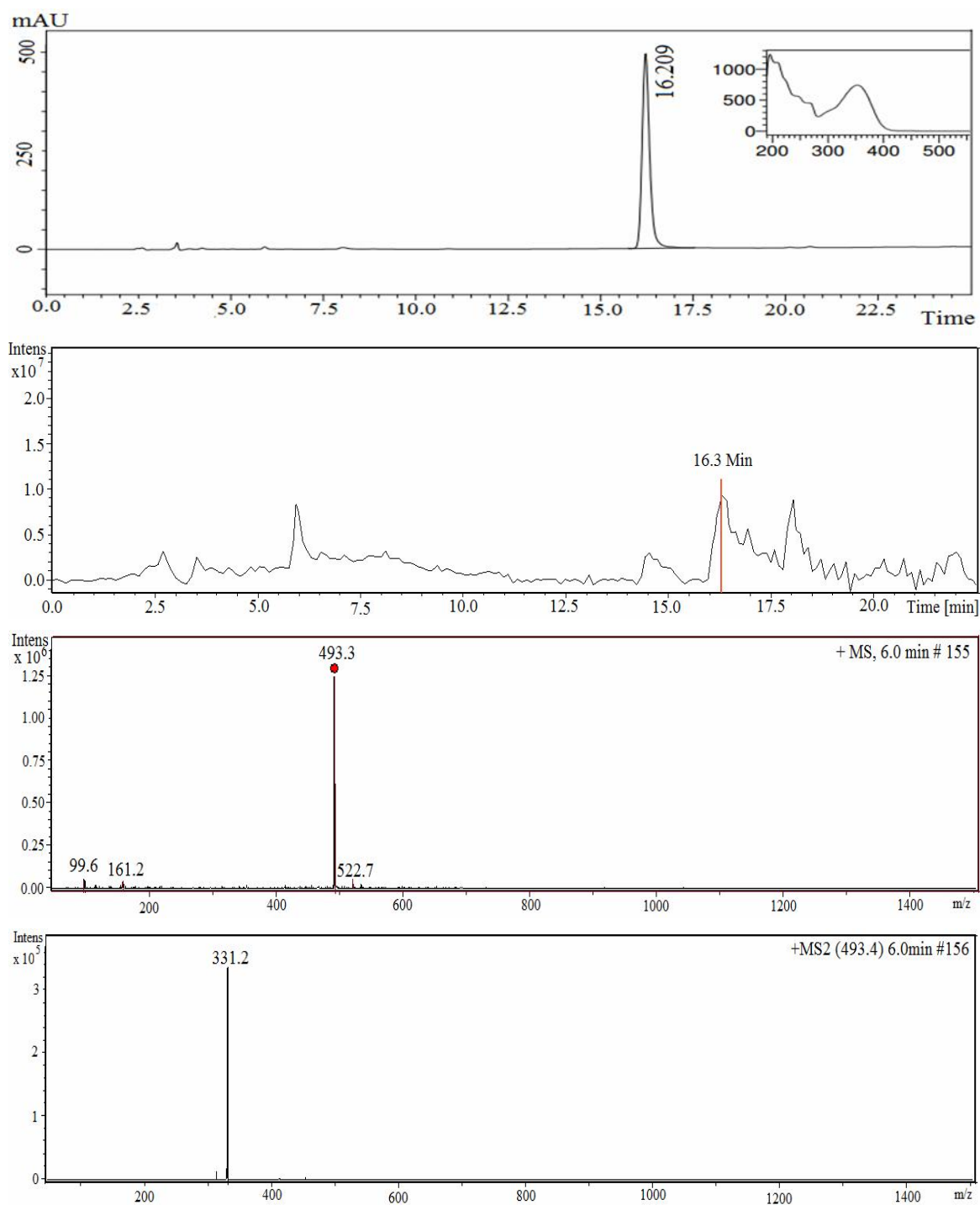
4.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DO COMPOSTO ISOLADO DE *B. blanchetii*

Após análise por CLAE-DAD verificou-se que o extrato metanólico é rico em flavonoides, os quais apresentam caráter mais polar em relação aos componentes dos demais extratos. Aliado a isto, o extrato em questão apresentou significativo efeito máximo na inibição da atividade da butirilcolinesterase (ver item 4.3) e por isso o mesmo foi escolhido para fracionamento em coluna aberta.

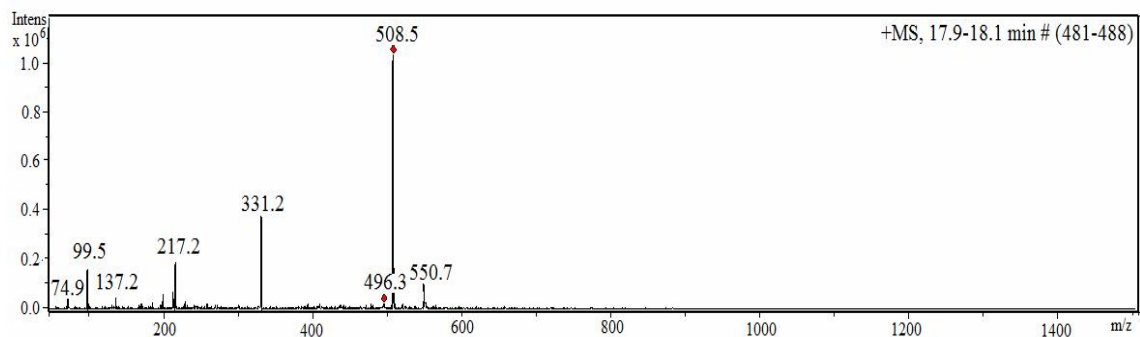
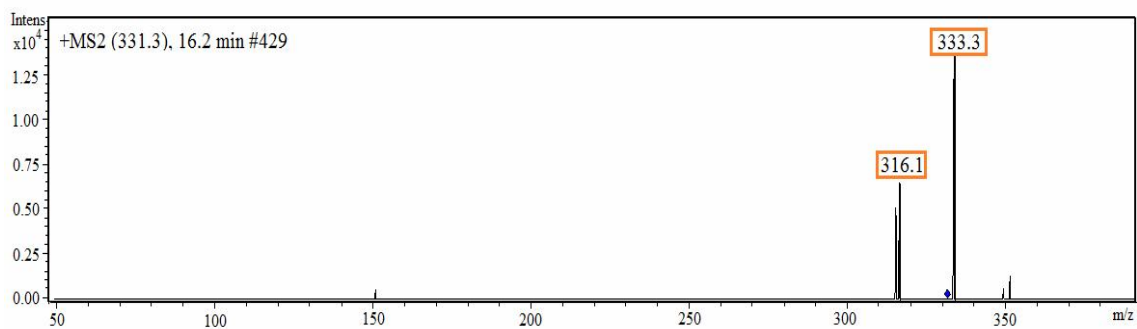
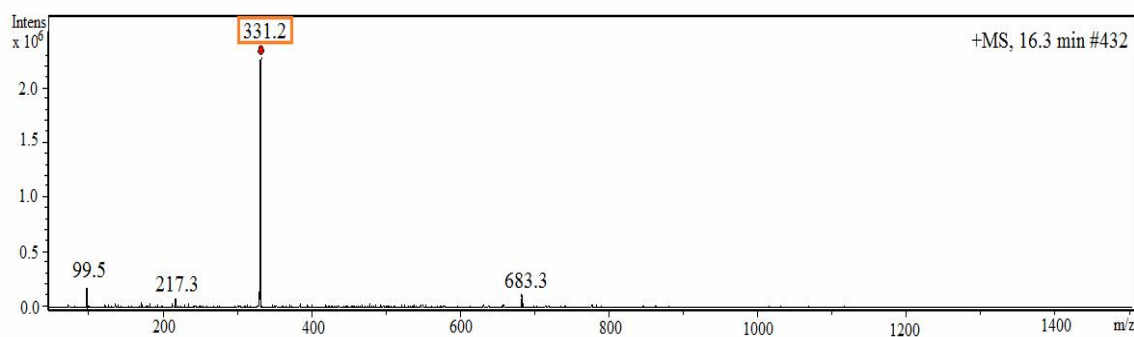
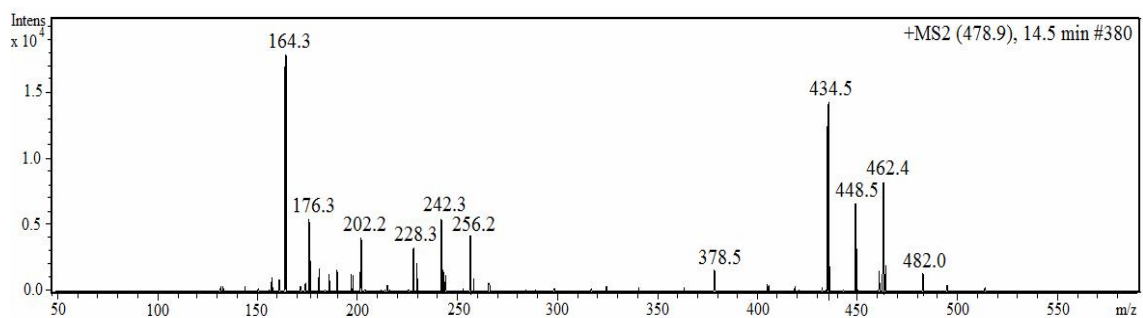
Este processo resultou em 10 frações eluídas em solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol). As frações inicialmente foram analisadas por CCD e por CLAE-DAD e as que apresentaram o mesmo perfil químico foram unidas. A fração 10 apresentou a formação de um precipitado de cor amarela com ponto de fusão (PF) equivalente a 288 °C.

A análise por CLAE-DAD/EM/EM, modo positivo, está representada na Figura 13. Em destaque, encontra-se o tempo de retenção em coluna e a fragmentação do flavonoide de interesse. Esta análise mostrou pico majoritário em torno de 16 minutos, cujo íon molecular $[M + H]^+$ equivale a $m/z = 331,2$ Daltons, o que sugere fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_7$. Notou-se a presença do fragmento em $m/z = 316,1$ Daltons, que foi atribuído a perda de radical metila ($\bullet CH_3$). Este fragmento é muito comum em flavonoides contendo metoxilas (LIU *et al*, 2009).

