



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Instituto de Química - INQUI**  
**Programa de Pós-Graduação em Química - Mestrado**



## **SÍNTESE DA L-HIPAFORINA E D-HIPAFORINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE ACETILCOLINESTERASE**

**Murilo Kioshi Aquino Yonekawa**

Orientador: Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

**Campo Grande - 2018**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Instituto de Química - INQUI**  
**Programa de Pós-Graduação em Química - Mestrado**



## **SÍNTESE DA L-HIPAFORINA E D-HIPAFORINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE ACETILCOLINESTERASE**

**Murilo Kioshi Aquino Yonekawa**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos  
Co-orientador: Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

**Campo Grande - 2018**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO E DOUTORADO**

**TERMO DE DEFESA**

( x ) – Dissertação ( ) – Tese ( ) – Qualificação

<b>ALUNO</b>
<b>Murilo Kioshi Aquino Yonekawa</b>

<b>TÍTULO DO TRABALHO</b>
<b>Síntese da L-Hipaforina e D-Hipaforina e Avaliação da Atividade Inibitória sobre Acetilcolinesterase.</b>

Defesa de Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado e Doutorado (Resolução nº 195/2017) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para titulação no curso.

<b>COMISSÃO EXAMINADORA</b>		
<b>NOME</b>	<b>INSTITUIÇÃO DE ENSINO</b>	<b>ASSINATURA</b>
Edson dos Anjos dos Santos	UFMS	<i>Edson dos Anjos dos Santos</i>
Dênis Pires de Lima	UFMS	<i>Dênis Pires de Lima</i>
Douglas Chodi Masui	UFMS	<i>Douglas Chodi Masui</i>

Campo Grande, 09 de fevereiro de 2018.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades.

Ao meu pai (Marcos Alves de Figueiredo), minha mãe (Maria Aparecida Aquino Yonekawa) e meus irmãos (Marcos Junior, Maria Eduarda e Jessica), que sempre estiveram me apoiando e me dando forças para que eu continuasse na luta durante essa etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos, pela orientação, oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, ensinamentos e confiança no qual me fez crescer profissionalmente e pessoalmente. O meu mais sincero obrigado.

Ao Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques, pela co-orientação, dedicação e pelos ensinamentos que possibilitaram novas aprendizagens em bioquímica.

Aos Professores Dr. Dênis Pires de Lima (INQUI-UFMS), e Dr. Douglas Chodi Masui (INBIO-UFMS)) por aceitarem o convite de participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa (UFRN) pela realização dos ensaios de *docking molecular*.

Aos colegas de laboratório da bioquímica e LP4, John Deivid, Amanda Colman, Luciana, Larrisa, Aline, Izabela, Camila, Rejane Gongalves, Ytallo, Neimar, Felipe, Vinícius, Tairine, Paola e Daiane

Aos meus amigos de grupo de pesquisa, Bruna de Barros, Arthur Montanholi, Amanda Dal Ongaro, Dhébora Albuquerque, Angela Akimi, Ingrid Duarte, Diesey, Giovana, Bruno, pelos valiosa ajuda, por compartilharam experiências, pelos passeios, encontros e happy hour. Foi muito bom compartilhar esses momentos ao lado de todos.

Aos meus familiares, que, de alguma forma, incentivaram-me na constante busca pelo conhecimento.

A todos os funcionários do INQUI e da Bioquímica por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável e que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho

Aos órgãos de fomento pelas bolsas de estudo e apoio financeiro, FUNDECT, CNPq, CAPES e PROPP-UFMS.

## SUMÁRIO

ÍNDICE ESQUEMAS.....	VIII
ÍNDICE ESPECTROS.....	IX
ÍNDICE FIGURAS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS.....	XIV
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Doença de Alzheimer.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Sistema colinérgico.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Acetilcolinesterase.....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Inibidores.....</b>	<b>7</b>
<b>1.5. L-Hipaforina.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Resultados e discussão.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Síntese da L-Hipaforina e D-Hipaforina.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Síntese do cloridrato da L-Hipaforina e D-Hipaforina.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Atividade Biológica.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3.1. Curvas de proteína.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3.2 Atividade inibitória dos compostos sobre a AChE.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.2.1. Análise da neostigmina.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.2.2. Análise do tempo ótimo de incubação.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.2.3 Análise da temperatura ótima para atividade enzimática.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.2.4 Atividade inibitória da L-Hipaforina e D-Hipaforina sobre a AChE.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4. Docking Molecular.....</b>	<b>34</b>
<b>4. Parte Experimental.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1. Material e métodos.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2. Síntese.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.1. Síntese da (S)-Hipaforina (1a) e (R)-Hipaforina (2a).....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.2. Síntese do cloridrato da (S)-Hipaforina (1a) e (R)-Hipaforina (1b).....</b>	<b>39</b>
<b>4.3. Avaliações biológicas.....</b>	<b>39</b>

4.3.1. Aspectos éticos .....	39
4.3.2. Animais.....	39
4.3.3. Ambientação e condições experimentais .....	40
4.3.4. Dissecção das estruturas encefálicas .....	40
4.3.5. Quantificação da atividade e inibição da AChE .....	40
4.3.6. Quantificação do conteúdo proteico .....	41
4.4. Análise estatística .....	42
4.5. Estudos de <i>docking molecular</i> .....	42
5. Conclusões .....	43
Referências .....	44
Anexo .....	52

## ÍNDICE ESQUEMAS

Esquema	Título	Página
<b>Esquema 1</b>	Preparação da (S)-Hipafarina ( <b>1a</b> ).	14
<b>Esquema 2</b>	Preparação do cloridrato de (R)-Hipafarina ( <b>2b</b> )	20
<b>Esquema 3</b>	Proposta da interação do íon metilssulfato com DTNB	23

## ÍNDICE ESPECTROS

<b>Espectro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Espectro 1</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, em DMSO- $\text{d}_6$ ) da L-Hipaforina.	16
<b>Espectro 2</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, em DMSO- $\text{d}_6$ ) da L-Hipaforina.	17
<b>Espectro 3</b>	Espectro de HRMS-ESI da L-Hipaforina. (Calculado: m/z 247,1447[M+H] $^+$ , encontrado: m/z 247,1467 [M+H] $^+$ ).	17
<b>Espectro 4</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, em DMSO- $\text{d}_6$ ) da D-Hipaforina.	18
<b>Espectro 5</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, em DMSO- $\text{d}_6$ ) da D-Hipaforina.	19
<b>Espectro 6</b>	Espectro de HRMS-ESI D-Hipaforina. (Calculado: m/z 247,1447 [M+H] $^+$ , encontrado: m/z 247,1451 [M+H] $^+$ ).	19

## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Processo de síntese e hidrólise da acetilcolina.	3
<b>Figura 2</b>	Sinapse colinérgica.	4
<b>Figura 3</b>	Estrutura dos aminoácidos serina, histidina e glutamato	6
<b>Figura 4</b>	Características estruturais do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase (AChE)	7
<b>Figura 5</b>	Estrutura dos AChEis aprovados pela FDA	8
<b>Figura 6</b>	Estruturas da huperzina A e de um derivado da huperzina A	8
<b>Figura 7</b>	Estruturas de inibidores da AChE derivados de carbamatos	9
<b>Figura 8</b>	Estrutura do L-triptofano, serotonina e melatonina	10
<b>Figura 9</b>	Estrutura da 6-bromohipaforina	11
<b>Figura 10</b>	Estruturas da L-Hipaforina, acetilcolina e neostigmina	12
<b>Figura 11</b>	Estrutura da L-Hipaforina e D-Hipaforina	14
<b>Figura 12</b>	Curvas de proteína para a quantificação da atividade da enzima AChE no córtex cerebral, estriado, cerebelo e hipocampo	21
<b>Figura 13</b>	Efeito da L-Hipaforina sobre a atividade enzimática da AChE do córtex.	22
<b>Figura 14</b>	Relação das diferentes concentrações de metilssulfato de neostigmina com DTNB (concentração fixa 0,5 mM) em relação a absorvância ( $\lambda_{\text{máx}}= 412 \text{ nm}$ )	24
<b>Figura 15</b>	Curva de proteína com diferentes tempos de incubação	25
<b>Figura 16</b>	Efeito do da L-Hipaforina sobre a atividade enzimática da acetilcolinesterase no córtex em diferentes temperaturas	26
<b>Figura 17</b>	Efeito da L-Hipaforina sobre a atividade enzimática da AChE do córtex cerebral	27
<b>Figura 18</b>	Efeito do cloridrato da D-Hipaforina sobre a atividade enzimática da AChE do córtex cerebral	28
<b>Figura 19</b>	Inibição da atividade da AChE in vitro no córtex cerebral, cerebelo, estriado e hipocampo na presença de diferentes concentrações de L-Hipaforina (0,01, 0,1, 1,0, 10, 100 e 1000 $\mu\text{M}$ ).	29
<b>Figura 20</b>	Determinação da $\text{IC}_{50}$ da L-Hipaforina no cerebelo	30
<b>Figura 21</b>	Inibição da atividade da AChE in vitro no córtex cerebral, cerebelo, estriado e hipocampo na presença de diferentes concentrações de D-Hipaforina (0,01, 0,1, 1,0, 10, 100 e 1000 $\mu\text{M}$ ).	31

<b>Figura 22</b>	Determinação do IC <sub>50</sub> da D-Hipaforina no cerebelo (A) e no estriado (B)	32
<b>Figura 23</b>	<i>Docking molecular</i> (3D) da L-hipaforina e D-hipaforina no mesmo sítio ativo do inibidor huprina W na hAChE	35
<b>Figura 24</b>	Principais interações da L-Hipaforina com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da hAChE	36
<b>Figura 25</b>	Principais interações da D-Hipaforina com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da hAChE	37

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é considerada a demência de maior ocorrência em todo o mundo em pessoas idosas. A DA leva a deficiência de neurotransmissores, principalmente a acetilcolina (ACh). Apesar de não ter cura, o tratamento através do uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChEis) é o mais utilizado, pois os mesmos impedem a hidrólise da ACh e, portanto, aumentam a neurotransmissão colinérgica nas regiões cerebrais. Os fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da DA possuem problemas de toxicidade e de baixa biodisponibilidade, assim a novas estruturas promissoras tem sido investigada. A L-Hipaforina, um alcaloide indólico natural encontrado em plantas do gênero *Erythrina* (Leguminosae) possui ação no sistema nervoso central. Extratos aquosos e etanólicos de *Erythrina velutina* são capazes de inibir a atividade da AChE. No entanto, não há relatos na literatura sobre a inibição da AChE pela hipaforina. Neste contexto, devido às suas características estruturais semelhantes a ACh, este trabalho propôs a síntese e a avaliação anticolinesterásica da L e D-Hipaforina. Em nosso estudo, a L e a D-Hipaforina foram obtidas através de reações do L e D-triptofano com iodeto de metila em meio básico com bons rendimentos de 92 % e 95 %, respectivamente. Os ensaios de inibição da atividade de AChE com a L e D-Hipaforina foram realizados em quatro regiões encefálicas: córtex, hipocampo, corpo estriado e cerebelo. Os resultados da atividade inibitória de AChE apresentaram uma inibição seletiva nas diferentes regiões cerebrais. A L-Hipaforina apresentou inibição no cerebelo com uma  $IC_{50} = 18,63 \pm 0,14 \mu M$  e a D-Hipaforina apresentou inibição no cerebelo e corpo estriado com uma  $IC_{50} = 19,12 \pm 0,03 \mu M$  e  $34,60 \pm 0,34 \mu M$ , respectivamente. Através dos estudos de *docking molecular* foram observadas interações diferentes da D-Hipaforina com os resíduos de aminoácidos presentes no sitio ativo da AChE, quando comparado com a L-Hipaforina. A inibição seletiva apresentada pelos enantiômeros da Hipaforina é muito importante para os estudos farmacodinâmicos da classe destes compostos, pois cada região encefálica desempenha funções distintas, como reflexos e coordenação postural (cerebelo), função emocional, aprendizado e impulsos motores (corpo estriado).

Palavras-chaves: Doença de Alzheimer, Acetilcolinesterase, Hipaforina.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is considered the most prevalent dementia worldwide in the elderly. AD is due to a deficiency of neurotransmitters, mainly acetylcholine (ACh). Despite the lack of cure, treatment with acetylcholinesterase inhibitors (AChEis) is the most used, since they prevent the hydrolysis of ACh and, therefore, increase cholinergic neurotransmission in the brain regions. Drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of AD have problems of toxicity and low bioavailability, so promising new structures has been investigated. L-Hypaphorine, a natural indole alkaloid found in plants of the genus *Erythrina* (Leguminosae) has effects in the central nervous system. Aqueous and ethanolic extracts of *Erythrina velutina* are able to inhibit AChE activity. However, there are no reports in the literature about the inhibition of AChE by hypaphorine. In this context, since it has structural characteristics similar to ACh, this work proposed the synthesis and anticholinesterase evaluation of L and D-Hypaphorine. In our study, L and D-Hypaphorine were obtained by reactions of L and D-tryptophan with methyl iodide in basic medium with good yields of 92% and 95%, respectively. Inhibition assays of AChE activity with L and D-Hypaphorine were performed in four brain regions: cortex, hippocampus, striatum and cerebellum. The results of AChE inhibitory activity showed a selective inhibition in the different brain regions. L-Hypaphorine showed inhibition in the cerebellum with an  $IC_{50} = 18.63 \pm 0.14 \mu\text{M}$  and D-Hypaphorine showed inhibition in the cerebellum and striatum with an  $IC_{50} = 19.12 \pm 0.03 \mu\text{M}$  and  $34.60 \pm 0.34 \mu\text{M}$ , respectively. Through the studies of docking molecular, was possible to observe different interactions of D-Hypaphorine with the amino acid residues present in the active site of AChE, when compared with the L-Hypaphorine. The selective inhibition presented by the enantiomers of Hypaphorine is very important for the pharmacodynamic studies of the class of these compounds, considering that each brain region performs different functions, such as reflexes and postural coordination (cerebellum), emotional function, learning and motor impulses (striatum).

Keywords: Alzheimer's disease, Acetylcholinesterase, Hypaphorine.

## ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico em ppm
$\mu\text{M}$	Micro molar
Å	Angstrom
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChEis	Inibidores da enzima acetilcolinesterase
AcSCh	Acetilticolina
ANOVA	Análise de variância
Asp	Aspartato
BCh	Butirilcolina
BChE	Butirilcolinesterase
ccd	Cromatográficas em camada delgada
Ch	Colina
CH <sub>3</sub> I	Iodo metano
ChAT	Colina-O-acetil-transferase
ChEIs	Colinesterases
CHT1	Colina de alta afinidade
d	Dupleto
DA	Doença de Alzheimer
dl	Dupleto largo
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
h	Hora
hAChE	Acetilcolinesterase humana
HCl	Ácido clorídrico
HRMS-ESI	<i>High Resolution Mass Spectrometry by Electrospray ionization</i> (espectrometria de massas de alta resolução por ionização eletrospray)
Hz	Hertz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC <sub>50</sub>	Inibição de 50 %
Iso-OMPA	Tetraisopropyl pyrophosphoramide
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m/z	Razão massa/carga
mAChRs	Receptores colinérgicos muscarínicos
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nAChRs	Receptores colinérgicos nicotínicos
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
nm	Nanômetro
NTSB	5-sulfonatotiol-2-nitrobenzoato
ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Simpleto
S.E.M	<i>Standard error of the mean</i> (Erro padrão da média)
Ser	Serina
SNC	Sistema nervoso central
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
Thr	Treonina
TMS	Tetrametilsilano
TNB	Ânion 5-tio-2nitrobenzoato
Trp	Triptofano
Tyr	Tirozina
vAChT	Transportadores vesiculares de acetilcolina

## **1. Introdução**

### **1.1. Doença de Alzheimer**

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, considerada a demência de maior ocorrência em todo o mundo, sendo responsável por mais de 80 % dos casos em pessoas idosas, levando ao progressivo declínio funcional, comportamental, mental e até mesmo da capacidade de realização de tarefas simples do cotidiano (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; KIA et al., 2013; KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015).

Essa demência é um dos maiores desafios globais de saúde pública enfrentada pela nossa geração. A quantidade de pessoas que vivem com essa demência em todo o mundo atualmente é estimada em 47 milhões, podendo esse valor dobrar até 2030 e mais do que triplicar até 2050 à medida que as populações envelhecem (PRINCE et al., 2014). Dados apontam que o custo global da demência foi estimado em 604 bilhões de dólares no ano de 2010 e em 818 bilhões de dólares em 2016, com perspectiva de aumento que pode chegar a trilhões de dólares já em 2018, principalmente devido aos custos com o tratamento (PRINCE et al., 2015).

A prevalência mundial da DA aumenta acentuadamente com a idade, e sua incidência é maior a partir dos 70 anos (KIA et al., 2013). Concomitante a esse dado, existe a preocupação dos cientistas com o aumento de casos da doença no Brasil, pois dados do último censo demográfico realizado pelo IBGE apontam um aumento na expectativa de vida para os brasileiros de 74,6 em 2012 para 78,8 anos em 2016. No estado de Mato Grosso do Sul, segundo o IBGE, a expectativa de vida subiu de 73,8 anos de 2012 para 75,5 em 2016, estando próxima a média nacional (IBGE, 2017).