Figura 13 - CLAE-DAD/ EM/EM do flavonoide isolado com tempo de retenção e fragmentações do flavonoide de interesse, em destaque



Continuação **Figura 13** - CLAE-DAD/ EM/EM do flavonoide isolado com tempo de retenção e fragmentações do flavonoide de interesse, em destaque



O espectro de RMN de ^1H (Figura 14) apresentou sinais característicos do núcleo flavonoide, com δ_{H} 12,97 ppm, atribuído ao hidrogênio do grupo hidroxila ligado ao carbono C-5, a qual está envolvida em ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila da posição C-4. Também foram observados um singlete em δ_{H} 7,33 ppm referente aos hidrogênios H-2' e H-6' do anel B e dois dubletos com sinais em δ_{H} 6,56 ppm e δ_{H} 6,21 ppm, referentes aos hidrogênios da posição H-8 e H-6 do anel A, conforme ampliação do espectro (Figura 15). Além destes sinais, foi observado sinal do hidrogênio relacionado ao anel C do núcleo flavona em δ_{H} 6,98 ppm (1H, s, H-3) e sinal em δ_{H} 3,89 ppm referente a duas metoxilas *meta*- substituídas no anel aromático (6H, s, $-\text{OCH}_3 \times 2$).

Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H do flavonoide isolado (300MHz, DMSO-d_6)

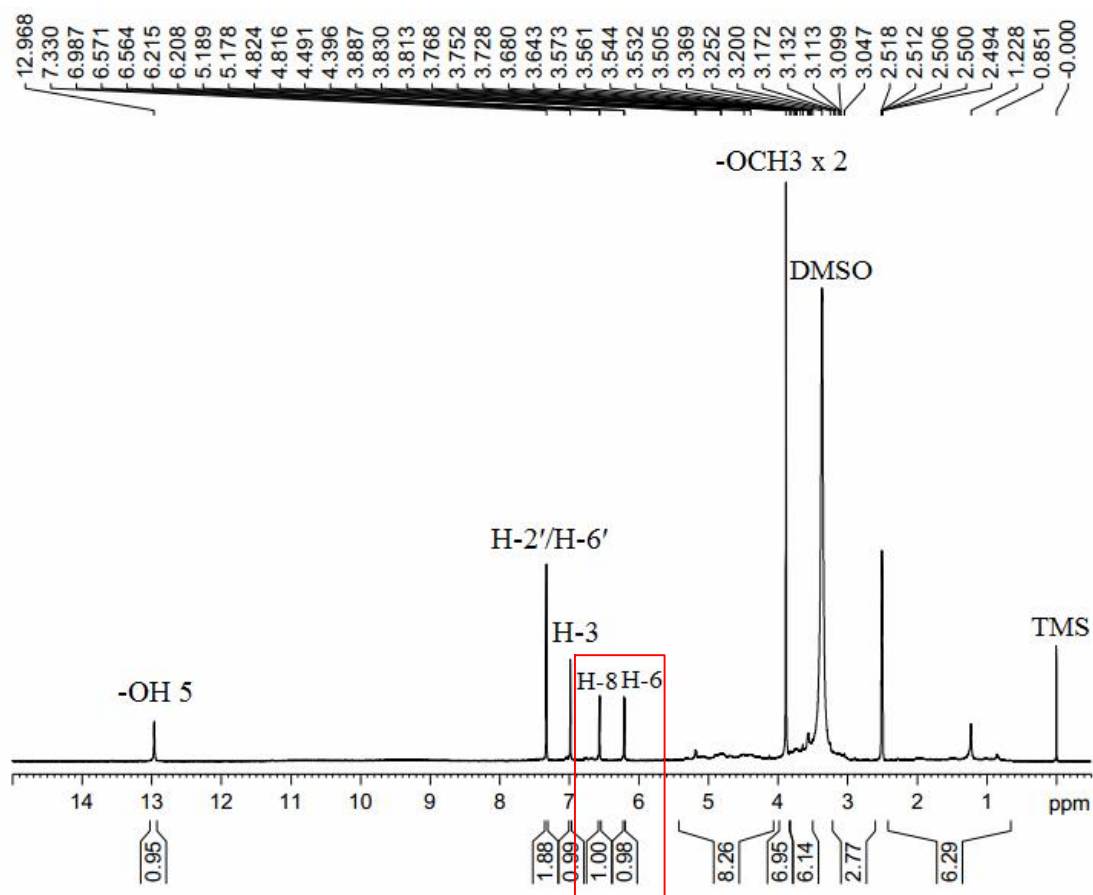
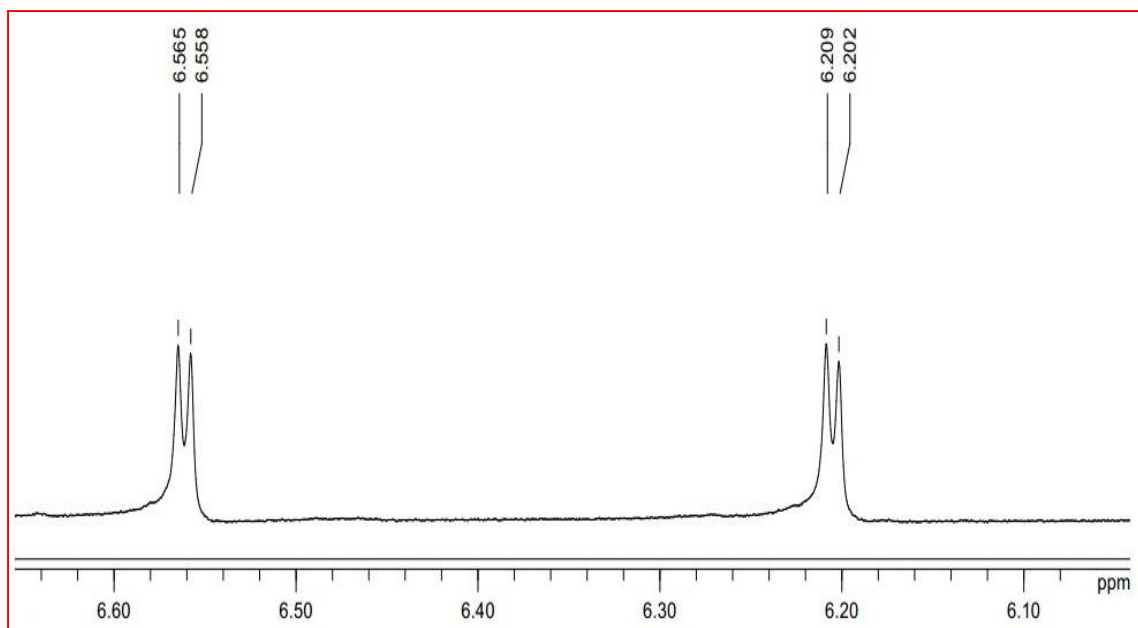
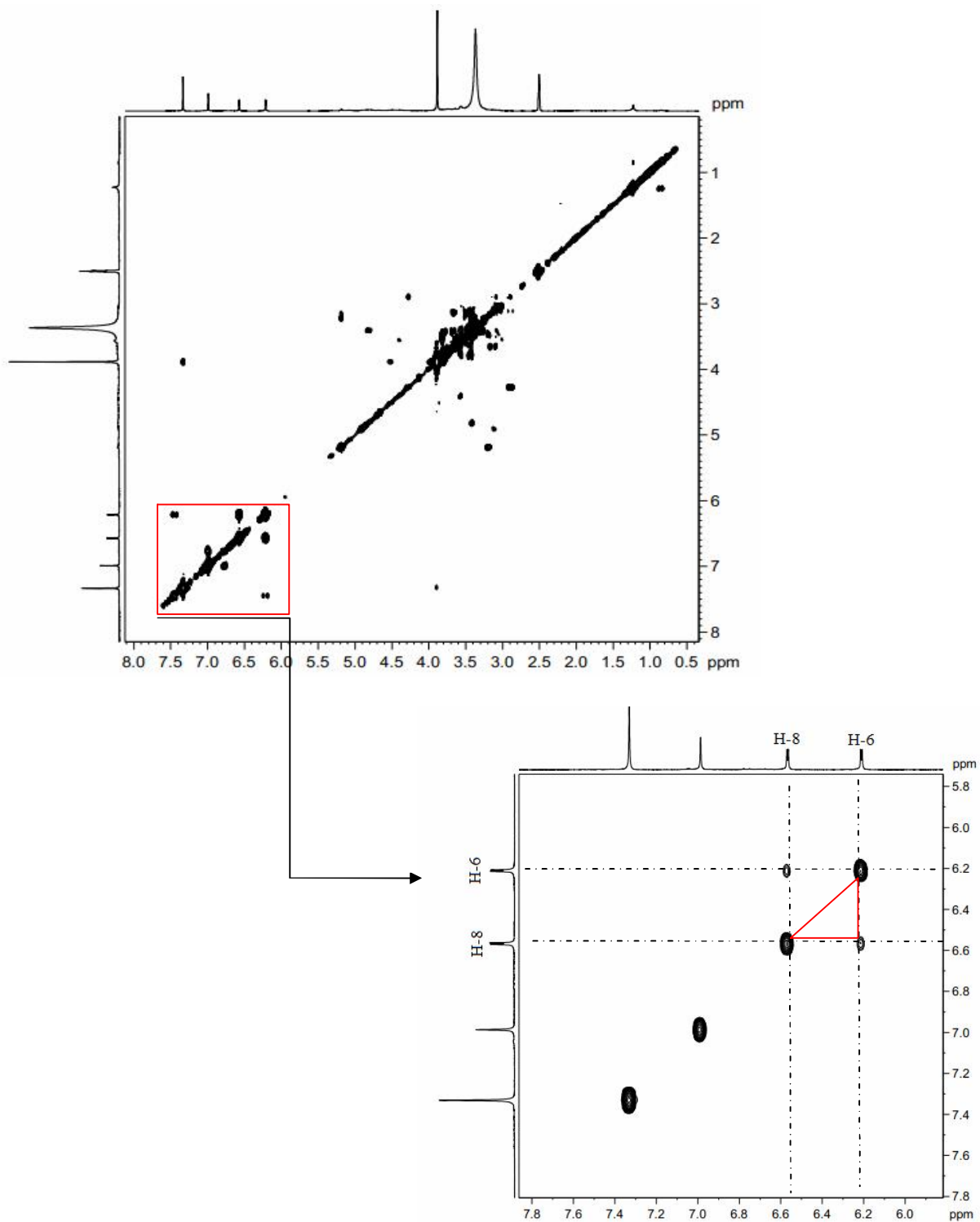


Figura 15 – Ampliação do Espectro de RMN de ^1H (300MHz, DMSO_d_6) entre 6,0 e 6,8 ppm



O espectro homonuclear 2D ^1H - ^1H -COSY é mostrado na Figuras 16. Os sinais correspondente ao espectro de hidrogênio 1D aparecem ao longo da diagonal. Os pontos fora dessa diagonal representam correlações entre hidrogênios não-equivalentes (H-6 e H-8). Esses picos formam um triângulo retângulo com relação aos picos correspondentes na diagonal, o que demonstra que realmente estão acoplando. Estes acoplamentos a longa distância não são mensuráveis no espectro 1D.

Figura 16 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [^1H - ^1H -COSY] do flavonoide isolado (300MHz, DMSO_d_6) e ampliação entre 5,8 e 7,8 ppm.



O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais característicos de estrutura flavonoídica conforme Figura 17. No espectro ampliado de RMN de ^{13}C (Figura 18) são atribuídos sinais a cada carbono da molécula do flavonoide.

Figura 17 - Espectro de RMN de ^{13}C do flavonoide isolado (300 MHz, DMSO_d_6).

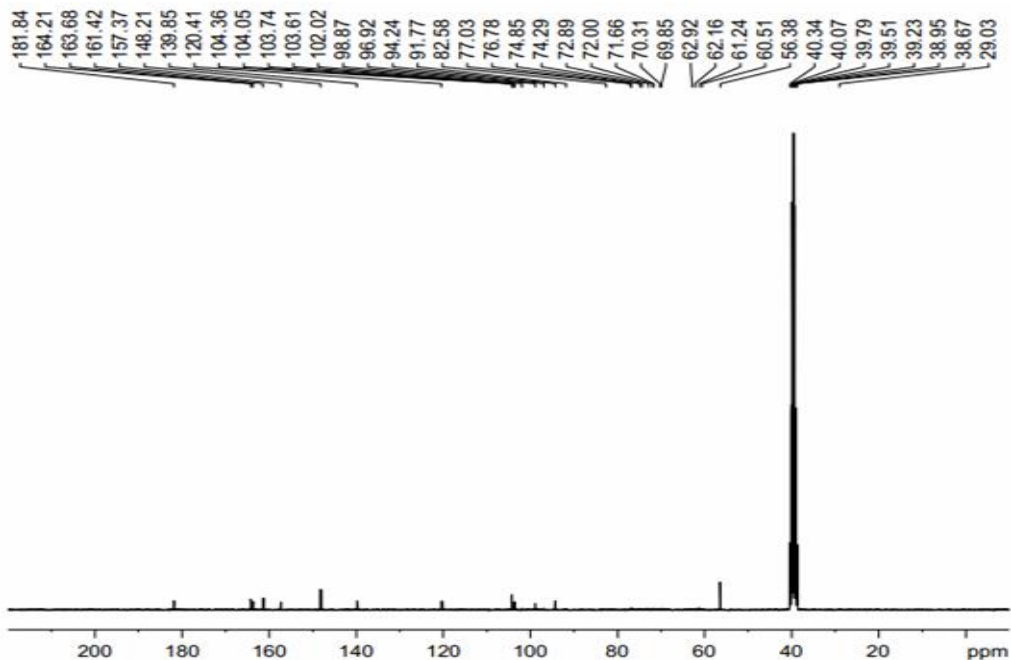
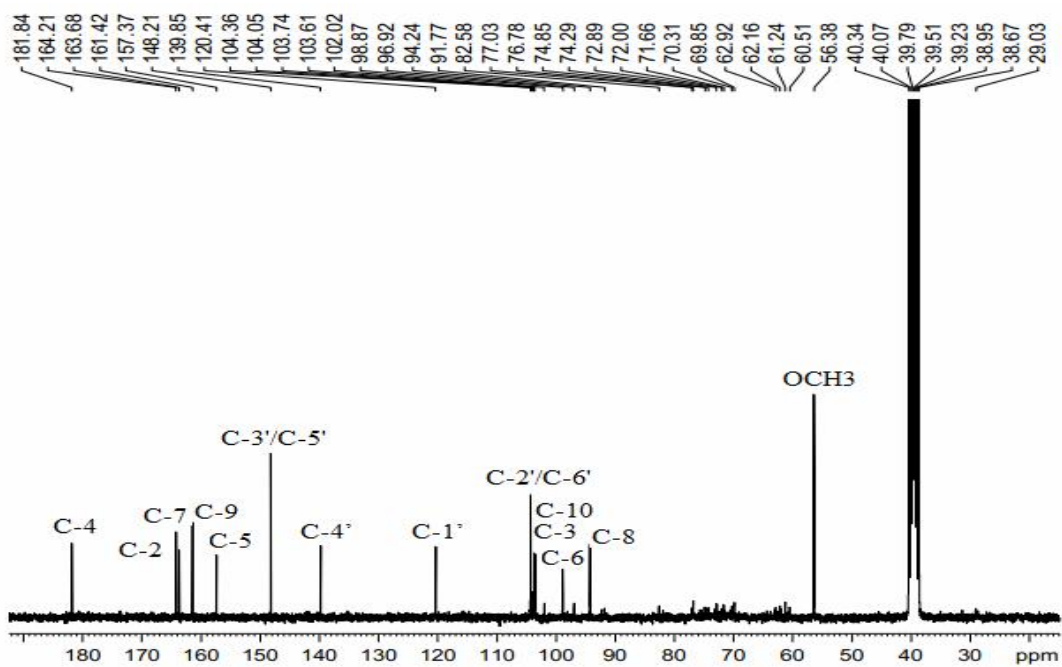


Figura 18 - Ampliação do Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, DMSO_d_6) entre 20 e 190 ppm



O sinal em δ_C 181,84 ppm (C-4) refere-se ao carbono do grupo carbonila. Os demais sinais, entre δ_C 164 ppm e δ_C 94 ppm equivalem aos carbonos da estrutura básica do flavonoide, enquanto que o sinal em δ_C 56,8 ppm equivale a presença de duas metoxilas. Os sinais de RMN de ^{13}C do flavonoide isolado de *B. blanchetii* foram reunidos e comparados com dados da literatura conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Dados de RMN de ^{13}C do flavonoide isolado de *B. blanchetii* e dados da literatura

RMN ^{13}C	Flavonoide isolado de <i>B. blanchetii</i>	Jiao <i>et al</i> , 2007
C		
2	164,21	164,6
4	181,84	182,3
5	157,37	157,8
7	163,68	164,2
9	161,42	161,9
10	104,05	104,2
1'	120,41	120,9
3' e 5'	148,21	148,7
4'	139,85	140,3
CH		
3	103,74	104,1
6	98,87	99,3
8	94,24	94,7
2' e 6'	104,36	104,8
-OCH₃		
3' e 5'	56,38	56,8

A análise de RMN de ^{13}C DEPT 135 também foi realizada. Esta técnica é utilizada na determinação do número de átomos de hidrogênio ligados a ^{13}C . Átomos de carbono com um, dois ou três hidrogênios ligados exibem fases diferentes quando são registrados. No espectro de DEPT 135 foi possível identificar os grupos metínicos (CH) e os grupos metílicos (CH₃) presentes na estrutura do flavonoide (Figura 19 e 20).

Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 do flavonoide isolado (300 MHz, DMSO-d_6)