Estudos realizados no Brasil apontam um aumento da mortalidade pela DA no contexto das doenças crônicas na população (TEIXEIRA et al., 2015). Projeções indicam que a prevalência média da DA apresenta-se mais alta que a mundial, passando de 7,6 % para 7,9 % entre 2010 e 2020, ou seja, 55.000 novos casos por ano, dados observados para a população com 65 anos ou mais (BURLÁ et al., 2013). Em outro estudo de projeção do número de idosos acometidos pela DA com mais de 65 anos, foram obtidos valores significativos para a cidade de Campo Grande-MS, principalmente para a comunidade japonesa, devido à perspectiva de vida desta população, apresentando uma taxa

bruta de 12,10 % em Campo Grande, enquanto que a média observada para os países da América Latina foi de 7,13 %. Além disso, diferenças expressivas também foram observadas nas taxas por sexo, sendo de 11,4 % entre os homens e 12,6 % entre as mulheres, especificamente na comunidade japonesa de Campo Grande, provavelmente porque a expectativa de vida é maior entre a população feminina (BURLÁ et al., 2013).

A DA foi descrita pelo patologista Alois Alzheimer em 1907, que observou os traços neuropatológicos da doença, cujo processo degenerativo progressivo das funções psicomotoras e cognitivas dura cerca de 8 a 10 anos, desde o aparecimento dos primeiros sintomas até a morte (JUNIOR et al., 2004). As causas da DA não são conhecidas, mas dentre as principais hipóteses causadoras da doença estão a ocorrência da deposição extracelular de peptídeo  $\beta$ -amilóide em plaquetas senis e a formação de emaranhados neurofibrilares (MATTSON, 2004).

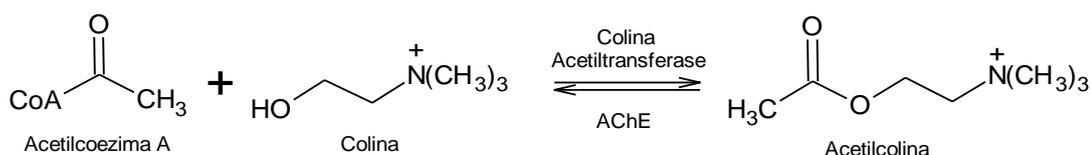
As placas  $\beta$ -amiloides são formadas a partir da acumulação extracelular de agregados insolúveis da proteína  $\beta$ -amilóide, um pequeno polipeptídeo formado pelo processamento da proteína precursora de  $\beta$ -amilóide transmembrana. Os emaranhados neurofibrilares ocorrem de maneira intracelular e são compostos por filamentos helicoidais emparelhados de proteínas tau hiperfosforiladas. A proteína tau em sua forma normal possui a função estabilizadora da polimerização da  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina, proteínas responsáveis pela formação dos microtúbulos, que são importantes para o transporte vesicular de proteínas. Devido a uma mutação no seu gene, a proteína tau se torna hiperfosforilada diminuindo a estabilidade dos dímeros polimerizados de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina, ocasionando a degeneração dos microtúbulos. Essas causas levam a ativação de cascatas neurotóxicas e alterações do citoesqueleto que causam a disfunção sináptica e a morte neural (GARCÍA-AYLLÓN et al., 2011; KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015; MATTSON, 2004; SILVA et al., 2014).

Outra característica encontrada no cérebro de pacientes com DA é o atrofiamento cerebral. Este atrofiamento no córtex cerebral danifica regiões associadas com os pensamentos, planos e lembranças. Já no cerebelo, afeta regiões associadas aos reflexos e coordenação postural. O corpo estriado, região responsável pelas funções emocionais, aprendizados e impulsos motores

também é afetado. O hipocampo também é uma região muito importante para as funções cerebrais, pois está associada à memória e cognição. Os sintomas cognitivos envolvem o aprendizado e déficits de memória, acompanhados de distúrbios neuropsiquiátricos, considerados parcialmente induzidos pela perda de neurônios colinérgicos. Essa perda de neurônios está associada à redução das taxas de acetilcolina (ACh) no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical, além de outros neurotransmissores em menor extensão (BERSON et al., 2008; GEORGE-HYSLOP, 2000; TABARRINI et al., 2001).

## 1.2. Sistema colinérgico

O sistema de neurotransmissão colinérgica é constituído pela acetilcolina (ACh) (**Figura 1**), seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação (Ventura, 2010).

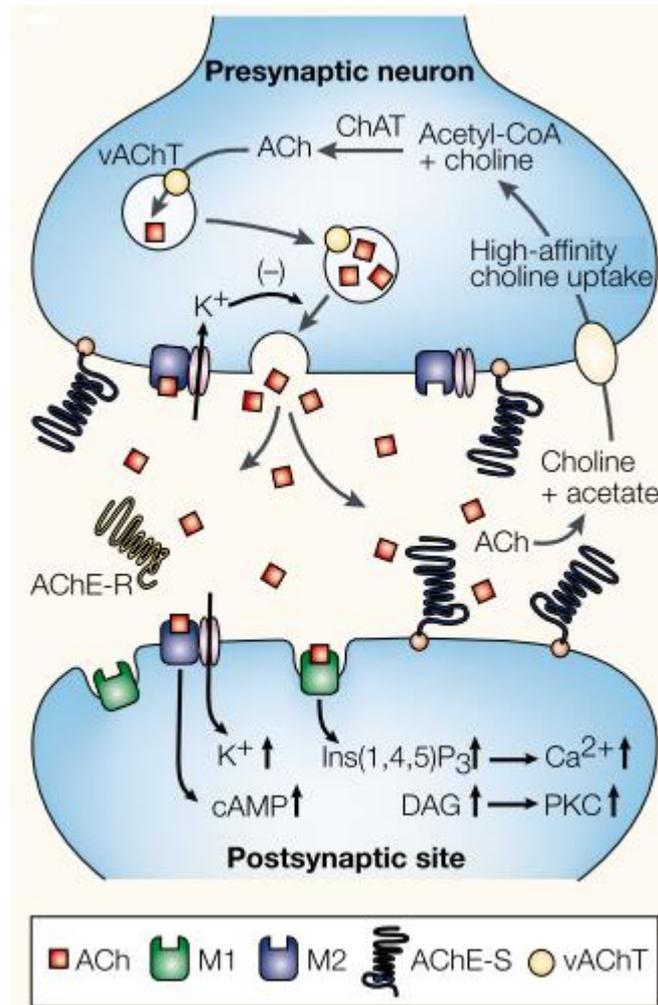


**Figura 1.** Processo de síntese e hidrólise da acetilcolina.

A ACh é um mediador químico de sinapses no sistema nervoso central (SNC), no sistema nervoso periférico e também na junção neuromuscular. Ela é sintetizada a partir da reação entre acetil-coenzima A (acetil-CoA) e colina (**Figura 1**), catalisada pela enzima Colina-O-acetil-transferase (ChAT). O substrato acetil-CoA está presente em todas as células, já a colina provem da dieta e é entregue às células nervosas pela corrente sanguínea. A colina também pode ser gerada pela fosfatidilcolina e glicerofosforilcolina, presente na membrana celular.

A ACh é conduzida por transportadores vesiculares (vAChT) através dos microtúbulos e armazenada em vesículas sinápticas (**Figura 2**), sendo capaz de elevar em até 100 vezes sua concentração no interior das vesículas. Ao ser liberada na fenda sináptica, a ACh interage reversivelmente com os receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) e receptores colinérgicos muscarínicos

(mAChRs) pré e pós-sinápticos. Após dissociar-se dos receptores, a ACh é hidrolisada pelas enzimas colinesterases (ChEIs), em acetato e colina (Ch), que por sua vez é recaptada pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1) para a síntese de novas moléculas de ACh.



**Figura 2.** Sinapse colinérgica. Colina acetil-transferase (ChAT); transportador vesicular de acetilcolina (vAChT); AMP cíclico (cAMP); diacilglicerol (DAG); proteína cinase C (PKC); monômeros da AChE solúveis na fenda sináptica (AChE-R); tetrâmeros da AChE que estão ligados a junção neuromuscular (AChE-S); receptor muscarínico 1 (M1); receptor muscarínico 2 (M2); inositol-1,4,5-trisfosfato (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) (Adaptada de SOREQ; SEIDMAN, 2001).

As ChEIs, são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de funções como a hidrólise e detoxificação de xenobióticos (MASSOULI et al., 1998).

As principais enzimas dessa família são às enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) que diferem em sua especificidade de substrato. A AChE somente hidrolisa a ACh, já a BChE possui menor especificidade pela ACh do que a AChE, no entanto, tem alta especificidade pela butirilcolina (BCh) (SOREQ; SEIDMAN, 2001; TAYLOR, 1994).

### **1.3. Acetilcolinesterase**

A AChE é uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas na junção neuromuscular (MASSOULI et al., 1998). A hidrólise do neurotransmissor ACh é conhecida por ser uma das reações catalíticas enzimáticas mais eficientes, possuindo um papel regulatório na neurotransmissão colinérgica (NUNES-TAVARES et al., 2002)

A AChE é constituída por subunidades catalíticas, cada uma com uma massa de 70-80 kDa. Essas subunidades se agrupam em estruturas oligoméricas que podem ser divididas em duas classes: as formas assimétricas (An) e as formas globulares (Gn). Apesar das suas diferenças estruturais, as atividades das subunidades catalíticas nas formas globular e assimétrica são semelhantes (DELFINO; RIBEIRO; FIGUEROA-VILLAR, 2009; MULLER; DUMEZ; MASSOULIE, 1985; TAYLOR, 1994).

As formas globulares são compostas por monómeros ( $G_1$ ), dímeros ( $G_2$ ) ou tetrâmeros ( $G_4$ ). O monômero  $G_1$  e o tetrâmero  $G_4$  estão presentes majoritariamente, já o dímero  $G_2$  está presente em menor proporção no cérebro de mamíferos (MASSOULI et al., 1998).

A isoforma  $G_1$  (monomérica) está relacionada com o estresse crônico e é solúvel em tampão de baixa força iônica. Já isoforma  $G_4$  (tetrâmero) desempenha um papel importante nos procedimentos de aprendizagem e memória, uma vez que as mudanças na atividade se correlacionam positivamente com eventos de treinamento, amnesia e tratamento anti-dementico (DAS; DIKSHIT; T, 2005). Essa isoforma é solúvel em solução detergente, pois está ligada fortemente na membrana por sequencias de aminoácidos hidrofóbicos ou glicofosfolípidos (MASSOULIE et al., 1999; VASILOPOULOU et al., 2016).

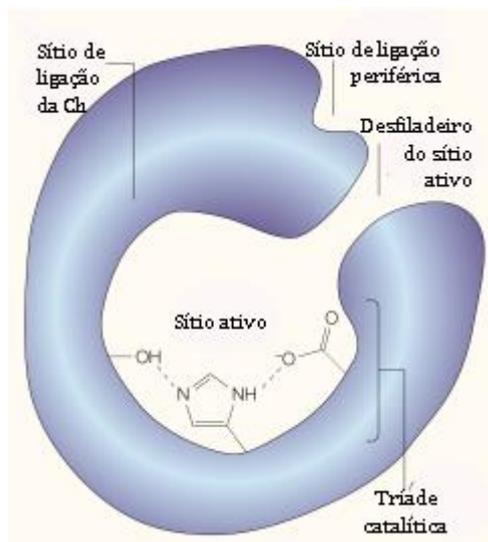
As isoformas G<sub>4</sub> e G<sub>1</sub> são as mais importantes para a degradação da ACh. Em pacientes com DA, a isoforma G<sub>4</sub> está presente em menor quantidade, enquanto a presença da isoforma G<sub>1</sub> não é alterada (GARCÍA-AYLLÓN et al., 2011; GORDON et al., 1990; RAKONCZAY, 2003).

O sítio catalítico da AChE contém uma tríade catalítica, responsável pela hidrólise da ACh. Fazem parte dessa tríade os resíduos de aminoácidos de serina (Ser), histidina (His) e glutamato (Glu) (**Figura 3**). A tríade catalítica não é o único componente do sítio ativo, embora seja, sem dúvida, a principal região envolvida na catálise.



**Figura 3.** Estrutura dos aminoácidos Serina, Histidina e Glutamato.

A **Figura 4** mostra uma representação do sítio ativo da AChE, baseado na cristalografia de raios-X desta enzima, chamada também de sítio aniônico catalítico (*catalytic anionic site* – CAS). Este sítio está localizado no fundo de uma região conhecida como “desfiladeiro do sítio ativo”, caracterizado por vários sublocais, como: (1) o sítio de ligação da Ch, região de ligação da Ch após a hidrólise da ACh, caracterizada pela presença de resíduos de triptofano hidrofóbicos, além de grupos aniônicos; (2) o sítio “aniônico” periférico (*peripheral anionic site* – PAS), cuja ocupação pode influenciar na conformação do sítio ativo, e portanto, na afinidade ou configuração dos compostos ligados ao centro ativo; e (3) a região que contém três resíduos da tríade catalítica, Ser, His e Glu envolvidos diretamente na hidrólise da acetilcolina. Esses três domínios atuam de forma concertada, resultando na complexa dinâmica de reação que caracteriza a AChE (DELFINO; RIBEIRO; FIGUEROA-VILLAR, 2009; KIA et al., 2013; QUINN, 1987; SOREQ; SEIDMAN, 2001).

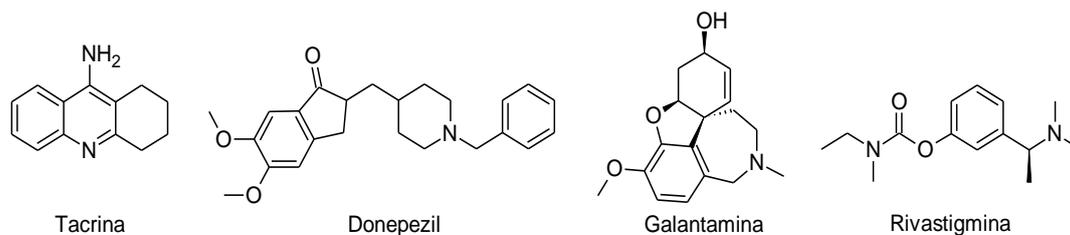


**Figura 4.** Características estruturais do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Adaptado de SOREQ; SEIDMAN, 2001).

#### 1.4. Inibidores

Na DA ocorre a deficiência de neurotransmissores que são responsáveis pela transmissão dos estímulos nervosos de um neurônio a outro. O principal neurotransmissor deficiente é a ACh, envolvida diretamente nos processos motores, cognitivos e de memória. A DA provoca a degradação de neurônios diminuindo a atuação da ACh. Apesar da DA não ter cura, o uso de AChEis proporciona um grande avanço no tratamento desta doença (PETRONILHOA; PINTO; VILLARA, 2011; SILVA et al., 2014).

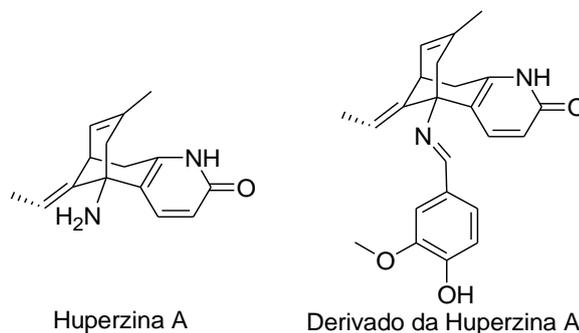
Os atuais AChEis utilizados no tratamento da DA aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para o tratamento dessa doença são: a tacrina, o donepezil, a galantamina e a rivastigmina (**Figura 5**) (SILVA et al., 2014). Os AChEis impedem a degradação do neurotransmissor ACh e, portanto, aumentam a neurotransmissão colinérgica nas regiões encefálicas (SILVA et al., 2014; TAYEB et al., 2012). Embora, a tacrina seja um dos primeiros AChEis aprovados para o tratamento de DA em 1993, sua prescrição tem sido evitada devido à elevada incidência de efeitos colaterais, incluindo a hepatotoxicidade (TAYEB et al., 2012). Todos os demais inibidores da AChE possuem problemas, como a baixa biodisponibilidade, curta duração da ação biológica, efeitos terapêuticos estreitos e a alta toxicidade (KIA et al., 2013).



**Figura 5.** Estrutura dos AChEis aprovados pela FDA.

No entanto, existe uma busca intensiva por AChEis oriundos de fontes vegetais ou baseados na estrutura de produtos naturais. Os produtos naturais têm sido uma rica fonte de agentes valiosos na medicina durante séculos, onde, mais da metade dos fármacos atualmente disponíveis são compostos naturais ou correlacionados, através de modificações estruturais que proporcionaram um aumento na atividade farmacológica (MOLLICA et al., 2012; NEWMAN; CRAGG, 2007).

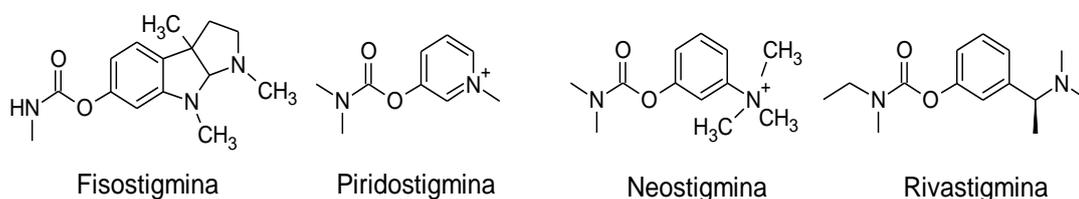
Vários AChEis são baseados em produtos naturais e os principais compostos desta categoria são os alcaloides presentes em plantas medicinais, alguns dos quais são utilizados como medicamentos alternativos em muitos países (CORTES et al., 2015; HE et al., 2015; SILVA et al., 2014). Estes compostos incluem a huperzina A e análogos sintéticos como mostrado na **Figura 6** (SILVA et al., 2014). A huperzina A é um alcaloide natural isolado a partir do arbusto de musgo chinês (*Huperzia serrata*), é um AChEi que também possui efeitos de neuroproteção (ZHANG; YAN; TANG, 2008). Seu derivado se mostrou como um potente AChEi com uma  $IC_{50}$  de 16 nM, sendo mais potente que seu precursor ( $IC_{50}$  = 260 nM) (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015).



**Figura 6.** Estruturas da huperzina A e de um derivado da huperzina A.

Outra classe de compostos são os carbamatos, devido à sua ação inibitória reversível da AChE, possuem uma grande importância na aplicação na medicina humana como compostos farmacologicamente ativos. Um produto natural contendo o grupo carbamato é a fisostigmina (**Figura 7**), metabólito

secundário da planta *Physostigma venenosum* e amplamente utilizado no tratamento da miastenia grave, sendo também um potente inibidor de AChE, melhorando a transmissão de impulsos nervosos. Além disso, a piridostigmina, utilizada para tratamento da miastenia grave e a neostigmina, utilizada no tratamento do glaucoma, também apresentam inibição da atividade de AChE, a piridostigmina com uma  $IC_{50}$  360  $\mu$ M e a neostigmina com uma  $IC_{50}$  de 18,8  $\mu$ M. A rivastigmina também é utilizada no tratamento sintomático da DA e possui a melhor aplicação farmacológica (KRSTI et al., 2013; NAIR; HUNTER; CHB, 2004; YAMAZAKI et al., 2016; YU et al., 2010).



**Figura 7.** Estruturas de inibidores da AChE derivados de carbamatos.

### 1.5. L-Hipaforina

Uma das estruturas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DA é a L-Hipaforina, também conhecida como betaína e lenticina, um alcaloide indólico natural encontrado em plantas do gênero *Erythrina* (Leguminosae) (HE et al., 2015; IRANSHAHI et al., 2012; OZAWA et al., 2008).

No Estado de Mato Grosso do Sul são encontradas principalmente na região do Pantanal duas espécies do gênero *Erythrina* spp: *Erythrina dominguezzi* Hassl. e *Erythrina fusca* Lourt. (Leguminosae-Faboideae) (SILVA; TOZZI, 2012; POTT et al., 1994; SILVA et al., 2012). A espécie *E. dominguezzi* é conhecida popularmente como “maria-mole” e considerada espécie ameaçada do Distrito Federal, porém ainda pouco estudada em termos fitoquímicos. A *E. fusca* é conhecida popularmente como “abobreira” e é utilizada na medicina popular para doenças do fígado, no entanto, é considerada tóxica (POTT et al., 1994). Estudos fitoquímicos mostram a presença de alcaloides nesta espécie (DEREK et al., 1973; ITURRIAGA-VASQUEZ et al., 2010).

A medicina tradicional brasileira usa a casca da árvore “mulungu”, nome dado às várias espécies de *Erythrina*, para sedação e como anticonvulsivante.

Dentre elas, existe a espécie *E. velutina* Willd. (Leguminosae) encontrada na caatinga abrangendo o nordeste do Brasil, e a espécie *E. mulungu* Mart. ex Benth. (Leguminosae-Papilionoideae), encontrada principalmente na região central e no Sudeste. Estudos fitoquímicos de *E. mulungu* apontaram a presença de vários alcaloides, dentre eles a Hipaforina, e ensaios biológicos mostraram que estes alcaloides atuam sobre o sistema colinérgico periférico (BALBANI; SILVA; MONTOVANI, 2009).

A L-Hipaforina também foi isolada a partir das sementes e folhas de *E. velutina*, e estudos deste alcaloide na indução do sono em ratos mostraram um aumento no movimento não rápido dos olhos (NREM) durante o tempo de sono após a primeira hora de administração. O NREM é reconhecido como um estado de sono profundo (OZAWA et al., 2008). Acredita-se que esta ação da L-Hipaforina, derivada do L-triptofano, está associada com a cascata bioenergética de neurotransmissores a partir de L-triptofano a serotonina e melatonina (**Figura 8**) (OZAWA et al., 2008). Outro estudo mostrou que extratos aquosos e etanólicos da folha de um espécime *E. velutina* foram capazes de inibir a atividade da AChE com um IC<sub>50</sub> de 0,52 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,57 mg.mL<sup>-1</sup> respectivamente. (SANTOS et al., 2012).

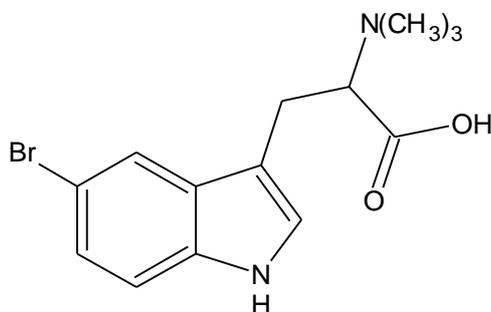


**Figura 8.** Estrutura do L-triptofano, serotonina e melatonina.

A Hipaforina já foi isolada da semente de diferentes espécies, como *Vaccaria segetalis* (SUN et al., 2012), *Astragalus lusitanicus* (BEL-KASSAOUI, H., LAMNAOUER, D., JOSSANG, A., ABDENNEBI, E.H., CHARROUF, Z., BODO, 2008), *Astraeus odoratus* (ARPHA et al., 2012) e *Polygonum multiflorum* (HAN et al., 2013). Estudos já demonstraram que a Hipaforina extraída de sementes da *Impatiens niamniamensis* é capaz de agir como um agente anti-hiperglicêmico em ratos diabéticos (CHAND et al., 2011).

Derivados da Hipaforina também já foram isolados de esponjas marinhas, como *Pachymatisma johnstoni*, *Aplysina* sp., e em tunicatas *Aplidium conicum*.

A 6-bromohipaforina (**Figura 9**), foi isolada do molusco *Hermisenda crassicornis* e apresentou efeito agonista para os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (KASHEVEROV et al., 2015; MOLLICA et al., 2012; RAVERTY; THORNSON; KING, 1976).



6-bromohipaforina

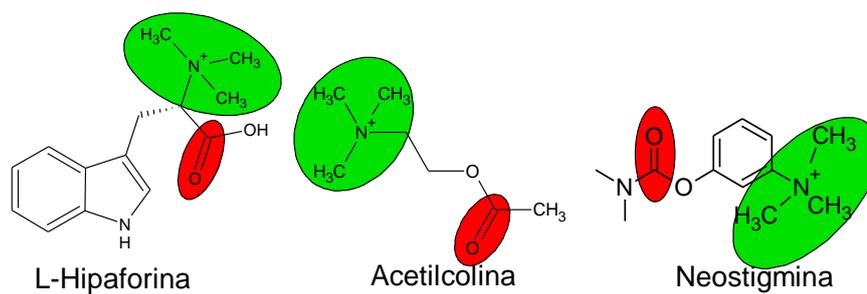
**Figura 9.** Estrutura da 6-bromohipaforina

A Hipaforina é uma molécula que possui um centro estereogênico, sendo assim, o estudo biológico de enantiômeros puros seriam de extrema importância para estudos de estrutura atividade. Fármacos quirais podem existir na forma racêmica ou na forma enantioméricamente pura, já que possuem propriedades físico-químicas semelhantes. No entanto, diferem em suas propriedades biológicas, tais como a distribuição, metabolismo e excreção, além da sua toxicidade, podendo ser significativamente diferentes devido às interações estereoespecíficas com sistemas biológicos (enzimas, receptores, transportadores e DNA) (KASPRZYK-HORDERN, 2010; SMITH, 2009).

A atividade biológica de enantiômeros puros é de grande importância, pois estudos demonstram que o uso de drogas puras possui vantagem por: reduzir a dose total administrada, simplificar a relação dose-resposta, e minimizar a toxicidade devido ao isômero inativo (CALDWELL, 1996). Além disso, enantiômeros puros apresentam uma maior atividade inibitória da AChE e da BuChE (MOHAMMED et al., 2017). Logo, é de extrema importância à análise da atividade biológica de enantiômeros puros para o desenvolvimento de fármacos, selecionando apenas um dos compostos para maximizar os efeitos clínicos ou diminuir a toxicidade de drogas (SMITH, 2009).

Observando a estrutura da Hipaforina podem-se notar aspectos interessantes para estudos biológicos relacionados ao sistema colinérgico, como a inibição da AChE, pois possui um grupo acetato e amônio, aspectos muito

semelhantes ao substrato natural da AChE, ou seja, a ACh. Também existentes em inibidores muito potentes inibidores da AChE, como a neostigmina (**Figura 10**).



**Figura 10.** Estruturas da L-Hipaforina, acetilcolina e neostigmina, com destaque em verde grupo amônio quaternário e em vermelho grupo carbonila.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Sintetizar a L-Hipaforina e D-Hipaforina e testar seu potencial como fármaco na atividade anticolinesterásica para o tratamento da doença de Alzheimer.

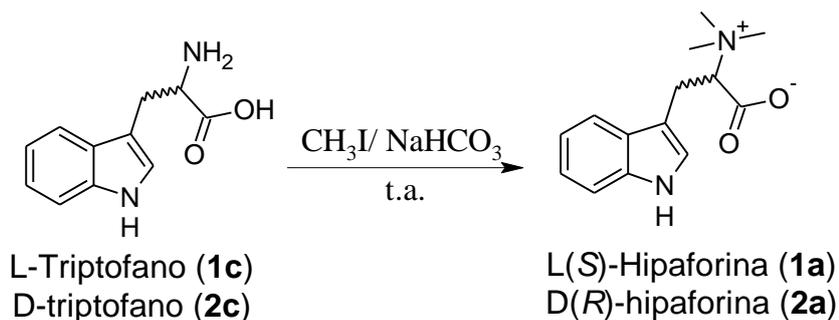
### 2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar o produto natural L-Hipaforina (**1a**) e seu enantiômero D-Hipaforina (**2a**);
- Preparar os cloridratos dos compostos sintetizados;
- Realizar ensaios da atividade inibitória sobre a enzima AChE;
- Realizar estudos de *docking molecular* dos compostos preparados.

### 3. Resultados e discussão

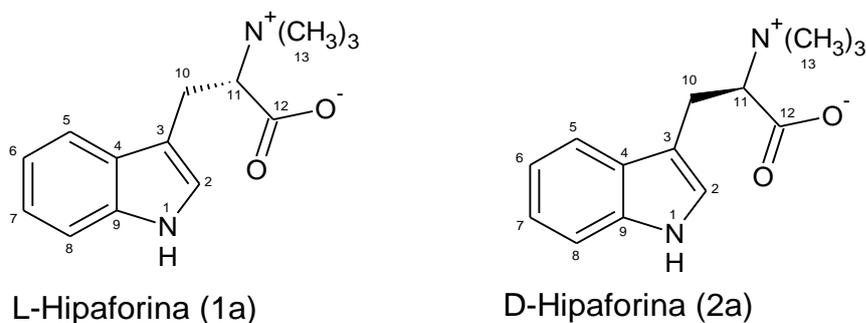
#### 3.1 Síntese da L-Hipaforina e D-Hipaforina

A L-Hipaforina (**1a**) e D-Hipaforina (**2a**) foram preparadas através de uma reação rápida com o L-triptofano (**1c**) e o D-triptofano (**2c**), respectivamente (**Esquema 1**), adquiridos comercialmente, reagindo-os com iodo metano (CH<sub>3</sub>I) em meio básico e à temperatura ambiente (t.a.) (CHARY et al., 2012).



**Esquema 1.** Preparação da L (**1a**) e D-Hipaforina (**2a**).

A L e a D-Hipaforina (**Figura 11**) foram obtidas com rendimentos de 92 e 95 %, respectivamente. Estes compostos apresentaram-se como sólidos amarelados. Suas estruturas foram confirmadas através de análises de RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS-ESI).



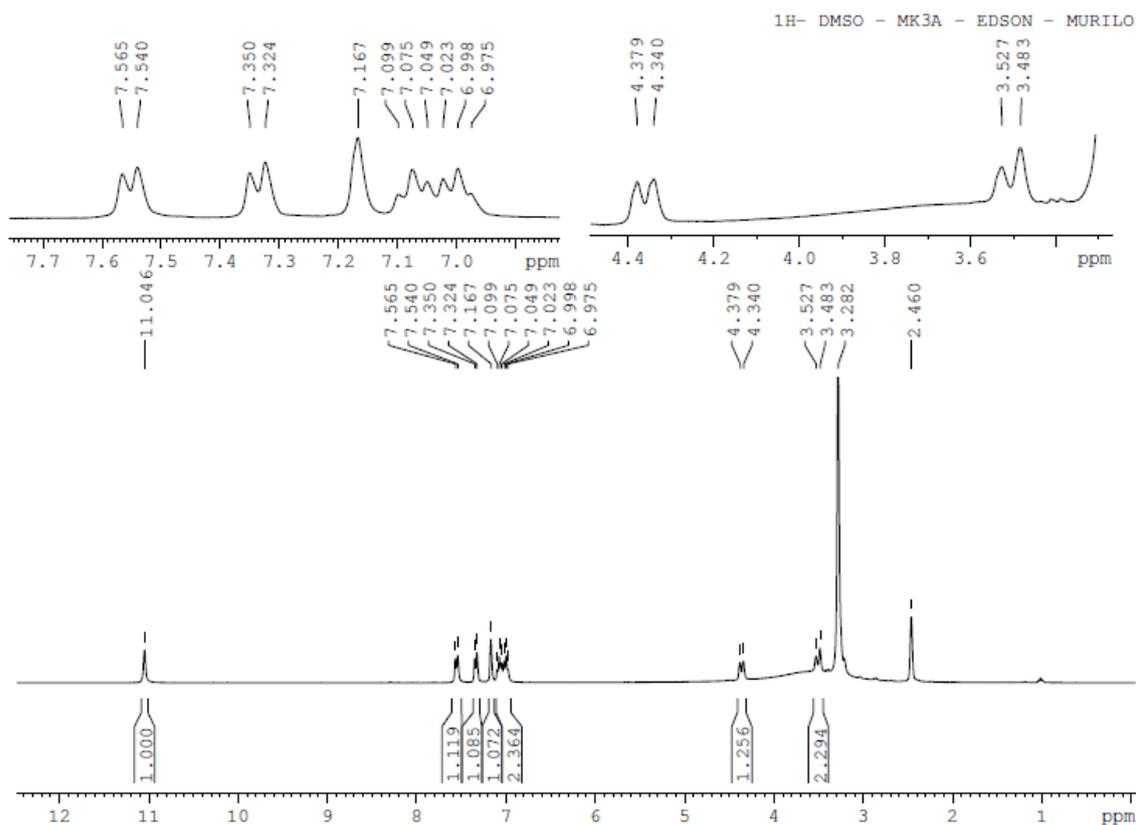
**Figura 11.** Estrutura da L-Hipaforina e D-Hipaforina.

A **Tabela 1** mostra os dados espectrais de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C dos compostos, com seus respectivos deslocamentos químicos.

**Tabela 1.** Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ), expressos em ppm para os compostos L-Hipaforina e D-Hipaforina obtidas dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , em DMSO- $d_6$ .

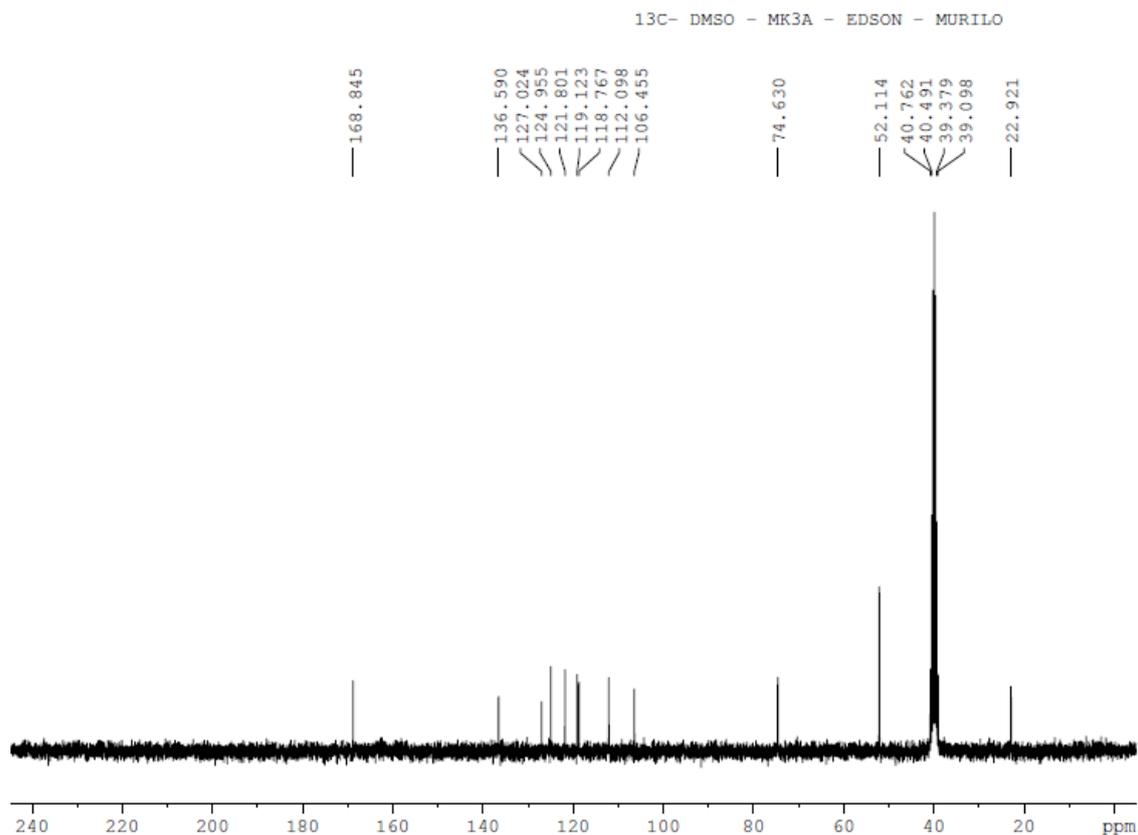
N°	L-Hipaforina		D-Hipaforina	
	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
1	11,04 s	-	11,12 s	-
2	7,16 s	124,9	7,16 s	124,3
3	-	106,4	-	109,4
4	-	127,0	-	127,4
5	7,55 d ( $J=7,6$ Hz)	118,7	7,55 d ( $J=7,6$ Hz)	118,6
6	6,99 t ( $J=7,3$ Hz) ( $J=7,3$ Hz)	119,1	6,98 t ( $J=7,3$ Hz)	118,8
7	7,07 t	121,8	7,06 t ( $J=7,3$ Hz)	121,3
8	7,33 d ( $J=7,6$ Hz)	112,0	7,33 d ( $J=7,6$ Hz)	111,7
9	-	136,5	-	136,4
10	3,50 d ( $J=13,0$ Hz)	22,9	3,50 d ( $J=13,0$ Hz)	23,6
11	4,36 dl ( $J=11,1$ Hz)	74,6	4,37 dl ( $J=11,1$ Hz)	78,9
12	-	168,8	-	168,4
13	-	52,1	-	51,5

Através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectro 1**) podemos confirmar a estrutura da L-Hipaforina no qual apresentaram-se: quatro sinais de hidrogênios aromáticos acoplados mutuamente em  $\delta$  7,55 (d,  $J=7,6$  Hz, H-5),  $\delta$  7,33 (d,  $J=7,6$  Hz, H-8),  $\delta$  7,07 (t,  $J=7,3$  Hz, H-7), e  $\delta$  6,99 (t,  $J=7,3$  Hz, H-6); um sinal de hidrogênio aromático como singleto em  $\delta$  7,16 (H-2); deslocamento químico em  $\delta$  4,36 (dl,  $J=11,1$  Hz, H-11), referente ao grupo metila ligado ao nitrogênio; e dois hidrogênios em  $\delta$  3,5 (dl,  $J=13,0$  Hz, H-10), atribuído aos hidrogênios metilênicos.