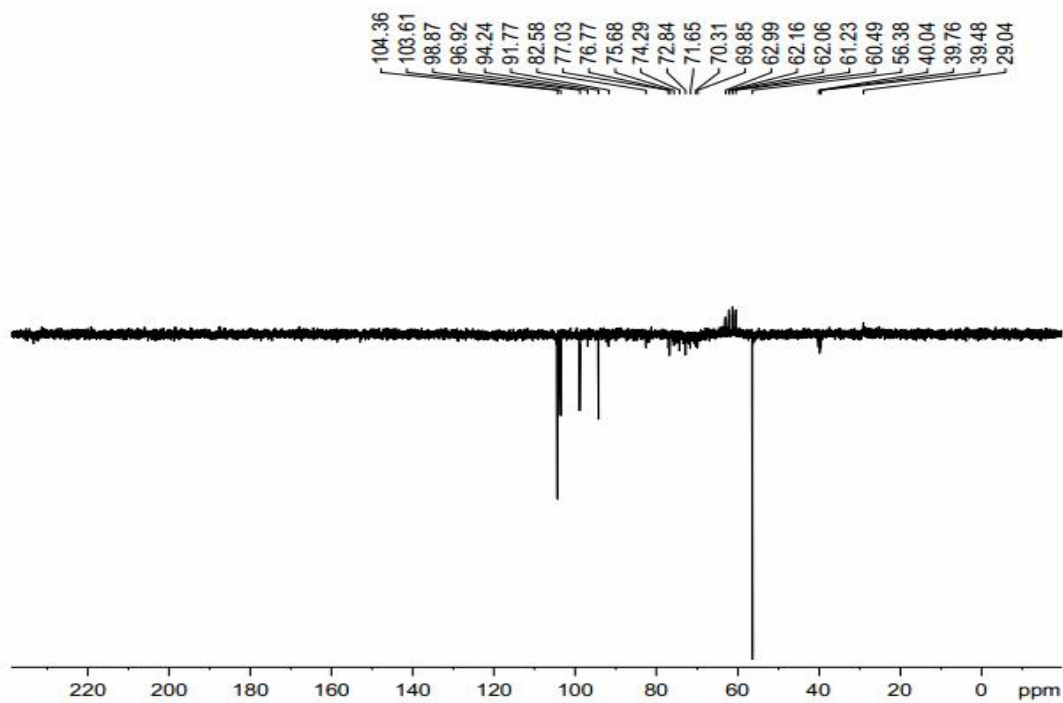
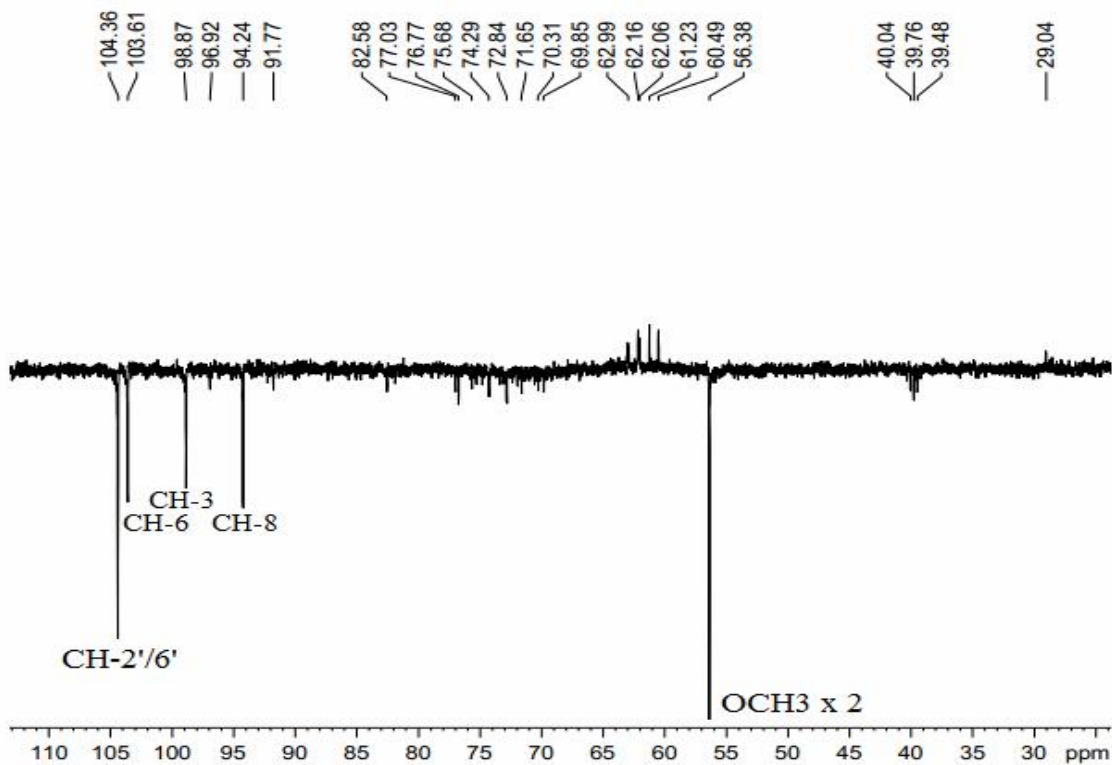
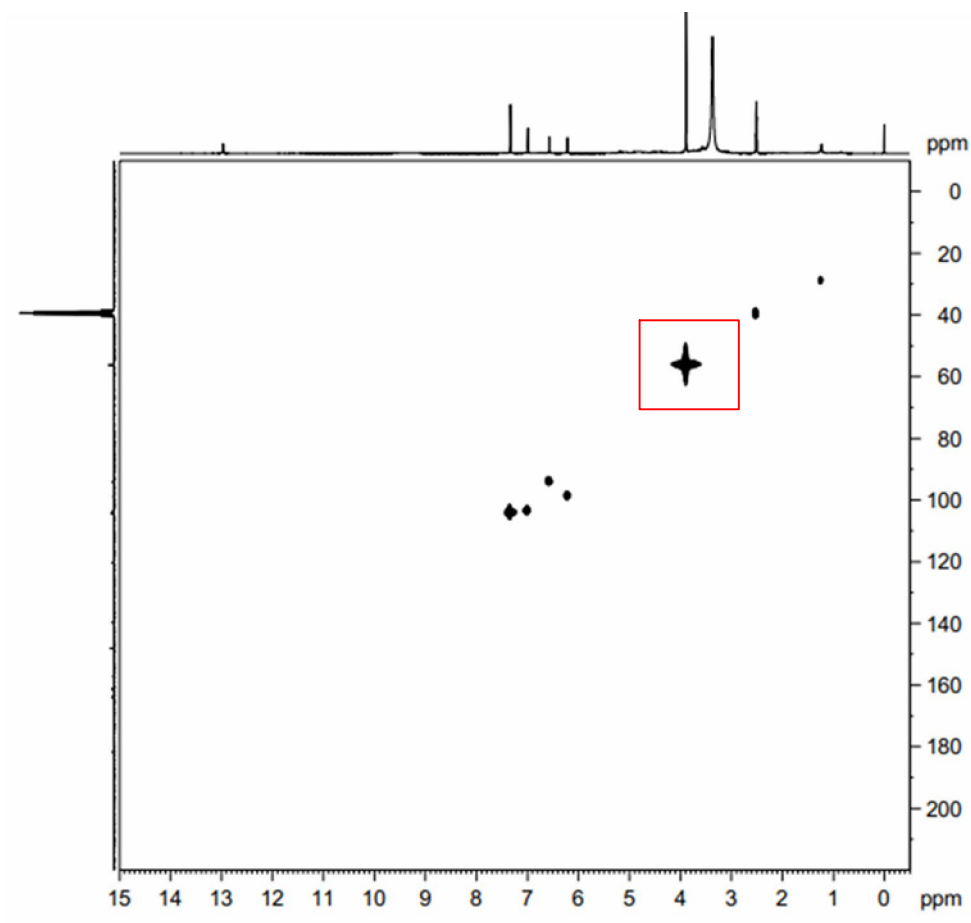


Figura 20 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (300 MHz, DMSO-d_6) entre 20 e 110 ppm



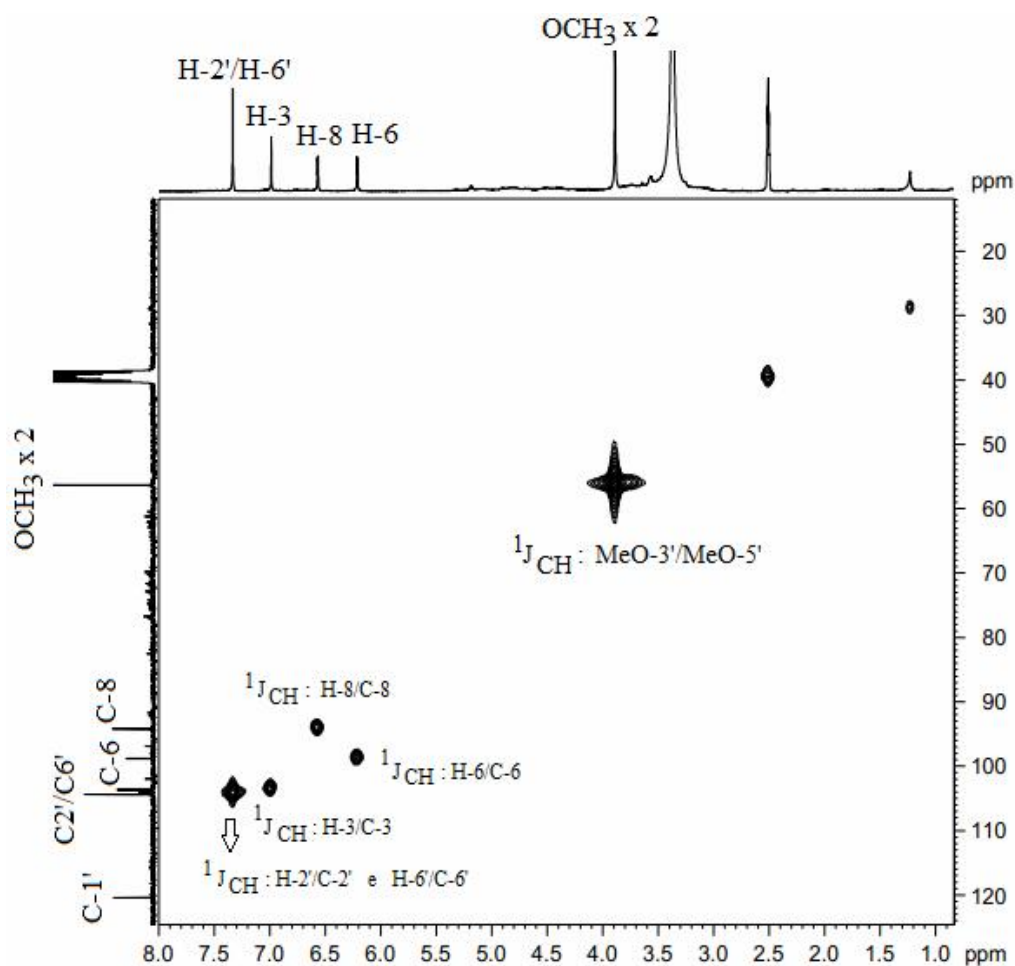
As técnicas bidimensionais, como HMQC (Correlação Heteronuclear Múltiplo-Quântica espaçado por uma ligação, $^1J_{CH}$) e HMBC (Correlação de Acoplamento Heteronuclear espaçado por várias ligações, $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$) foram aplicadas e confirmaram a estrutura do flavonoide. O espectro HMQC (Figura 21) revelou acoplamento significativo entre os hidrogênios (3,88 ppm) e o carbono (56,38 ppm) dos grupos metoxilas..