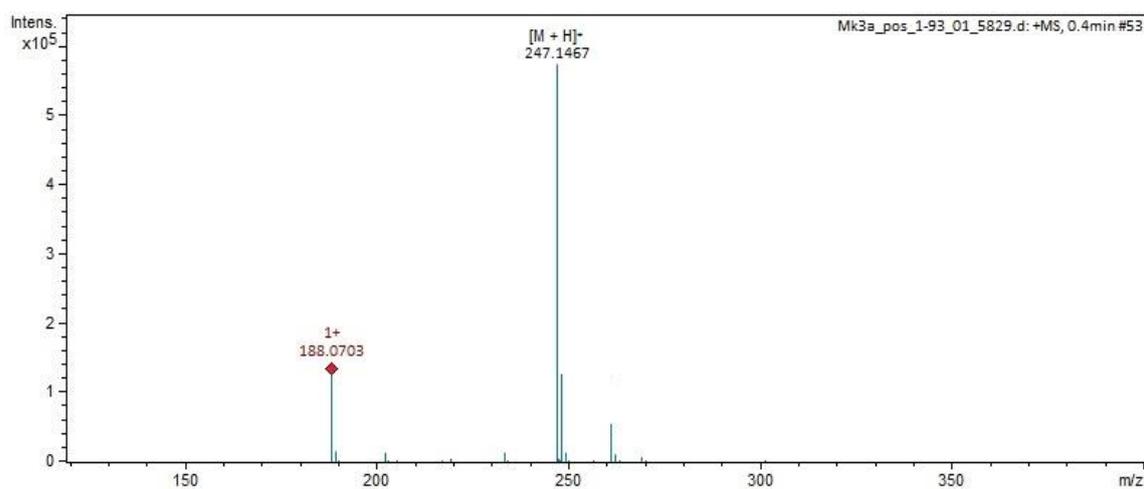
**Espectro 1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, em  $\text{DMSO-d}_6$ ) da L-Hipafarina.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 2**) apresentou seis carbonos metínicos ( $\delta$  74,6, 112,0, 118,7, 119,1, 121,8 e 124,9), três carbonos metílicos referente aos carbonos da metila ligados ao nitrogênio ( $\delta$  52,1, C-13), um carbono metilênico ( $\delta$  22,9, C-10) e quatro carbonos  $\text{sp}^2$  substituídos  $\delta$  106,4, 127,0, 136,6 e 168,8 para C-3, C-4, C-9 e C-12, respectivamente).



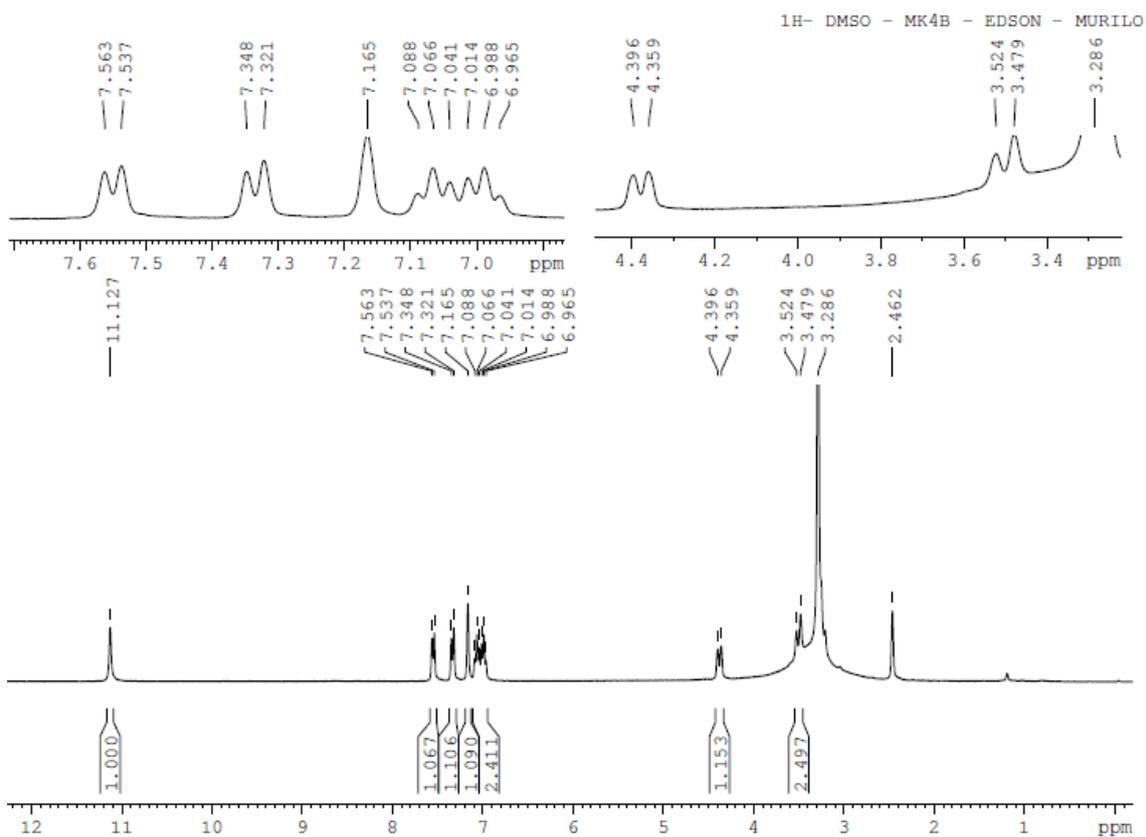
**Espectro 2.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, em DMSO- $d_6$ ) da L-Hipaforina.

Através do espectro de massas da L-Hipaforina (**Espectro 3**) podemos confirmar a massa molecular do composto, devido ao íon protonado  $[\text{M} + \text{H}]^+$  de  $m/z$  247, sugerindo assim a fórmula molecular  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $M = 246$ ).

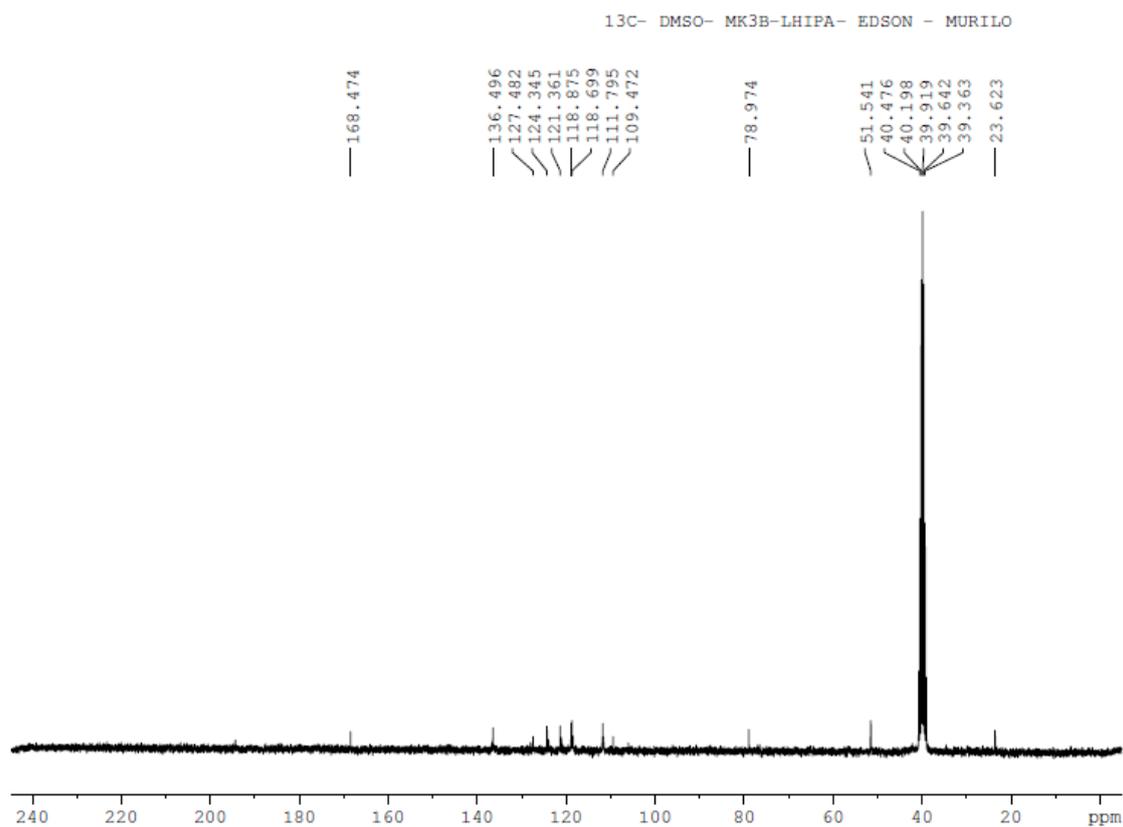


**Espectro 3.** Espectro de HRMS-ESI da L-Hipaforina (Calculado:  $m/z$  247,1447 $[\text{M} + \text{H}]^+$ , encontrado:  $m/z$  247,1467  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\Delta_m = - 8,0$  ppm).

A estrutura da D-Hipaforina também foi confirmada pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (**Espectros 4 e 5**), no qual possuem deslocamentos semelhantes com a L-Hipaforina.

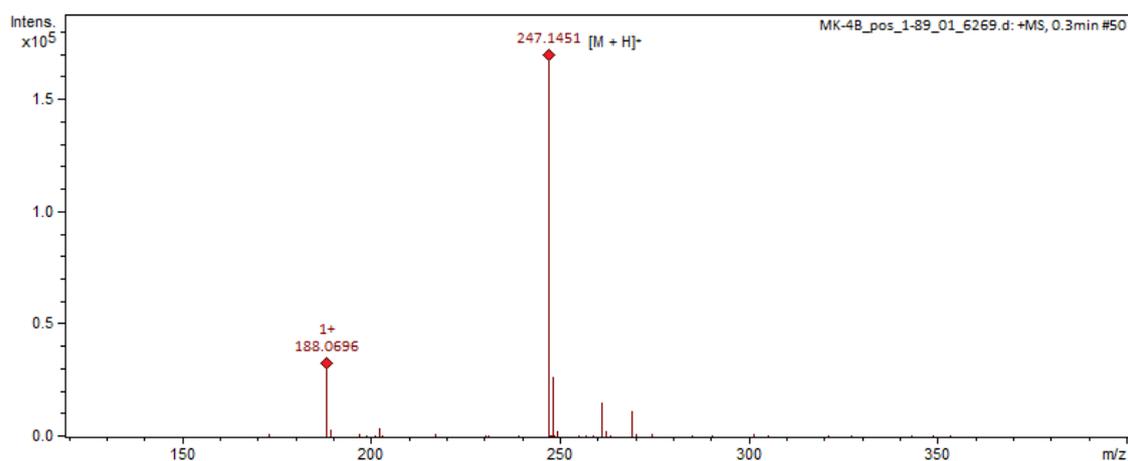


**Espectro 4.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, em  $\text{DMSO-d}_6$ ) da D-Hipaforina.



**Espectro 5.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, em DMSO- $d_6$ ) da D-Hipaforina.

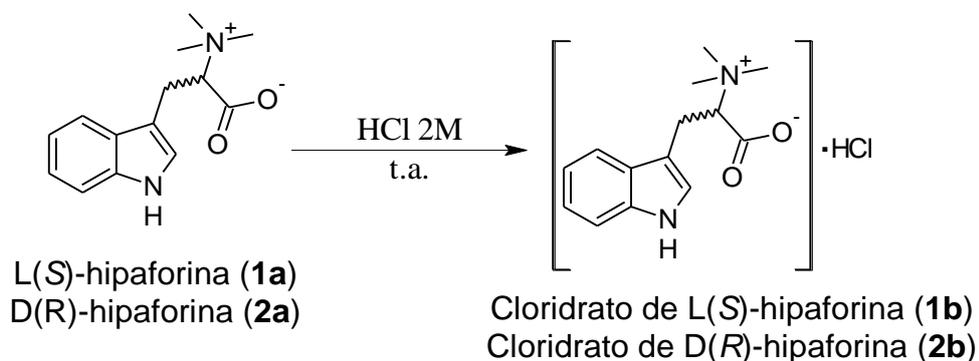
Através do espectro de massas da D-Hipaforina (**Espectro 6**) podemos confirmar a massa molecular do composto, devido ao íon protonado  $[\text{M} + \text{H}]^+$  de  $m/z$  247, podendo ser sugerida então a fórmula molecular  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $M = 246$ ).



**Espectro 6.** Espectro de HRMS-ESI D-Hipaforina (Calculado:  $m/z$  247,1447  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , encontrado:  $m/z$  247,1451  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\Delta_m = -4,0$  ppm).

### 3.2. Síntese do cloridrato da L-Hipaforina e D-Hipaforina

O cloridrato de (S)-Hipaforina e (R)-Hipaforina (**1b**) foi sintetizado pela adição de uma solução de HCl 2M (**Esquema 2**).



**Esquema 2.** Preparação dos cloridratos de L(S) (**1b**) e D(R)-Hipaforina (**2b**).

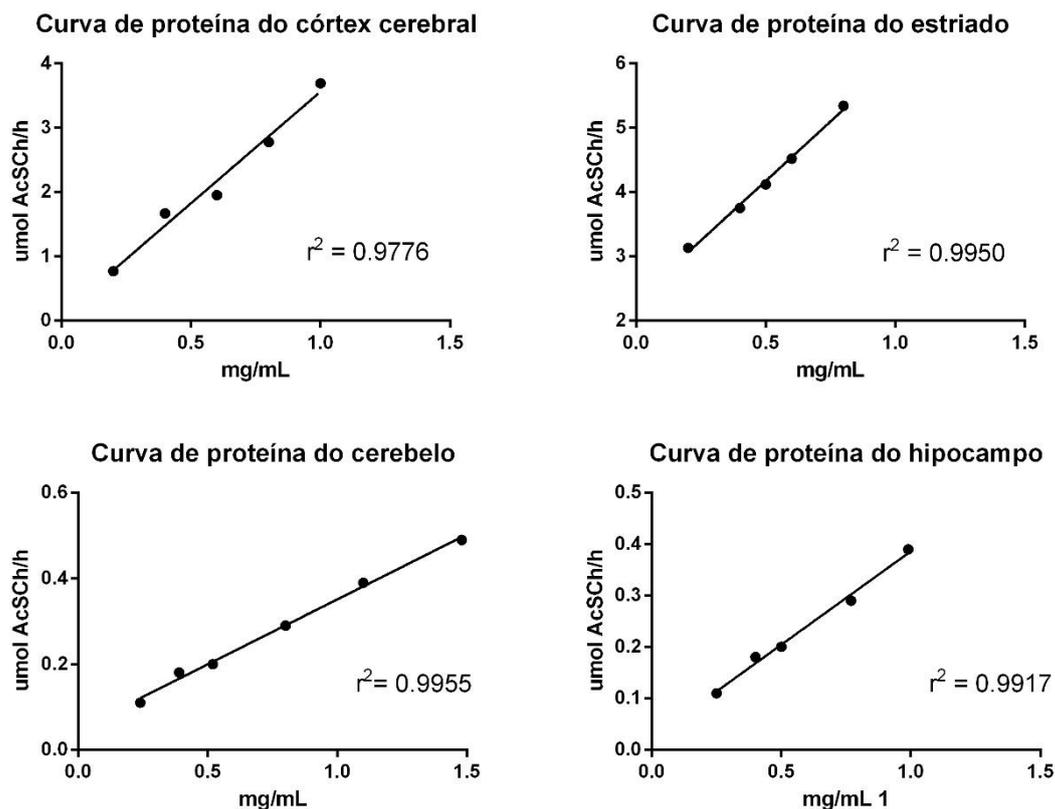
Os cloridratos foram sintetizados a fim de melhorar a cristalização e formação do precipitado, que por sua vez são menos hidrofóbicos quando comparados com a Hipaforina na sua forma natural.