Figura 21 - Espectro de HMQC 1H - ^{13}C do flavonoide isolado (300 MHz, DMSO $_d$)



A Figura 22 traz a ampliação deste espectro. Além deste acoplamento, as seguintes correlações foram observadas: $^1J_{CH}$, H-3 e C-3; $^1J_{CH}$, H-6 e C-6 e $^1J_{CH}$, H-2 e C-2' e H-6' e C-6'.

Figura 22 - Ampliação do espectro de HMQC ^1H - ^{13}C (300MHz, DMSO-d_6) entre 1,0 ppm e 8,0 ppm e entre 10 e 120 ppm



Já o espectro HMQC (Figura 23) revelou acoplamentos à longa distância entre hidrogênios e carbonos. A ampliação deste espectro representada pela Figura 24 revela principalmente acoplamentos do tipo $^3J_{\text{CH}}$, enquanto que a Figura 25 traz a ampliação de região rica em acoplamentos $^2J_{\text{CH}}$. O efeito do grupo hidroxila na posição 5 em relação aos carbonos vizinhos é destacado na Figura 26.

Figura 23- Espectro de HMBC ^1H - ^{13}C do flavonoide isolado (300MHz, DMSO-d_6)

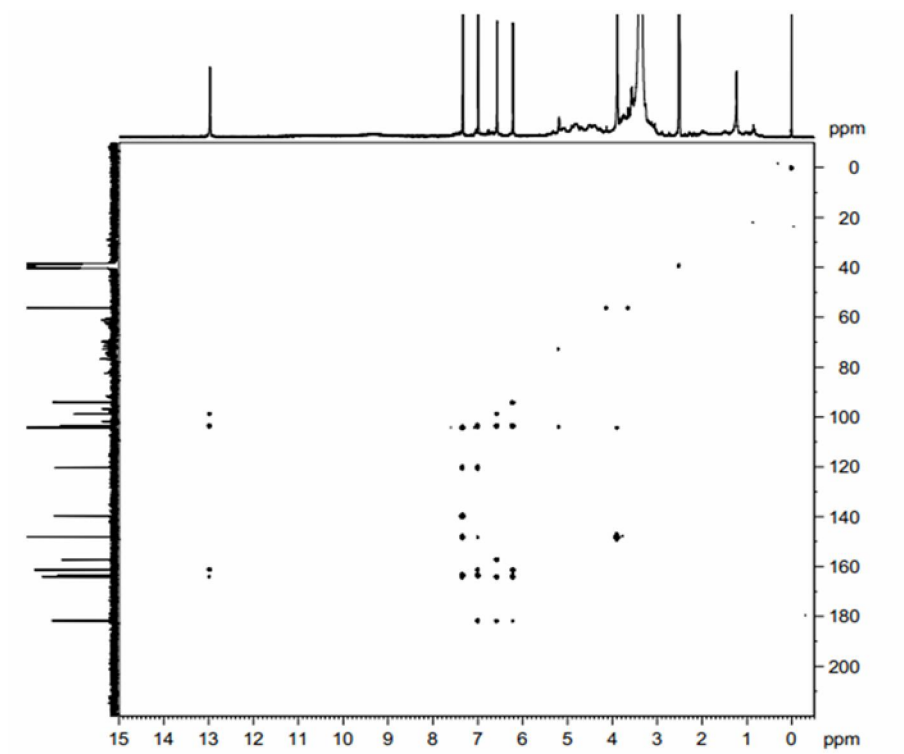


Figura 24 - Ampliação do espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (300 MHz, DMSO-d_6) entre 3,5 ppm e 8,0 ppm e entre 90 e 125 ppm

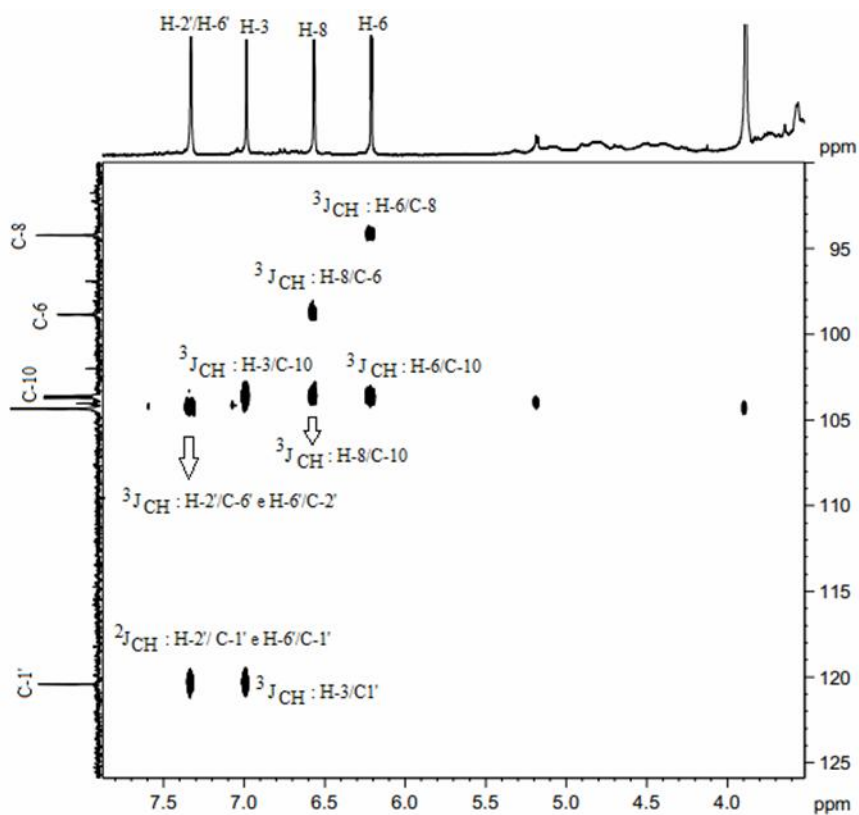


Figura 25 - Ampliação do espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (300 MHz, DMSO-d_6) entre 3,5 ppm e 8,0 ppm e entre 130 e 190 ppm

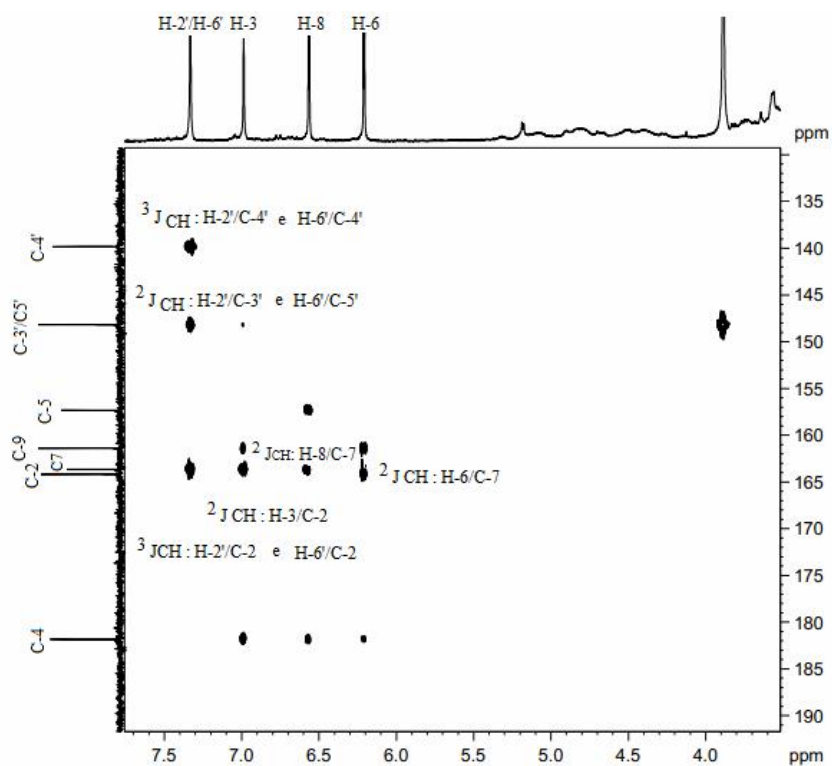
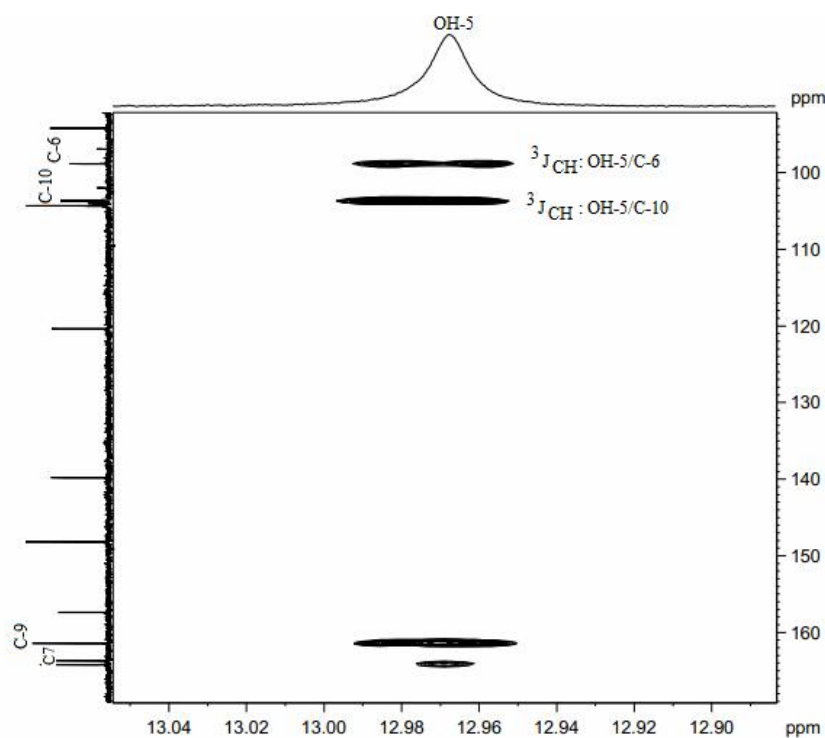
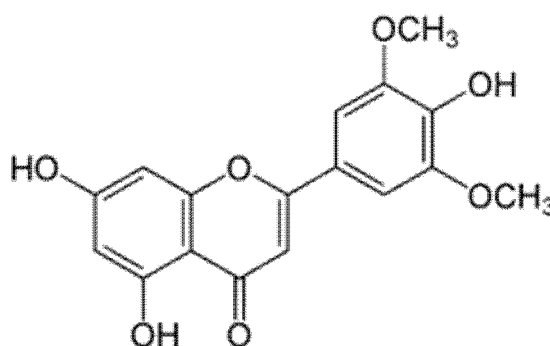


Figura 26 - Ampliação do espectro de HMBC ^1H - ^{13}C do (300 MHz, DMSO-d_6) entre 12,90 ppm e 13,06 ppm e entre 90 e 170 ppm



A estrutura química do flavonoide isolado de *B. blanchetii* foi identificada como 5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona, também conhecida como tricina (Figura 27). A tricina é um composto de origem natural pertencente à classe das flavonas, com predominância em monocotiledôneas. Este composto tem sido detectado principalmente nas folhas e caules e raramente nas raízes (ZHOU; IBRAHIM, 2010).