### 3.3. Atividade Biológica

#### 3.3.1. Curvas de proteína

Foram realizadas experimentos para verificar o efeito da concentração de proteína sobre a atividade enzimática, das amostras obtidas a partir das estruturas encefálicas dos animais (**Figura 12**).

Nas curvas realizadas com as amostras de córtex cerebral e hipocampo foi possível observar linearidade da atividade enzimática na faixa de 0,2 a 1,0 mg de proteína/mL, com  $r^2= 0,9776$  e  $r^2= 0,9915$ , respectivamente. Na amostra de corpo estriado foi observado linearidade da reação na faixa de 0,2 a 0,8 mg de proteína/mL, com  $r^2=0,9950$ . Já no cerebelo, a faixa de linearidade foi maior, de 0,2 a 1,5 mg de proteína/mL, e  $r^2= 0,9955$ .



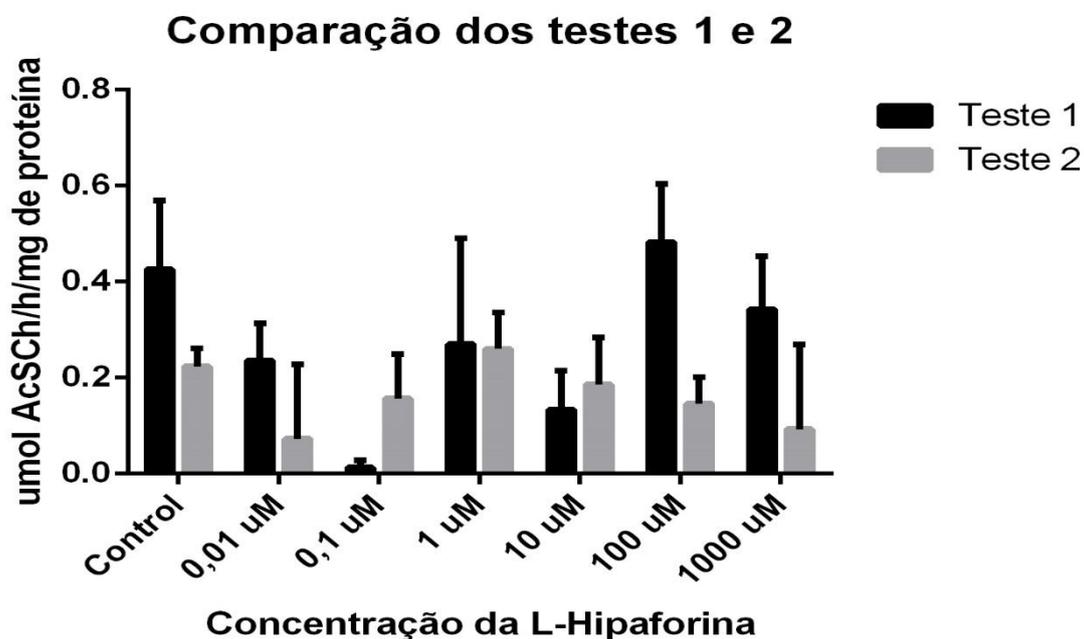
**Figura 12.** Curvas de proteína para a quantificação da atividade da enzima AChE no córtex cerebral (n=3), corpo estriado (n=4), cerebelo (n=4) e hipocampo (n=4).

A concentração de proteína medida na reação reflete diretamente o conteúdo de enzima presente na amostra. Desta forma, os ensaios para a quantificação da atividade da enzima AChE foram realizados utilizando concentrações de proteína que estão nas faixas de linearidade.

### 3.3.2 Atividade inibitória dos compostos sobre a AChE.

Os testes iniciais da atividade inibitória de compostos sobre a atividade da AChE foram realizados utilizando um tempo de incubação de 10 min e metilssulfato de neostigmina como inibidor da AChE, um inibidor padrão utilizado para cessar a atividade da AChE nos ensaios. Os resultados apresentaram uma discrepância nos valores obtidos, pois o Teste 1 mostrou que concentrações menores da L-Hipaforina estavam inibindo mais do que concentrações maiores. Como esses resultados não estavam coerentes foi realizado a repetição do teste.

Com a repetição do experimento verificou-se que as atividades do Teste 2 apresentaram-se diferentes comparadas ao Teste 1, evidenciando que o Teste 1 não era confiável (**Figura 13**).



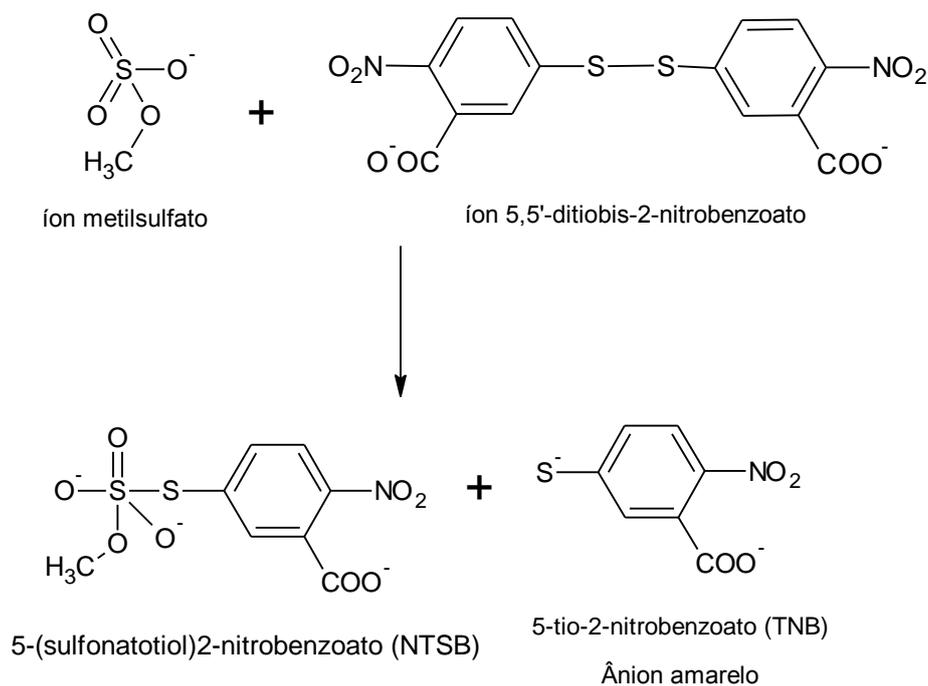
**Figura 13.** Efeito da L-Hipafarina sobre a atividade enzimática da AChE do córtex.

Devido a essa discordância nos resultados obtidos, foram analisados os possíveis problemas que poderiam ter ocorrido. Dentre eles, o padrão de neostigmina utilizado para cessar a reação, o tempo de incubação e a temperatura. Foram realizados experimentos para otimizar esses três parâmetros do protocolo da atividade enzimática.

### 3.3.2.1. Análise da neostigmina

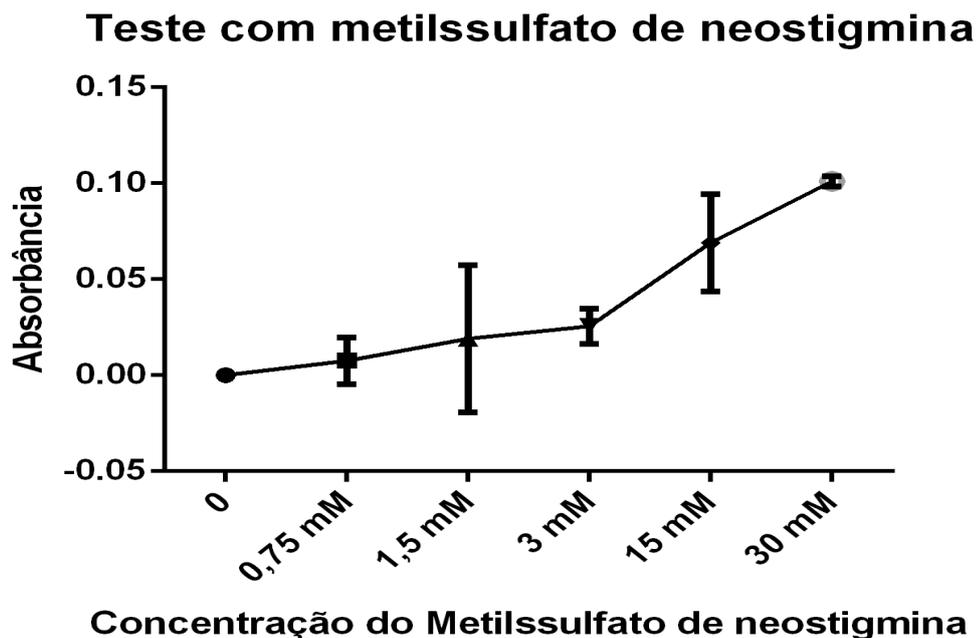
Um possível erro poderia estar relacionado à utilização do inibidor necessário para parar a reação de hidrólise da AChE, que neste caso foi o metilssulfato de neostigmina. Esse inibidor possui como contra íon, o grupamento metilssulfato que estaria se ligando com o DTNB (Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico), formando o 5-sulfonatotiol-2-nitrobenzoato (NTSB) (**Esquema 2**). Assim, conseqüentemente, estaria sendo liberado o 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), composto de cor amarelada, cujo  $\lambda_{\text{máx}} = 412 \text{ nm}$ , fazendo com que a absorbância aumentasse, e assim, aumentando erroneamente a atividade enzimática. A formação desse composto é comprovado por Liao, no

qual o NTSB é formado pela reação do DTNB com sulfato de sódio, formando também TNB (CHEN; LIAO, 2008).



**Esquema 3.** Proposta da interação do íon metilssulfato com DTNB (CHEN; LIAO, 2008).

Para verificar a interferência do contra íon metilssulfato no ensaio, foi realizado um teste em triplicata com diferentes concentrações do metilssulfato de neostigmina com o DTNB (**Figura 14**). Esse experimento foi possível devido à neostigmina absorver em um  $\lambda_{\text{máx}} = 259 \text{ nm}$ , diferente do ânion (TNB) que absorve em  $\lambda_{\text{máx}} = 412 \text{ nm}$ .



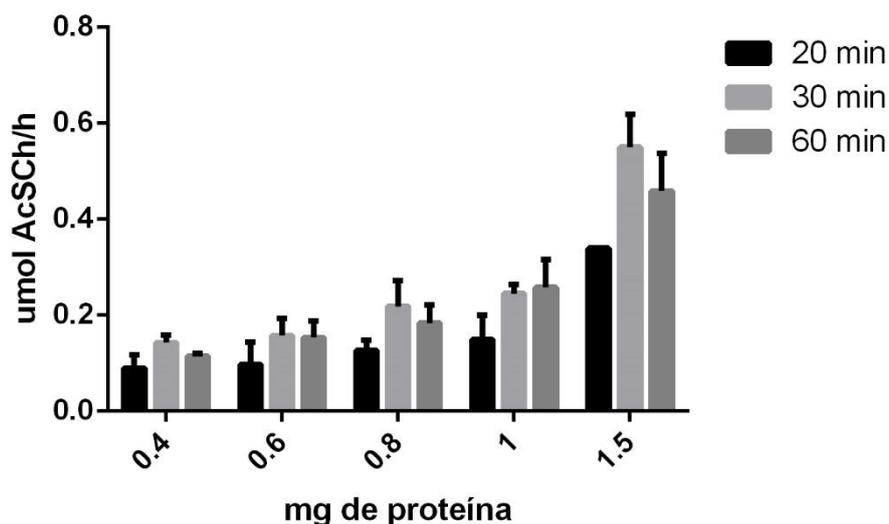
**Figura 14.** Relação das diferentes concentrações de metilssulfato de neostigmina com DTNB (concentração fixa 0,5 mM) em relação à absorvância ( $\lambda_{\text{máx}} = 412 \text{ nm}$ ).

A partir deste resultado, foi possível confirmar a interação do íon metilssulfato com o DTNB, pois com o aumento da concentração do metilssulfato de neostigmina houve aumento na absorvância. Por este motivo, foi utilizado o brometo de neostigmina para realização dos próximos experimentos, pois o íon brometo não interage com o DTNB.

### 3.3.2.2. Análise do tempo ótimo de incubação

Outro possível problema seria a baixa atividade que estava ocorrendo devido ao tempo de incubação de 10 min. Dessa maneira, foram realizados experimentos com diferentes tempos de incubação 20, 30 e 60 min e com diferentes concentrações de proteínas, sem a presença do composto, para analisar interferências na atividade enzimática (**Figura 15**).

### Curva de proteína com diferentes tempos de incubação

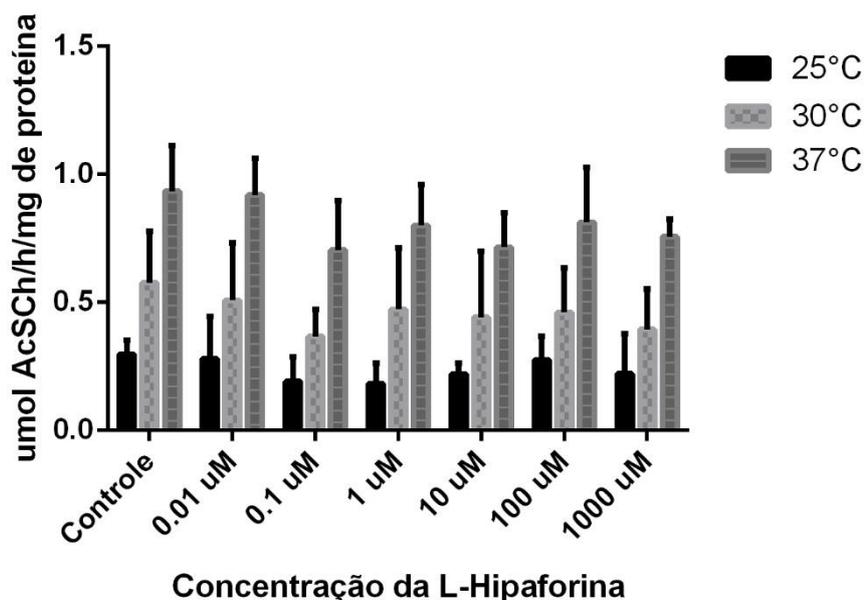


**Figura 15.** Curva de proteína com diferentes tempos de incubação.

O resultado mostrou que nas concentrações de 0,4, 0,8 e 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> o tempo onde se obteve uma maior atividade foi em 30 min. Já nas concentrações de 0,6 e 1,0 mg de proteína.mL<sup>-1</sup> o tempo de 30 min e 60 min apresentaram atividade similares. Logo, o tempo de 30 min foi utilizado como melhor intervalo de incubação para realização dos próximos ensaios.

#### 3.3.2.3 Análise da temperatura ótima para atividade enzimática

Também foi realizado um teste para analisar a melhor temperatura para a determinação da atividade da AChE (**Figura 16**). Esse experimento foi necessário devido às variações da temperatura ambiente que ocorriam durante os dias de experimento, com isso foi necessário controlar a temperatura para que os resultados das atividades não sofressem variações em relação a esta condição experimental.

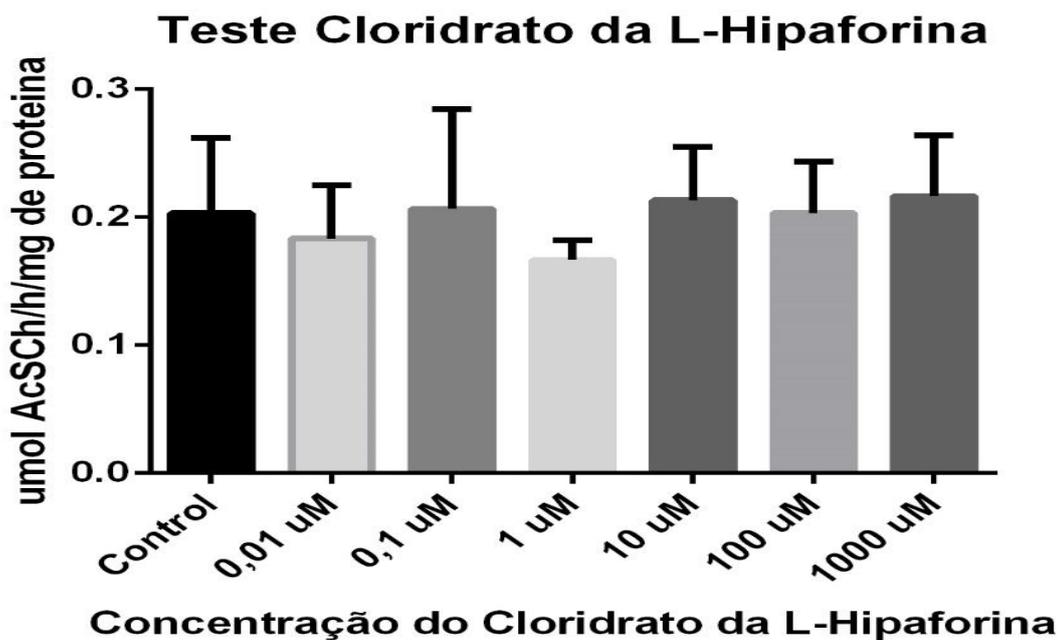


**Figura 16.** Efeito do da L-Hipaforina sobre a atividade enzimática da AChE no córtex em diferentes temperaturas.

Foi observado que o aumento da temperatura, no intervalo testado, elevou a atividade enzimática, sendo a temperatura de 37 °C a que apresentou uma maior atividade. Todos os demais experimentos foram realizados nessa temperatura.

### 3.3.2.4 Atividade inibitória da L-Hipaforina e D-Hipaforina sobre a AChE

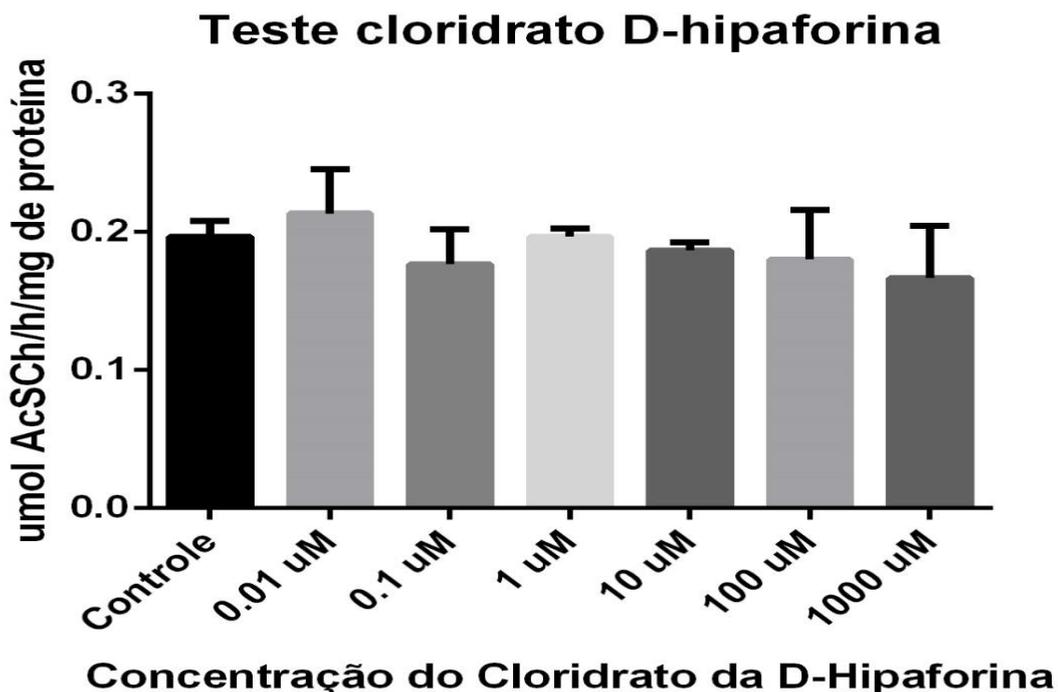
A partir da otimização do protocolo para terminação da atividade da AChE foram realizados os próximos testes, como a determinação do efeito do cloridrato da L-Hipaforina sobre a atividade da AChE do córtex cerebral (**Figura 17**).



**Figura 17.** Efeito da L-Hipaforina sobre a atividade enzimática da AChE do córtex cerebral.

Os resultados obtidos mostraram que o cloridrato da L-Hipaforina não possui efeito inibitório sobre a AChE no córtex cerebral.

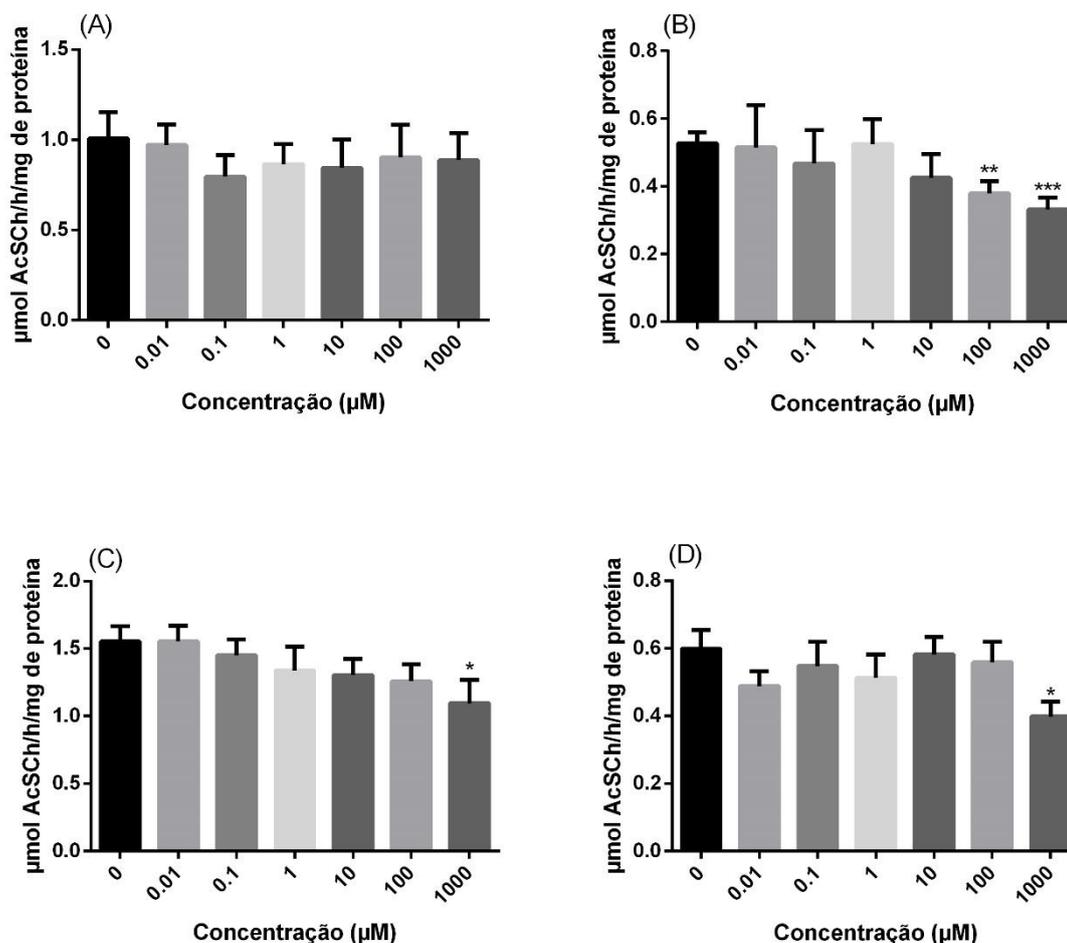
Também foi testado o cloridrato da D-Hipaforina para analisar o seu efeito sobre a AChE no córtex cerebral (**Figura 18**).



**Figura 18.** Efeito do cloridrato da D-Hipaforina sobre a atividade enzimática da AChE do córtex cerebral.

Os resultados mostraram que o isômero D-Hipaforina também não possui efeito inibitório sobre a AChE. Devido aos resultados obtidos, os próximos testes foram realizados com a L-Hipaforina e D-Hipaforina na sua forma neutra, para efeitos de comparação com o produto natural encontrado em plantas.

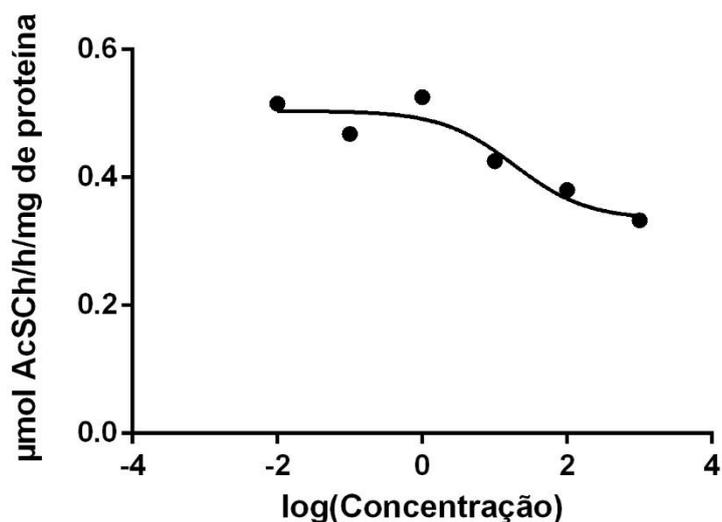
Em seguida, foi testado o potencial de inibição da L-Hipaforina na sua forma neutra em quatro estruturas encefálicas, córtex cerebral, cerebelo, estriado e hipocampo (**Figura 19**).



**Figura 19** - Inibição da atividade da AChE *in vitro* no (A) córtex cerebral, (B) cerebelo, (C) estriado e (D) hipocampo na presença de diferentes concentrações de L-Hipaforina (0,01, 0,1, 1,0, 10, 100 e 1000 µM); (n = 4). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M (erro padrão da média).

A L-Hipaforina apresentou inibição somente no cerebelo (**Figura 19 – B**) nas concentrações de 100 e 1000 µM. No estriado e hipocampo foi observado uma inibição na concentração de 1000 µM. Já no córtex cerebral não foi observada inibição significativa da L-Hipaforina sobre a AChE nas concentrações testadas.

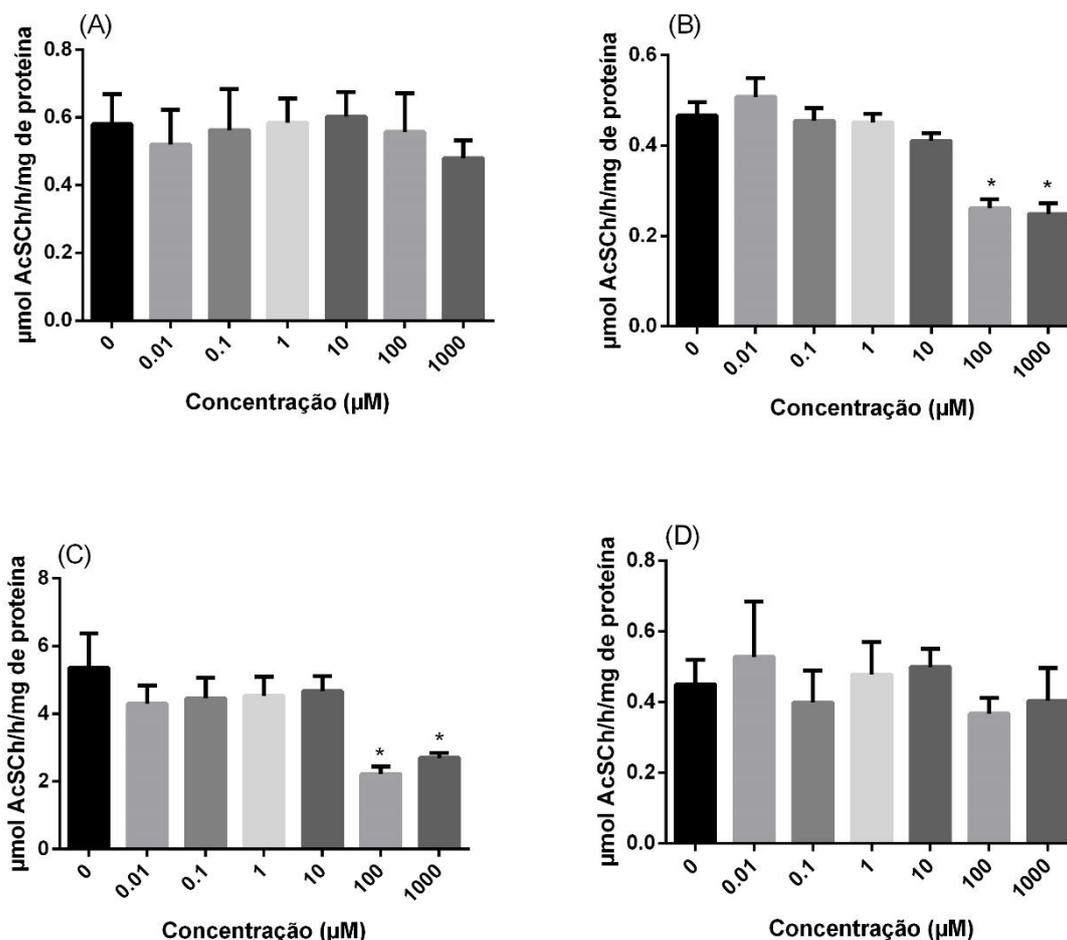
Para a região que sofreu inibição em duas concentrações foi determinado a  $IC_{50}$  (**Figura 20**), sendo a  $IC_{50}$  a concentração que inibe 50 % da atividade enzimática relativa ao controle analisado.



**Figura 20** - Determinação da  $IC_{50}$  da L-Hipaforina no cerebelo. Os dados relatados foram analisados pelo programa GraphPad Prism através da análise de variância não linear RIA (Nonlin fit RIA) seguida do teste log(inibidor) vs resposta (4 parâmetros).

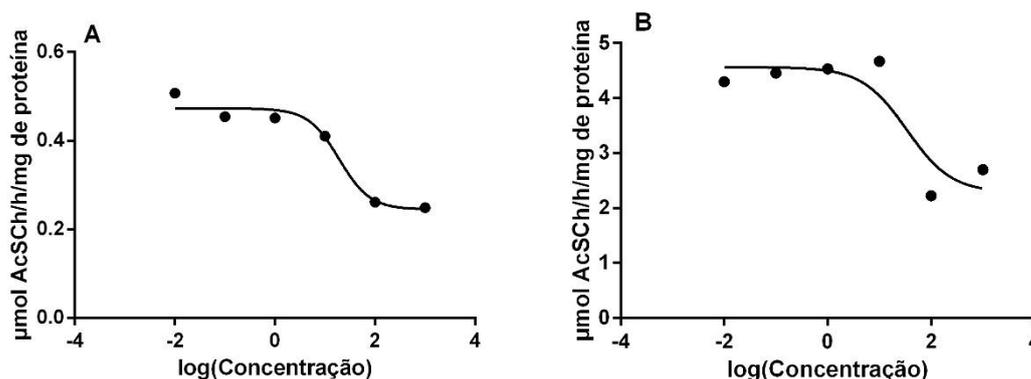
A  $IC_{50}$  encontrada para a L-Hipaforina foi de  $18,63 \pm 0,14$   $\mu$ M, ou seja, nessa concentração o composto consegue inibir 50 % da atividade.

Também foi testado a D-Hipaforina na sua forma neutra em relação ao seu potencial inibitório sobre a AChE nas mesmas regiões encefálicas e concentrações (**Figura 21**).



**Figura 21** - Inibição da atividade da AChE *in vitro* no (A) córtex cerebral, (B) cerebelo, (C) estriado e (D) hipocampo na presença de diferentes concentrações de D-Hipaforina (0,01, 0,1, 1,0, 10, 100 e 1000  $\mu\text{M}$ ); (n = 4). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M.

O resultado demonstrou que a D-Hipaforina possui um efeito inibitório seletivo, no qual mostrou inibição somente no cerebelo (**Figura 21-B**) e estriado (**Figura 21 - C**). A partir dessa inibição foi possível determinar a  $\text{IC}_{50}$  da D-Hipaforina nessas regiões (**Figura 22**).



**Figura 22.** Determinação do IC<sub>50</sub> da D-Hipaforina no cerebelo (A) e no estriado (B). Os dados relatados foram analisados pelo programa GraphPad Prism através da análise de variância não linear RIA (Nonlin fit RIA) seguida do teste log(inibidor) vs resposta (4 parâmetros) (A) e teste log(inibidor) vs resposta (3 parâmetros) (B).

O IC<sub>50</sub> determinado na região do cerebelo foi de  $19,12 \pm 0,03 \mu\text{M}$  e no estriado foi de  $34,60 \pm 0,34 \mu\text{M}$ . Isso demonstra que a D-Hipaforina inibiu mais regiões encefálicas do que a L-Hipaforina.

Tanto a L-Hipaforina quanto a D-Hipaforina apresentaram na região do cerebelo uma inibição, menor que a neostigmina, cujo IC<sub>50</sub> é de  $1,84 \pm 0,17 \mu\text{M}$ .

Essa inibição seletiva da L-Hipaforina e D-Hipaforina pode estar relacionada com as diferentes isoformas da enzima AChE existentes no encéfalo. O monômero G<sub>1</sub> e o tetrâmero G<sub>4</sub> estão presentes majoritariamente, já o dímero G<sub>2</sub> está presente em menor proporção no cérebro de mamíferos (MASSOULI et al., 1998).

A isoforma G<sub>4</sub> predominante no cérebro de pessoas saudáveis, desempenha um papel importante nos procedimentos de aprendizagem e memória, uma vez que as mudanças na atividade se correlacionam com eventos de treinamento, amnésia e tratamento anti-dementico, porém em pessoas com DA, há uma diminuição da isoforma G<sub>4</sub> no cérebro. Já a isoforma G<sub>1</sub> está relacionada com o estresse crônico e não possui essa variação (DAS; DIKSHIT; T, 2005; GOTTWALD; ROZANSKI, 1999).

A isoforma G<sub>4</sub> é solúvel em solução detergente, pois está ligada fortemente na membrana por sequências de aminoácidos hidrofóbicas ou glicofosfolípídeos, já a isoforma G<sub>1</sub> é solúvel em tampão de baixa força iônica (MASSOULIE et al., 1999; VASILOPOULOU et al., 2016).

Como a metodologia de extração da enzima do encéfalo de ratos foi realizada com um tampão de baixa força iônica (Tris HCl 10 mM pH 7,2), foi isolado apenas a isoforma G<sub>1</sub> da AChE. Assim, o efeito inibitório da L-Hipaforina e D-Hipaforina foram estudadas nessa isoforma, sendo que ambas apresentaram uma inibição específica nas regiões cerebrais.