Figura 27 - Estrutura do flavonoide isolado de *B. blanchetii*, o 5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (tricina)



A tricina ocorre geralmente na forma livre como aglicona ou conjugado a açúcares. Como aglicona, a tricina é conhecida por se acumular nas superfícies lipofílicas das folhas e flores. A lipofilicidade deste composto facilita sua passagem através das membranas celulares e dessa forma, atua de forma eficaz contra herbívoros e patógenos (ZHOU; IBRAHIM, 2010).

O isolamento da tricina a partir de plantas nativas é muitas vezes limitado por sua baixa abundância. De modo que, uma das alternativas para tornar a tricina disponível em quantidades adequadas para testes farmacológicos é através de métodos de síntese química. Contudo estes métodos são dispendiosos, além de apresentar como limitações dificuldade de purificação e baixo rendimento do produto (JIAO *et al*, 2007). Neste sentido, *B. blanchetii* se destaca por apresentar tricina de forma abundante, sendo uma fonte natural rica neste composto.

A tricina foi isolada pela primeira vez a partir de folhas de trigo (*Triticum dicoccum* L.) infectadas por ferrugem e existe a suspeita que sua acumulação nesta planta foi devido ao *stress* causado pela ferrugem (ANDERSON; PERKIN, 1931). Mais tarde, a tricina mostrou

ser um agente ativo em reações defensivas contra ervas daninhas, bactérias e fungos (BYLKA *et al*, 2004; KONG *et al*, 2004).

Estudos anteriores relatam a tricina como agente farmacologicamente ativo na prevenção do câncer. Hudson e colaboradores (2000) demonstraram que o flavonoide tricina interferiu de forma potente no crescimento *in vitro* de células humanas malignas MDA-MB-468 do câncer de mama. Outro estudo relata que níveis elevados de tricina encontrado no trato gastrointestinal, após a ingestão dietética, previne a carcinogênese coloretal. (CAI *et al*, 2005; AL-FAYEZ *et al*, 2006). Além disso, a literatura descreve entre outras atividades atribuídas a tricina ação antiviral (YAZAWA *et al*, 2010), antihistaminica (KUWABARA *et al*, 2003), e antioxidante (DUARTE-ALMEIDA *et al*, 2007).

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO SOBRE A BuChE

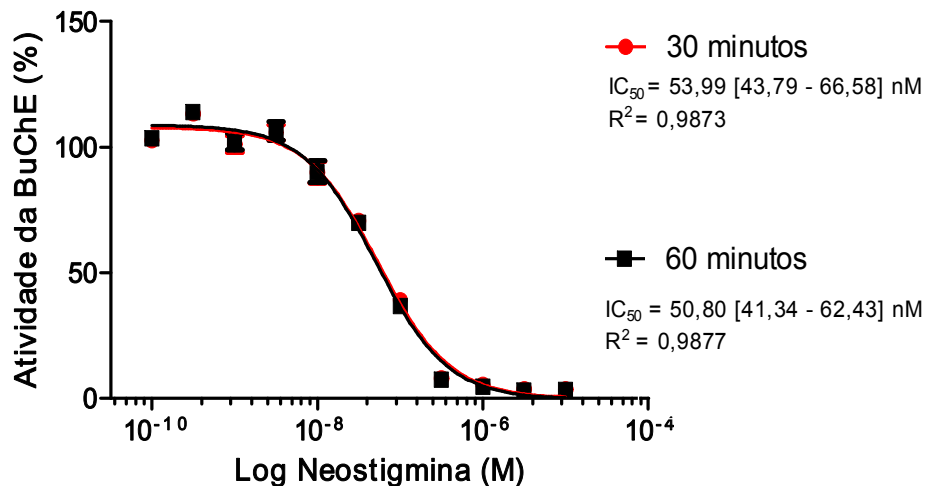
Estudos têm demonstrado que a enzima butirilcolinesterase desempenha papel importante na degradação da acetilcolina em cérebros normais e especialmente nos acometidos pela doença de Alzheimer (LANE *et al*, 2006). Neste sentido, a busca por inibidores da butirilcolinesterase tem sido uma das estratégias consideradas para elevar os níveis de acetilcolina em indivíduos portadores da doença. Principalmente, nos estágios mais avançado da doença, quando ocorre diminuição da expressão da acetilcolinesterase e aumento considerável (de até 2 vezes) da butirilcolinesterase (FURUKAWA-HIBIA *et al*, 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho avaliou a atividade anticolinesterásica *in vitro* dos extratos em hexano, em acetato de etila e em metanol de *Barbacenia blanchetii* sobre a enzima BuChE, sendo determinada a potência e a inibição máxima para cada um dos extratos. As frações flavonoídicas provenientes do extrato metanólico também foram avaliadas, bem como o flavonoide 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (tricina), isolado deste extrato.

A neostigmina foi utilizada como controle positivo (Figura 28) e inibiu a BuChE de forma concentração-dependente, com efeito máximo de 98,4%. A atividade enzimática foi avaliada, após a adição do substrato, nos tempos 30 e 60 minutos e foi verificado que o

sistema entra em equilíbrio dinâmico neste período, ou seja, os valores de inibição permanecem estáveis ao longo do tempo.

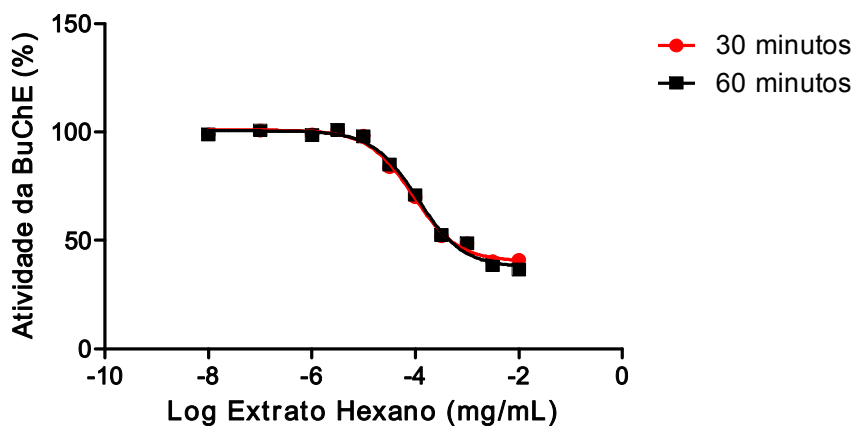
Figura 28: Inibição da atividade das BuChE pela neostigmina



Neste estudo, foi utilizado como substrato o iodeto de acetilcolina (ACTI), por apresentar similiaridade molecular com a acetilcolina. Embora, o iodeto de butirilticolina seja análogo ao substrato butirilcolina, que é específico para BuChE, a butirilcolina não é encontrada no cérebro humano e portanto não está relacionado com a doença de Alzheimer.

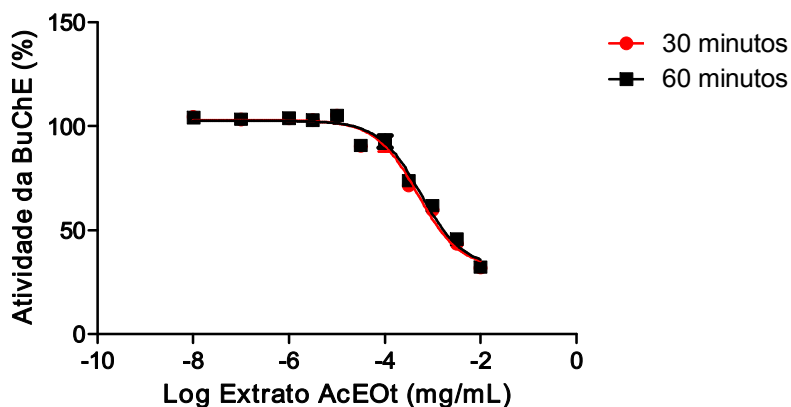
O extrato hexânico de *B. blanchetii* inibiu a butirilcolinesterase de forma concentração-dependente. A potência detectada para BuChE foi de 0,09 mg/mL [0,07 - 0,11 mg/mL] e 0,11mg/mL [0,09 - 0,14 mg/mL] para 30 e 60 minutos respectivamente. A inibição máxima foi de 62,33% e R² equivalente a 0,98 (em ambos os tempos de leitura no espectrofotômetro) (Figura 29).