O uso de um inibidor com alta especificidade para a isoforma G<sub>1</sub> da AChE é ideal para o tratamento DA (GOTTWALD; ROZANSKI, 1999). O fármaco Rivastigmina, uns dos fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento da DA, possui uma inibição mais potente sobre a isoforma G<sub>1</sub> do que a isoforma G<sub>4</sub> e também apresenta uma inibição mais potente no córtex cerebral do que no corpo estriado (ENZ et al., 1993). Zhao e Tang (2002) relataram que a huperzina A inibe preferencialmente a isoforma G<sub>4</sub>, enquanto a rivastigmina e tacrina inibem seletivamente a isoforma G<sub>1</sub> no córtex cerebral, no hipocampo e no corpo estriado de ratos.

Alguns estudos demonstram que a atividade da AChE em diferentes regiões cerebrais pode variar devido a quantidade de isoformas da AChE existente nessas regiões. O corpo estriado é a região cerebral que possui a maior atividade, devido à presença de neurônios colinérgicos intrínsecos densos (RANG; 1996). Essas alterações podem estar relacionadas a vários fatores como: a idade do cérebro de ratos macho e fêmea (DAS; DIKSHIT; NATH, 2001; MENEGUZ; BISSO; MICHALEK, 1992), ao estresse que o cérebro é submetido (DAS et al., 2005, 2000; DAS; DIKSHIT; NATH, 2001; VALUSKOVA et al., 2016), à desnutrição (ROCHA; EMANUELLI; PEREIRA, 1993), à diabetes (LUNKES; ABREU; MARCELO, 2004), ao hipotireoidismo (VASILOPOULOU et al., 2016) e também a ingestão de etanol (RUANO et al., 2000).

Dessa maneira, os inibidores da AChE devem ser altamente seletivos para as isoformas enzimáticas e específicos para as diferentes regiões cerebrais e possuir efeitos mínimos sobre o sistema colinérgico periférico e sem toxicidade em outros órgãos. A utilização de inibidores de isoformas moleculares específicas de AChE pode proporcionar a formulação de melhores fármacos de estimulação cognitiva, estimulando regiões específicas do cérebro (DAS; DIKSHIT; T, 2005; RAKONCZAY, 2003).

O efeito da inibição seletiva da L-Hipaforina e D-Hipaforina sobre a atividade da AChE, pode melhorar os estímulos nas regiões do cerebelo e corpo

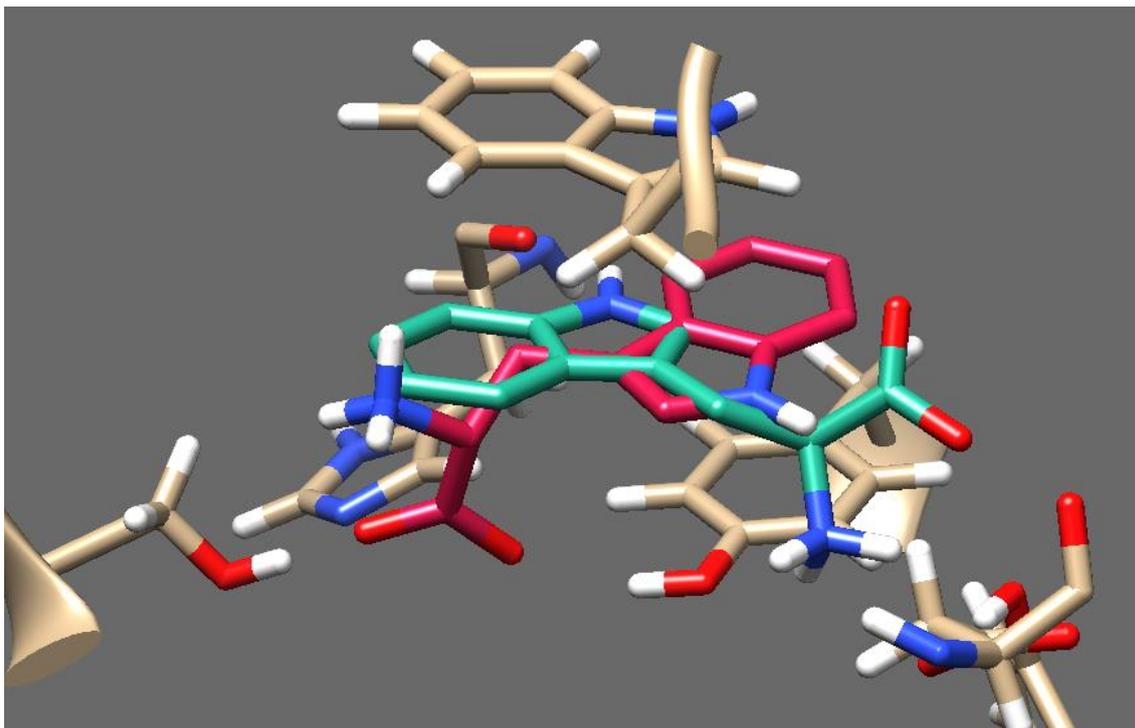
estriado, já que os mesmos desempenham funções distintas. O cerebelo é responsável pelos reflexos e coordenação motora, já o corpo estriado está relacionado com funções emocionais, aprendizado e impulsos motores (CRYAN; HOLMES, 2005).

Outra explicação sobre essa inibição seletiva da Hipaforina é a possibilidade da sua associação com a cascata bioenergética de neurotransmissores presentes no cérebro, pois existem relatos desta substância sobre a indução de sono em ratos (OZAWA et al., 2008). Essa possível interação com outros sistemas biológicos confirma os resultados de que a Hipaforina possa estar inibindo seletivamente a AChE somente em altas concentrações, pois parte das moléculas podem estar interagindo com outras enzimas ou receptores da cascata bioenergética de neurotransmissores derivados do L-triptofano, como a melatonina e serotonina (OZAWA et al., 2008).

Chand et al. (2011) relataram que a Hipaforina pode ser um bom agente anti-hiperglicêmico devido a ensaios realizados em ratos diabéticos. Também derivados da Hipaforina apresentaram efeito agonista para os receptores nicotínicos de acetilcolina (KASHEVEROV et al., 2015). O estudo dessas atividades da Hipaforina são importantes, pois ela está presente na dieta humana, podendo ser encontrada em amêndoas, lentilhas, grão-de-bico e até mesmo no leite materno, na concentração de até 1,24  $\mu\text{M}$  (KELLER et al., 2013).

### **3.4. Docking Molecular**

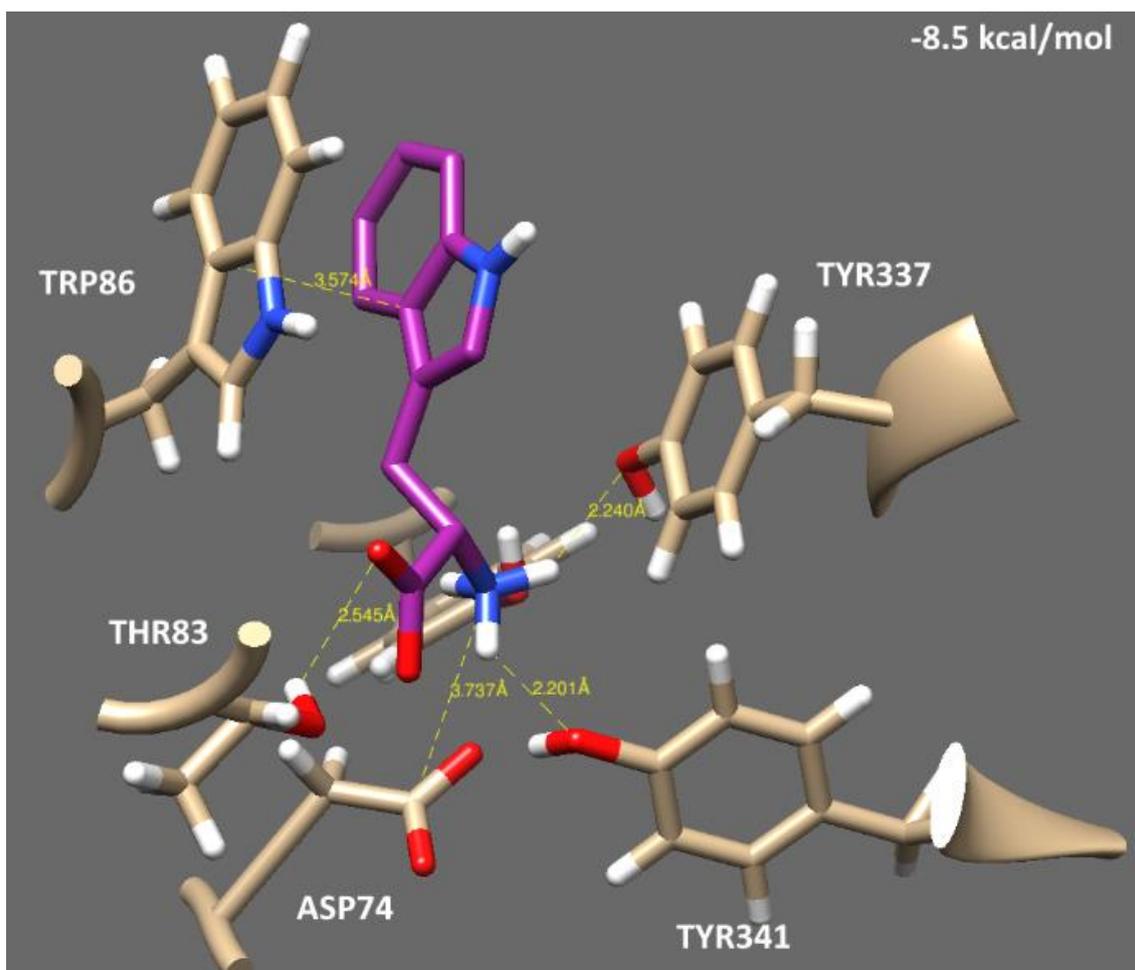
A **Figura 23** mostra o resultado do *docking molecular* das estruturas tridimensionais da L-hipaforina e D-hipaforina no mesmo sítio ativo do inibidor huprina W na hAChE.



**Figura 23.** *Docking molecular* (3D) da L-hipaforina (verde) e D-hipaforina (vermelho) no mesmo sítio ativo do inibidor huprina W na hAChE.

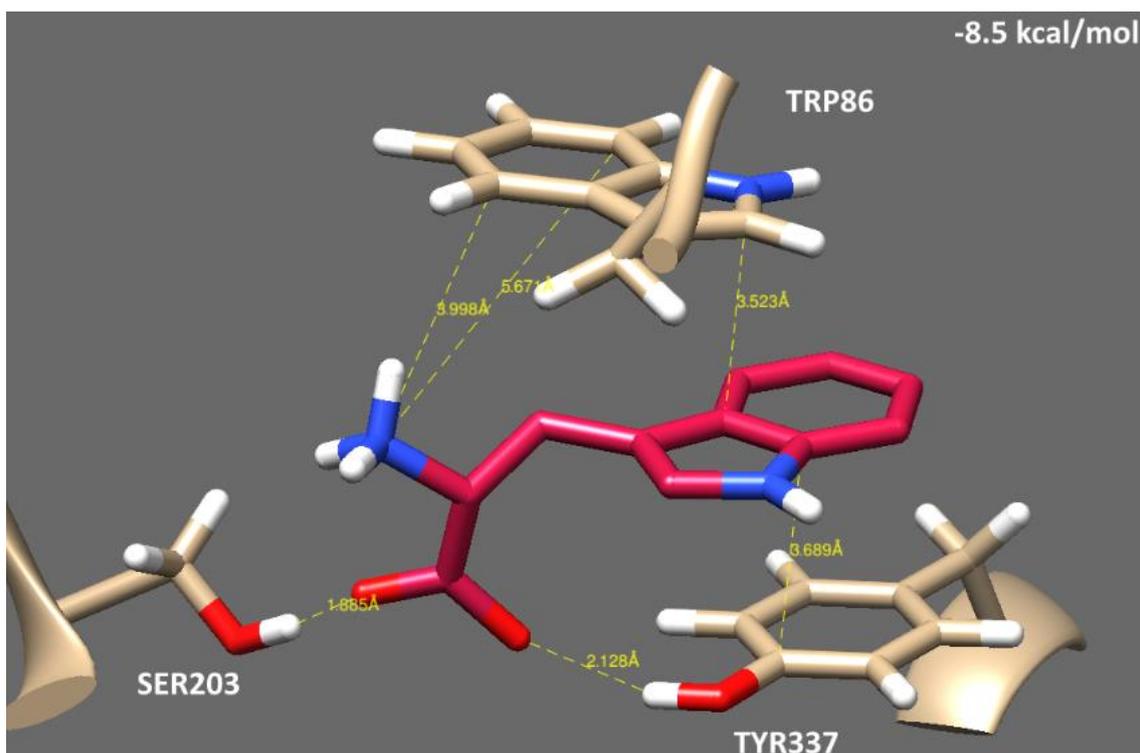
As interações no sítio ativo da enzima entre as conformações de menor energia encontradas para a L-Hipaforina (verde) e D-Hipaforina (vermelho) mostraram ser diferentes. Essas interações distintas que ocorrem entre os enantiômeros no mesmo local de ação, resultando em uma atividade inibitória diferente para cada enantiômero, pois interagem de forma estereoespecífica com a enzima. Devido isso, enantiômeros puros apresentam maior atividade inibitória enzimática quando comparado à misturas racêmicas. (MOHAMMED et al., 2017; SMITH, 2009).

Nas **Figuras 24 e 25** podem ser observadas as principais interações da L- e D-Hipaforina com resíduos de aminoácidos no sitio ativo da enzima hAChE.



**Figura 24.** Principais interações da L-Hipaforina com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da hAChE.

Na **Figura 24** são mostradas as principais interações da L-hipaforina com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da hAChE, destacando a interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  entre o anel indólico com o Trp<sup>86</sup>. Também foram observadas ligações de hidrogênio entre o a carbonila e a Thr<sup>83</sup> (2,54 Å) e interações eletrostáticas entre a amina quaternária e os resíduos de Tyr<sup>341</sup> (2,20 Å) e Asp<sup>74</sup> (3,73 Å).



**Figura 25.** Principais interações da D-Hipaforina com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da hAChE.

Na **Figura 25** são mostradas as principais interações da L-hipaforina com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo na hAChE, destacando a interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  entre o anel indólico com os resíduos de Trp<sup>86</sup> e Tyr<sup>337</sup>. Também foram observadas ligações de hidrogênio forte entre a carbonila e os resíduos de Ser<sup>203</sup> (1,88 Å) e Tyr<sup>337</sup> (2,12 Å).

Essas interações mostram que a D-Hipaforina atua mais fortemente no sítio ativo da enzima do que a L- Hipaforina, podendo explicar esse inibição específica que a D-Hipaforina possui sobre a AChE.

## 4. Parte Experimental

### 4.1. Materias e métodos

As análises cromatográficas em camada delgada (ccd) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Macherey-Nagel), para a visualização dos componentes nas análises em ccd utilizando lâmpada ultravioleta (254 nm). As purificações dos produtos foram realizadas por cromatografia em placa preparativa de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (0,063-0,2 mm). Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram obtidos em 300 MHz e 75 MHz, respectivamente, usando um aparelho Bruker® AVANCE DPX-300 do Laboratório de Pesquisa de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química – UFMS. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz). O tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão de referência interno para deslocamento químico ( $\delta$ ) em soluções de DMSO-d<sub>6</sub>. A análise de massas de alta resolução por *electrospray* (HRMS-ESI) foi realizada em um espectrômetro de massas ESI-qTOF microTOF-Q III (BrukerDaltonics) no Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (FACFAN-UFMS) operado em modo positivo (120-1200 Da) através da inserção direta da amostra com ionização por *electrospray*. As analise de espectrofotometria foram usados um aparelho Genesys 10S UV-Vis e a leitora de placas SpectraMax® Plus<sup>384</sup>. Para separação do material enzimático foi utilizado a centrifuga refrigerada Sigma 4k15. Os solventes utilizados nos processos de extração e síntese foram de grau PA e quando necessário foram tratados em laboratório (PERRIN e ARMAREGO, 1988).

### 4.2. Síntese

#### 4.2.1. Síntese da (S)-Hipaforina (1a) e (R)-Hipaforina (2a)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1 mmol de L-triptofano ou D-triptofano, 16 mmol de iodo metano e 1 g de bicarbonato de sódio em 20 mL de uma solução metanol/água v/v (1:1). A mistura reacional foi, então, mantida sob agitação por 24 h e após esse período o metanol foi evaporado da reação. Em seguida, o resíduo é extraído com clorofórmio (2 x 5 mL) e água destilada (2 x 5 mL). A fase aquosa foi evaporada sob pressão reduzida, obtendo o produto na forma bruta. O produto foi purificado por meio de recristalização em etanol. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada fina e

revelado por luz UV com comprimento de onda de 254 nm. As estruturas foram confirmadas por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , por HRMS-ESI realizado em modo positivo.

#### **4.2.2. Síntese do cloridrato da (S)-Hipaforina (1a) e (R)-Hipaforina (1b)**

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1 mmol de L-Hipaforina ou D-Hipaforina em 30 mL de HCl 2M. A mistura reacional foi, então, mantida sob agitação por 2 h e após esse período foi realizado a filtração. A solução filtrada foi deixada em repouso por 24 h até o aparecimento do precipitado de cloridrato. O precipitado foi filtrado e lavado com etanol gelado.

### **4.3. Avaliações biológicas**

Os ensaios e procedimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Bioquímica Geral de Microrganismos do Instituto de Bioquímica (INBIO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

#### **4.3.1. Aspectos éticos**

O trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS registrada com o nº 757/2016 (Em anexo). A manipulação e cuidados com os animais foram realizados de acordo com a Lei nº 11.794, de 2008 (BRASIL. LEI N. 11.794 DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. REGULAMENTA O INCISO VII DO §1º DO ART. 225 DA CONSTITUIÇÃO FEDERAL, 2008), e com a Diretriz Brasileira de Prática Para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBPA) (CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, 2013).