Figura 29: Inibição da atividade da BuChE pelo extrato hexano



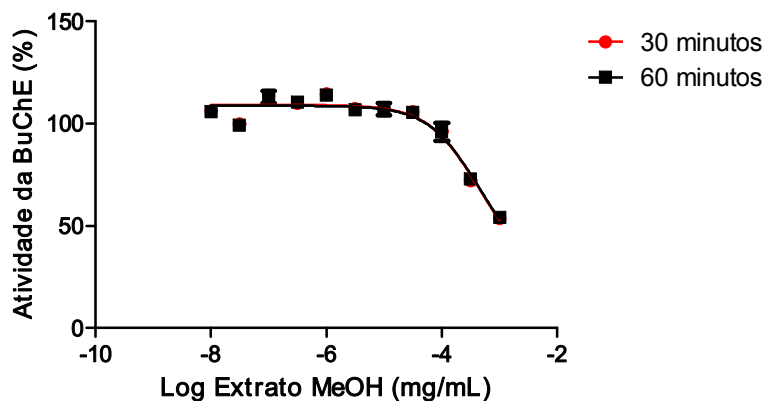
O extrato em acetato de etila também inibiu a enzima butirilcolinesterase de forma concentração-dependente, conforme mostrado na Figura 30. As potências para este extrato foi de 0,49mg/mL [0,36 – 0,66 mg/mL] e 0,57mg/mL [0,42 – 0,77mg/mL] para 30 e 60 minutos e a inibição máxima foi de 67,89%. ($R^2 = 0,97$ em ambos os tempos de leitura).

Figura 30: Inibição da atividade da BuChE pelo extrato AcOEt



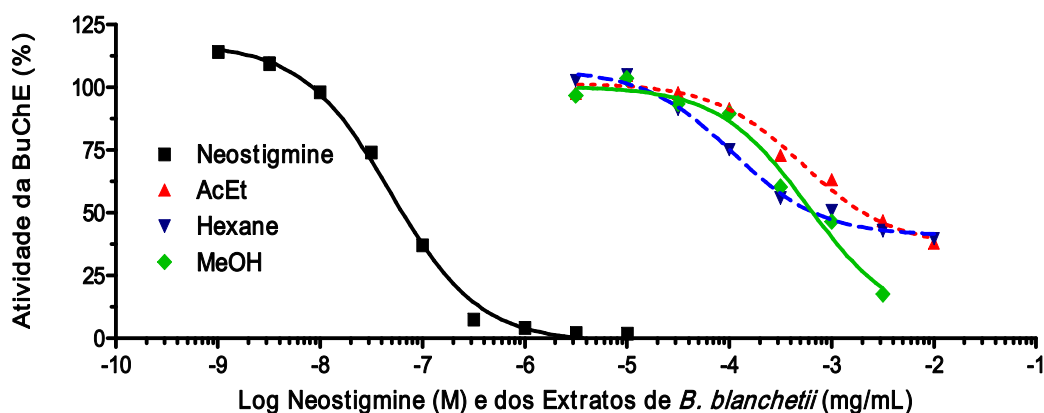
Por sua vez, o extrato metanólico também inibiu a butirilcolinesterase de forma concentração-dependente, com potência de 0,43 mg/mL [0,22 – 0,81mg/mL] e 0,43mg/mL [0,22-0,84mg/mL] para 30 e 60 minutos, respectivamente. A inibição máxima de 70,92% e R^2 em ambos os tempos de leitura equivalente a 0,91 (Figura 31).

Figura 31: Inibição da atividade da BuChE pelo extrato em MeOH



O potencial inibitório dos flavonoides é atribuído às características da sua estrutura química, como o número e a posição dos grupos hidroxilas e a presença do anel fenil, que podem formar múltiplas ligações de hidrogênio no sítio ativo da enzima (KATALINIC *et al*; 2010). Sendo, portanto interessante a investigação de flavonoides polares. Além disso, o extrato metanólico apresentou maior efeito máximo (Figura 32) e dessa forma este estudo priorizou testar as frações do extrato metanólico.

Figura 32: Comparação da atividade da BuChE na presença da neostigmina e dos extratos em hexano, AcOEt e MeOH de *B. blanchetii*.

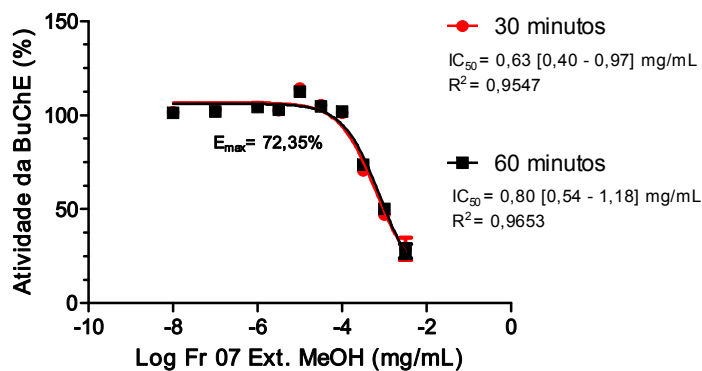


As Frações 07, 08 e 10 inibiram a butirilcolinesterase de forma concentração-dependente, conforme Figura 33. Estes dados indicam que parte da atividade inibitória do

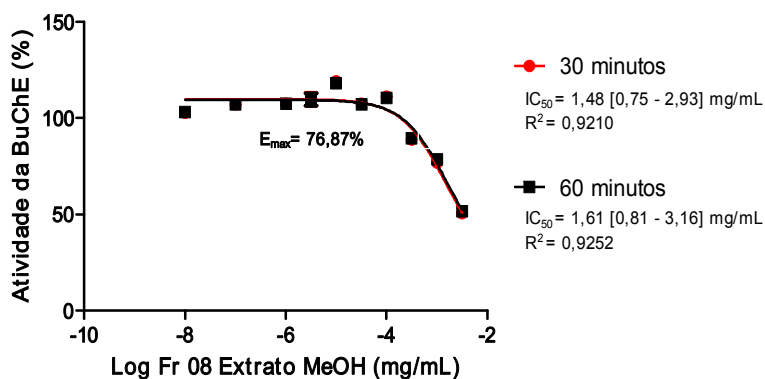
extrato metanólico pode ser atribuída aos flavonoides presentes nestas frações, visto que análises em CLAE-DAD revelam compostos flavonoidicos.

Figura 33: Atividade da BuChE na presença da Fr 07 (A), 08 (B) e 10 (C) do extrato metanólico de *B. blanchetii*.

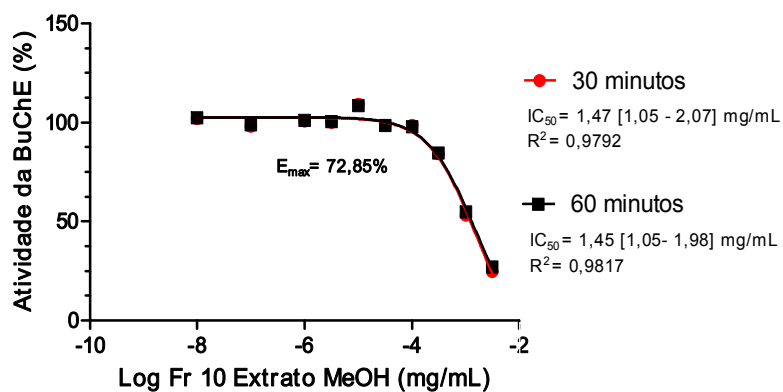
(A)



(B)

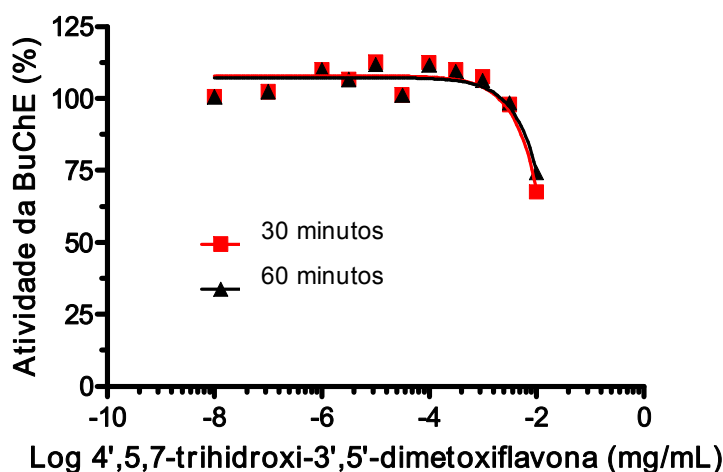


(C)



Contudo, o flavonoide isolado da fração 10, a tricina, testado em mg/mL, praticamente não inibiu a butirilcolinesterase (Figura 34). Isto sugere que embora a flavona tenha sido isolada em quantidade significativa (composto majoritário), o efeito inibitório pode ser atribuído a outro composto presente em quantidade menor. Além disso, a presença e a posição de grupos metoxilas no anel B, ao invés de hidroxilas, podem ser responsáveis pelo baixo potencial inibitório da BuChE deste flavonoide.

Figura 34 - Atividade da BuChE na presença da tricina isolado do extrato metanólico de *B. blanchetii*.



É válido ressaltar que pesquisas têm destacado os flavonoides como possíveis inibidores das colinesterases. Contudo, estudos que correlacionam o efeito inibitório da BuChE com compostos da classe dos flavonoides são mais escassos. Entretanto Katalinic e colaboradores (2010) demonstraram que os flavonoides galangina, canferol, quercetina, miricetina, fisetina; apigenina, luteolina e rutina modulam a atividade da butirilcolinesterase (BuChE)

No presente trabalho, embora o flavonoide isolado de *B. blanchetii*, a tricina (4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona), não tenha apresentado o mais significativo efeito inibitório entre as frações testadas sobre a BuChE, esses resultados qualificam os extratos de *B. blanchetii*, bem como suas frações flavonoídicas como promissores agentes antibutirilcolinesterase.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico das partes aéreas de *B. blanchetii* permite concluir que esta espécie é rica em flavonoides da classe das flavonas. O flavonoide 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona isolado anteriormente apenas em outra espécie de *Barbacenia* (*B. riedeliana*), foi relatado pela primeira vez em *B. blanchetii*. A presença deste composto foi confirmada através do emprego de técnicas cromatográficas e espectrométricas (CLAE-MS/MS e RMN).

Em relação a avaliação da atividade da butirilcolinesterase, os extratos de *B. blanchetii* inibiram a atividade enzimática de forma concentração-dependente. As frações provenientes do extrato em metanol também inibiram a BuChE de forma concentração-dependente, entretanto o flavonoide 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona, não apresentou efeito inibitório significativo.

Diante do exposto, esses resultados qualificam os extratos de *B. blanchetii*, bem como as frações flavonoídicas como promissores agentes anti butirilcolinesterase. E a soma destes resultados abre espaço para a busca de outros compostos flavonoídicos de *B. blanchetii* com atividade inibitória sobre a BuChE, seja proveniente das frações do extrato metanólico ou presentes nos demais extratos (hexano e acetato de etila) obtidos desta espécie.

Por fim, é importante mencionar que este trabalho fornece uma contribuição inédita acerca da composição química de *B. blanchetii*, bem como em relação à atividade biológica de extratos, frações e do composto isolado desta espécie frente à enzima butirilcolinesterase.

REFERÊNCIAS

- AL-FAYEZ, M. *et al.* Differential modulation of cyclooxygenase-mediated prostaglandin production by the putative cancer chemopreventive flavonoids tricetin, apigenin and quercetin. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 58, p. 816–825, 2006.
- ANDERSON, J.A, PERKIN AG. The yellow coloring matter of Khapli wheat, *Triticum dicoccum*. **J. Chem. Soc.**, p. 2624–2625, 1931.
- ARAÚJO, P. W. B *et al.* Flavonoides e Hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, n. 3, p. 188-189, 2005.
- BARBOSA FILHO, J. M. *et al.* Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.2, p. 258-285, 2006.
- BYLKA, W. *et al.* Natural flavonoids as antimicrobial agents. **J. Am. Nutraceut. Assoc.**, v. 7, p.24–31, 2004.
- BRANCO *et al.* Two monoisoprenylated flavonoids from *Vellozia graminifolia*. **Phytochemistry**, v.47, n3, p. 471-474, 1998.
- BRANCO, A. *et al.* Further Lipophilic Flavonols in *Vellozia graminifolia* (Velloziaceae) by High Temperature Gas Chromatography: Quick Detection of New Compounds. **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 266–270, 2001.
- BRANCO, A. *et al.* Two 8 C -methylated Flavonols from the Leaves of *Vellozia candida* Mikán (Velloziaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, n. 3, 2002.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Dispõe sobre parâmetros básicos para identificação e análise da vegetação primária e dos estágios sucessionais da vegetação secundária nos Campos de Altitude associados ou abrangidos pela Mata Atlântica. **Resolução nº 423**, de 12 de abril de 2010.
- BRUNETON, J. **Farmacognosia, fotoquímica, plantas medicinales**. Zaragoza (Espanha): Acribia, 2001.
- CAI, H. *et al.* The rice bran constituent tricetin potently inhibits cyclooxygenase enzymes and interferes with intestinal carcinogenesis in Apc^{Min} mice. **Mol Cancer Ther**, v. 4, p. 1287–1292, 2005.
- CATTAL, Marina Blanco. **Anatomia em Velloziaceae: caracteres, evolução e filogenia**. 2007. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências, na área de Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CONCEIÇÃO, A. A *et al.* Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of “Chapada Diamantina”, Northeast Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, v.30, n.4, p.641-656, 2007.

- CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Diversidade em quatro áreas de campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: espécies distintas, mas riquezas similares. **Rodriguésia**, v. 58, n.1, p. 193-206, 2007.
- CONCEIÇÃO; A. A.; GIULIETTI, A. M. Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre de dois platôs do Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 29, n.1 2002.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2.ed. Baffins Lane; Chichester; West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.
- DORNAS, W. C. *et al.* Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.3, p. 241-249, 2007.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. *et al.* Anti-proferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1165–1171, 2007.
- ELLMAN, G.L *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da Doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, abr. 2005.
- FREITAS, H. F. *et al.* Estudos de QSAR 3D para um conjunto de inibidores de butirilcolinesterase humana. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2114-2121, 2009.
- FURUKAWA-HIBI, Y. *et al.* Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid-peptide in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 225, p. 222– 229 , 2011.
- GREENHAM *et al.* Identification of lipophilic flavonols by combination of chromatographic and spectral techniques. **Phytochemical Analysis**, v. 6, p. 211–217, 1995.
- GREENHAM *et al.* Identification of lipophilic flavones and flavonols by comparative HPLC, TLC and UV spectral analysis **Phytochemical Analysis**, v. 14, p. 100–118, 2003.
- GUO, A.J.Y. *et al.* Galangin, a flavonol derived from *Rhizoma Alpiniae* Officinarum, inhibits acetylcholinesterase activity *in vitro*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, p.246–248, 2010.
- HILHOUSE, B.J *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors in *Rhodiola rosea*. **Pharmaceutical Biology**. v. 42, p.68-72, 2004.
- HUDSON, E. A. *et al.* Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 9, p. 1163–1170 2000.

- INOUYE, K.; OLIVEIRA, G.H. Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para Doença de Alzheimer. **Infarma**, v.15, n. 11-12, 2004.
- JIAO, J. *et al.* Separation and Purification of Tricin from and Antioxidant Product Derived from Bamboo Leaves. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 10086–10092, 2007.
- KALMAN, J. *et al.* Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sciences**, v.75, p.1195-1204. 2004.
- KATALINIC, M. *et al.* Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 186–192, 2010.
- KATZUNG, B. G. Introdução à farmacologia autônoma. In: _____. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- KONG, C. *et al.* Two compounds from allelopathic rice accession and their inhibitory activity on weeds and fungal pathogens. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1123–1128, 2004.
- KUWABARA, H. *et al.* Tricin from a Malagasy connoceous plant with potential antihistaminic activity. **J Nat Prod**, v. 66, p.1273–1275, 2003.
- LANE R. M *et al.* Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. n. 9, p. 101-124, 2006.
- LIU, G *et al.* Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria bacalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4809–4814, 2009.
- LUTTGE *et al.* Physiological ecology of photosynthesis of five sympatric species of Velloziaceae in the rupestrian fields of Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil. **Flora**, n. 202, p. 637 – 646, 2007.
- MACHADO, C. G. *et al.* Beija-flores e seus recursos florais em uma área de campo rupestre da Chapada Diamantina, Bahia. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 15, nº 2, p. 267-279, 2007.
- MACHADO, J. C. B. Doença de Alzheimer. In: FREITAS, E.V. *et al.* **Tratado de geriatria e gerontologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation and Quantification of Flavonoids. In: ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. (Org.). **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.
- MELENDEZ, P.A., CAPRILES, V.A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**. v.13 p. 272-276, 2006.
- MELLO-SILVA, R Morphological analysis, phylogenies and classification in Velloziaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 148, p. 157–173, 2005.

MELO-SILVA, R. Three new combinations in *Barbacenia* (Velloziaceae). **Neodiversity** v. 3, p. 1 e 2, 2008.

MENEZES, N.L. Nova espécie e novas combinações no gênero *Pleurostima* raf. (Velloziaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, n. 8, p. 65-69, 1980.

MENEZES, N. L. *et al.* The utility of leaf flavonoids as Taxonomic Markers in the subfamily and generic classification of the velloziaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, p. 483-495, 1991.

MUKHERJE, P. K. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors from plants **Phytomedicine**, v. 14, p. 289 –300, 2007.

NASCIMETO, E. C. M. **Determinação teórica de propriedades relevantes para a atividade de inibidor da acetilcolinesterase**. 2009. Universidade de Brasília. Instituto de Química. Programa de Pós-graduação em Química.

NEVES, S. P. S.; CONCEIÇÃO, A. A. Campo rupestre recém-queimado na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: plantas de rebrota e sementes, com espécies endêmicas na rocha, **Acta bot. bras.**, v. 24, n. 3, p. 697-707, 2010.

PEREIRA, A. S.; SILVA, E.F.; AQUINO NETO, F. R. Cromatografia gasosa de alta temperatura: a nova fronteira e sua aplicação na análise de compostos de alta massa molecular. **Química nova**, v.19, n.6, 1996.

QUEIROZ, L.P *et al.* Rumo ao amplo conhecimento da biodiversidade do semiárido. **Ministério da Ciência e Tecnologia**, Brasília, 2006.

RAFFA, R. B *et al.* Fármacos que atuma sobre os distúrbios degenerativos dos movimentos. In: _____. **Atlas de farmacologia de Netter**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2006.

RANG, H. P. *et al.* Aminoácidos transmissores. In: _____. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

SALATINO, M. L. F. *et al.* Alkanes of foliar epicuticular waxes of Velloziaceae. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1105-1114, 1989.

SARTI, S. J.; CARVALHO, J. C. T. Fitoterapia e Fitoterápicos. In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos , farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

SHARMA, B. *et al.* Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 697-705, 2008.

SMALL, S. A.; MAYEUX, R. Doença de Alzheimer e demências relacionadas. In: ROWLAND, L. P. **Merritt tratado de neurologia**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SMITH; AYENSU, A Revision of American Velloziaceae. **Smithsonian contributions to botany**, n. 30 1976.

THADDEU, R. C. In: FUCHS, F. D; WANNMACHER, L; FERREIRA, M.B.C. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

TREVISAN M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

VIEGAS JUNIOR, C. *et al.* Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, 2004.

YAZAWA, K. *et al.*, 2010 Anti-influenza Virus Activity by Tricin, Isolated from *Sasa Albomarginata* in Japan. **Antiviral Research**, v. 86, p. A49, 2010.

WILLIAMS, C. A. *et al.* The Utility of Leaf Flavonoids as Taxonomic Markers in the Subfamily and Generic Classification of the Velloziaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, n. 6, p. 483-495, 1991.

WILLIAMS, C. A. *et al.* Differences in flavonoid patterns between genera within the Velloziaceae. **Phytochemistry**, v. 36, p. 931-940, 1994.

ZHOU, J.M.; IBRAHIM, R.K. Tricin—a potential multifunctional nutraceutical. **Phytochem Rev.**, v. 9, p. 413–424, 2010.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Editora da UFSC: Florianópolis. 2007.