#### **4.3.2. Animais**

Os animais utilizados nos experimentos foram ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos (150-200 g) provenientes do Biotério da UFMS. Foram necessários 10 animais por composto, totalizando 20 animais para a execução do projeto.

#### **4.3.3. Ambientação e condições experimentais**

Os animais foram mantidos no Biotério Central do CCBS/UFMS, em gaiolas coletivas de polipropileno (número máximo de 5 animais por gaiola; dimensões: 41 x 34 x 18 cm). O referido setor dispõe de salas com condições apropriadas para a experimentação com esta linhagem de animais, tais como temperatura controlada de  $23 \pm 2$  °C e ciclo de 12h claro/escuro (luzes acesas às 06:00 h). Os animais foram mantidos em boas condições de higiene e com acesso livre à água e ração padrão.

#### **4.3.4. Dissecção das estruturas encefálicas**

Os animais foram anestesiados com isoflurano e, após a toracotomia, 8 mL de sangue total foi coletado por punção do plexo de artérias hepáticas. Após a coleta, foi realizada a cisão da artéria aorta para a certificação da morte do animal.

Após a coleta e morte dos animais, os ratos foram decapitados para a extração do encéfalo. Este foi cuidadosamente removido colocado sobre uma placa de Petri coberta com papel filtro umedecido em tampão Tris HCl 10 mM [pH 7,2]. O encéfalo foi lavado com tampão para minimizar a contaminação pela AChE sanguínea.

Em seguida as estruturas encefálicas foram dissecadas em cerebelo, hipocampo, estriado e córtex cerebral que foram reservadas em tubos de ensaio com tampão Tris HCl 10 mM [pH 7,2] gelado, na proporção (1:10, massa:volume). Em seguida, foram homogeneizadas em Potter de vidro. Após a homogeneização, as estruturas foram centrifugadas a 1000 g (2500 rpm) por 15 min.

O sobrenadante foi separado em microtubos e congelado imediatamente para ser usado no experimento de quantificação e inibição da AChE.

#### **4.3.5. Quantificação da atividade e inibição da AChE**

Os sobrenadantes dos homogenatos das regiões encefálicas foram utilizados para o ensaio enzimático da atividade da AChE, determinada espectrofotometricamente através do método de Ellman (ELLMAN, G L.

COURTNEY, 1961), com modificações recentemente descritas por Dingova (DINGOVA et al., 2014).

A análise da atividade enzimática foi realizada em placas de 96 poços. Procedeu-se à análise da atividade enzimática, através da execução do seguinte procedimento experimental: misturou-se em cada poço da placa, 150 µl de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH= 7,0), 50 µl de água destilada, 30 µL de solução contendo o composto analisado, 20 µl de homogenato e 20 µL de Iso-OMPA (inibidor da BChEi), foi deixado pré-incubando por 30 min. Após isso foi adicionado 30 µl de acetilticolina 10 mM para dar início à reação, no qual foi deixado incubando por 10 min.

Após esse tempo a reação foi parada pela adição de 20 µL de brometo de neostigmina (inibidor da AChEi) 51 mM e para revelação foi adicionado 20 µL de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 8,5 mM. A hidrólise do iodeto de acetilticolina catalisado pela AChE forma o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). Este ânion é formado pela reação do DTNB com as tiocolinas resultantes da hidrólise. No final da reação, a concentração deste ânion pode ser determinada em  $\lambda_{\text{máx}}= 412 \text{ nm}$ , recorrendo a um espectrofotômetro em temperatura ambiente. A atividade da AChE foi expressa em µmol de acetilticolina hidrolisada/hora/miligrama de proteína.

O efeito dos cloridratos sobre a atividade da AChE das diferentes estruturas encefálicas foi investigado nas concentrações de 0,01, 0,1, 1,0, 10, 100 e 1000 µM. Em caso do composto testado apresentar atividade anticolinesterásica o valor de  $IC_{50}$  foi determinado, que representa a concentração do composto necessária para inibir 50 % da atividade da AChE em cada região encefálica analisada.

#### **4.3.6. Quantificação do conteúdo proteico**

O conteúdo proteico das amostras foi determinado de acordo com o método descrito por Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina bovina sérica como padrão. O conteúdo proteico de cada estrutura encefálica foi mantido em uma faixa determinada pela linearidade de concentração das regiões cerebrais.

#### **4.4. Análise estatística**

Todas as variáveis foram testadas para normalidade de distribuição e homogeneidade das variâncias. Os resultados obtidos através dos ensaios enzimáticos *in vitro* foram analisados pelo GraphPad Prism através da análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett, ou testes não paramétricos equivalentes. Os resultados foram considerados significativos quando  $P \leq 0,05$ .

#### **4.5. Estudos de *docking molecular***

Os experimentos de *docking molecular* foram realizados com a proteína hAChE (acetilcolinesterase humana) com o código 4BDT no mesmo sítio de interação da huprina W (NACHON et al., 2013). A molécula ligante foi preparada com o programa UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004) e ancorada ao sítio ativo com auxílio do programa Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2010).

## 5. Conclusões

A L-Hipaforina e D-Hipaforina e seus respectivos cloridratos foram sintetizados através de uma metodologia de fácil execução e foram obtidos com bons rendimentos.

Nos ensaios de atividade anticolinesterásica, os primeiros testes realizados não tiveram resultados coerentes. Devido a este fato, foi realizado a otimização da metodologia inicial para melhorar a confiabilidade do experimento.

Os resultados dos testes realizados com L-Hipaforina e D-Hipaforina em sua forma neutra, apresentaram uma inibição seletiva nas diferentes regiões cerebrais. Sendo que a L-Hipaforina apresentou inibição no cerebelo com um  $IC_{50} = 18,63 \pm 0,14 \text{ uM}$  e a D-Hipaforina apresentou inibição no cerebelo e estriado com um  $IC_{50} = 19,12 \pm 0,03 \text{ uM}$  e  $34,60 \pm 0,34 \text{ uM}$  respectivamente. Essa inibição em mais de uma região da D-Hipaforina está relacionada com a forte interação existente entre a carbolina e o resíduo de Ser<sup>203</sup> da enzima.

Mudanças estruturais podem ser propostas para a síntese de novos derivados da hipaforina observando características bioisostéricas mais próximas ao ligante natural e com outras classes de inibidores potentes, como o aumento da cadeia carbônica entre os grupos acetato e amônio, a inserção de grupos como o carbamato e a adição de halogêneos no anel indólico da hipaforina.

## Referências

- ANAND, R.; GILL, K. D.; MAHDI, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 27–50, 2014.
- ARPHA, K. et al. Astradolic Acids A – D: New Lanostane Triterpenes from Edible Mushroom *Astraeus odoratus* and Their Anti- Mycobacterium tuberculosis H 37 Ra and Cytotoxic Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9834–9841, 2012.
- BALBANI, A. P. S.; SILVA, D. H. S.; MONTOVANI, J. C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 19, n. 4, p. 461–73, 2009.
- BEL-KASSAOUI, H., LAMNAOUER, D., JOSSANG, A., ABDENNEBI, E.H., CHARROUF, Z., BODO, B. Role of hypaphorine in the toxicity of *Astragalus lusitanicus*. **Natural product research**, v. 22, n. 5, p. 453–457, 2008.
- BERSON, A. et al. Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. **Brain Res.**, v. 131, p. 109–119, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. LEI N. 11.794 DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. REGULAMENTA O INCISO VII DO §1º DO ART. 225 DA CONSTITUIÇÃO FEDERAL, ESTABELECENDO PROCEDIMENTOS PARA O USO CIENTÍFICO DE ANIMAIS. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. **Brasília, Distrito Federal**, v. 8 de out., 2008.
- BURLÁ, C. et al. Panorama prospectivo das demências no Brasil: um enfoque demográfico. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 10, p. 2949–2956, 2013.
- CALDWELL, J. Importance of stereospecific bioanalytical monitoring in drug development. **Journal of Chromatography A**, v. 719, p. 3–13, 1996.
- CHAND, K. et al. Major alkaloidal constituent from *Impatiens niamniensis*

seeds as antihyperglycemic agent. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 9, p. 1505–1508, 2011.

CHARY, V. N. et al. Characterization of amino acid-derived betaines by electrospray ionization tandem mass spectrometry. n. November 2011, p. 79–88, 2012.

CHEN, W.; LIAO, T.-H. 2-Nitro-5-Thiosulfobenzoic Acid as a Novel Inhibitor Specific for Deoxyribonuclease I. **Protein Journal**, v. 27, p. 240–246, 2008.

CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E I. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBPA). **Brasília, Distrito Federal**, p. 1–50, 2013.

CORTES, N. et al. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 222–228, 2015.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The Ascent of mouse: Advances in modelling human depression and anxiety. **Nature Reviews**, v. 4, n. September, p. 775–790, 2005.

DAS, A. et al. Nature of stress : Differential effects on brain acetylcholinesterase activity and memory in rats. **Life Sciences**, v. 77, p. 2299–2311, 2005.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sciences**, v. 68, n. 6041, p. 1545–1555, 2001.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; T, C. N. Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 81, p. 89–99, 2005.

DAS, A et al. Immobilization stress-induced changes in brain acetylcholinesterase activity and cognitive function in mice. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 42, n. 3, p. 213–217, 2000.

DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. **Section Title: Toxicology**, v. 20, n. 3, p. 407–428, 2009.

DEREK, H. R. B. et al. Phenol Oxidation and Biosynthesis. Part XX11.I The Alkaloids of *Erythrina lysistemon*, *E. ab yssinica*, *E. poeppigiana*, *E. fusca*, and *E. litho- sperma*: the Structure of Erythratidine. **Jpurnal Chemical Society**, p. 874–880, 1973.

DINGOVA, D. et al. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. **Analytical Biochemistry**, v. 462, p. 67–75, 2014.

ELLMAN, G L. COURTNEY, K. D. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

ENZ, A. et al. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. In: **Progress in Brain Research**. [s.l: s.n.]. p. 431–438.

GARCÍA-AYLLÓN, M. S. et al. Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer ' s disease : cross-talk with P-tau and  $\beta$  -amyloid. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, n. September, p. 1–9, 2011.

GEORGE-HYSLOP, P. H. S. Alzheimer ' s. **Scientific American**, p. 77–83, 2000.

GORDON, C. S. et al. Molecular Forms of Acetylcholinesterase in Subcortical Areas of Normal and Alzheimer Disease Brain. **Biol Psychiatry**, v. 27, p. 573–580, 1990.

GOTTWALD, M. D.; ROZANSKI, R. I. Rivastigmine, a brain-region selective acetylcholinesterase inhibitor for treating Alzheimer's disease: review and current status. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 8, n. 10, p. 1673–1682, 1999.

HAN, D. Q. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Quality evaluation of *Polygonum multiflorum* in China based on HPLC analysis of

- hydrophilic bioactive compounds and chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, p. 223–230, 2013.
- HE, M. et al. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. **RSC Advances**, v. 5, n. 21, p. 16562–16574, 2015.
- IRANSHAHI, M. et al. Cytotoxic evaluation of alkaloids and isoflavonoids from the Australian tree erythrina vespertilio. **Planta Medica**, v. 78, n. 7, p. 730–736, 2012.
- ITURRIAGA-VASQUEZ, P. et al. Molecular Determinants for Competitive Inhibition of  $\alpha 4\beta 2$  Nicotinic Acetylcholine Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 78, n. 3, p. 366–375, 2010.
- JUNIOR, C. V. et al. Produtos Naturais como Candidatos a Farmacos Úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 655–660, 2004.
- KASHEVEROV, I. E. et al. 6-Bromohypaphorine from Marine Nudibranch Mollusk *Hermisenda crassicornis* is an Agonist of Human  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor. **marine drugs**, v. 13, p. 1255–1266, 2015.
- KASPRZYK-HORDERN, B. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. **Chemical Society reviews**, v. 39, p. 4466–4503, 2010.
- KELLER, B. O. et al. Hypaphorine is present in human milk in association with consumption of legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 31, p. 7654–7660, 2013.
- KIA, Y. et al. Synthesis and discovery of novel piperidone-grafted mono- and bis-spirooxindole-hexahydropyrrolizines as potent cholinesterase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1696–1707, 2013.
- KRSTI, D. Z. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors : Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.
- KUMAR, A.; SINGH, A.; EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 195–203, 2015.

- LUNKES, G.; ABREU, W. DE; MARCELO, G. Efeito do extrato da casca de *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 34, n. 3, p. 803–807, 2004.
- MASSOULI, J. et al. Acetylcholinesterase : C-terminal domains , molecular forms and functional localization. **Journal Physiology**, v. 92, p. 183–190, 1998.
- MASSOULIE, J. et al. The polymorphism of acetylcholinesterase : post-translational processing , quaternary associations and localization. **Chemico-Biological Interactions**, v. 120, p. 29–42, 1999.
- MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature Publishing Group**, v. 430, p. 631–640, 2004.
- MENEGUZ, A.; BISSO, G. M.; MICHALEK, H. Age-related changes in acetylcholinesterase and its molecular forms in various brain areas of rats. **Neurochemical Research**, v. 17, n. 8, p. 785–790, 1992.
- MOHAMMED, A. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Stereospecific cholinesterase inhibition by O , S -diethylphenylphosphonothioate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3053–3058, 2017.
- MOLLICA, A. et al. Synthesis and Bioactivity of Secondary Metabolites from Marine Sponges Containing Dibrominated Indolic Systems. **Molecules**, v. 17, p. 6083–6099, 2012.
- MULLER, F.; DUMEZ, Y.; MASSOULIE, J. Molecular forms and solubility of acetylcholinesterase during the embryonic development of rat and human brain. **Brain Research**, v. 331, n. 0006–8993 (Print), p. 295–302, 1985.
- NACHON, F. et al. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. **The Biochemical journal**, v. 453, n. 3, p. 393–399, 2013.
- NAIR, V. P.; HUNTER, J. M.; CHB, M. B. Anticholinesterases and anticholinergic drugs. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 4, n. 5, p. 164–168, 2004.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over

the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461–477, 2007.

NUNES-TAVARES, N. et al. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* ( L .) by tricyclic antidepressants. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 1071–1079, 2002.

OZAWA, M. et al. Hypaphorine, an indole alkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 14, p. 3992–3994, 2008.

PETRONILHOA, E. D. C.; PINTOB, A. C.; VILLARA, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. **Ciência e Tecnologia**, p. 3–14, 2011.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PRINCE, M. et al. Alzheimer's Disease International. Dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors. **Alzheimer's Disease International**, p. 1–104, 2014.

PRINCE, M. et al. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. **Alzheimer's Disease International**, p. 84, 2015.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States. **Chemical Reviews**, v. 87, p. 988–979, 1987.

RAKONCZAY, Z. POTENCIES AND SELECTIVITIES OF INHIBITORS OF ACETYLCHOLINESTERASE AND ITS MOLECULAR FORMS IN NORMAL AND ALZHEIMER ' S DISEASE BRAIN \*. **Acta Biologica Hungarica**, v. 54, n. 2, p. 183–189, 2003.

RAVERTY, B. W. D.; THORNSON, R. H.; KING, T. J. Metabolites from the Sponge *Pachymatisma johnstoni*; L-6-Bromo- hypaphorine, a New Amino-acid (and its Crystal Structure). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 1204–1211, 1976.

ROCHA, J. B. T.; EMANUELLI, T.; PEREIRA, M. E. Effects of early

undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 53, n. 3, p. 431–437, 1993.

RUANO, M. J. et al. Changes of acetylcholinesterase activity in brain areas and liver of sucrose- and ethanol-fed rats. **Neurochemical research**, v. 25, n. 4, p. 461–70, 2000.

SANTOS, W. P. et al. In vitro and ex vivo anticholinesterase activities of Erythrina velutina leaf extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 919–924, 2012.

SILVA, R. R.; TOZZI, A. M. G. D. A. Papilionoideae (Leguminosae) do Planalto Residual do Urucum, oeste do Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 39, n. 1, p. 39–83, 2012.

SILVA, T. et al. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, v. 15, n. 1, p. 116–145, 2014.

SMITH, S. W. Chiral toxicology: It's the same thing only different. **Toxicological Sciences**, v. 110, n. 1, p. 4–30, 2009.

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

SUN, L. et al. Combined administration of anisodamine and neostigmine produces anti-shock effects : involvement of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 6, p. 761–766, 2012.

TABARRINI, O. et al. Velnacrine Thiaanalogues as Potential Agents for Treating Alzheimer ' s Disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 2921–2928, 2001.

TAYEB, H. O. et al. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 134, n. 1, p. 8–25, 2012.

TAYLOR, P. The Cholinesterases. **Annual reviews Pharmacology Toxicology**, v. 266, n. 7, p. 4025–4028, 1994.

TEIXEIRA, J. B. et al. Mortality from Alzheimer's disease in Brazil, 2000-2009. **Cad Saude Publica**, v. 31, n. 4, p. 850–860, 2015.

TROTT, O.; OLSON, A. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

VALUSKOVA, P. et al. Brain region-specific effects of immobilization stress on cholinesterases in mice. **Stress**, v. 0, n. 0, p. 000, 2016.

VASILOPOULOU, C. G. et al. Physiology & Behavior Effect of adult onset hypothyroidism on behavioral parameters and acetylcholinesterase isoforms activity in specific brain regions of male mice. **Physiology & Behavior**, v. 164, p. 284–291, 2016.

YAMAZAKI, D. A. S. et al. Cholinesterases Inhibition by Novel cis- and trans-3-Arylamino-cyclohexyl N,N-Dimethylcarbamates: Biological Evaluation and Molecular Modeling. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 9, p. 1616–1625, 2016.

YU, Q. S. et al. Long-acting anticholinesterases for myasthenia gravis: Synthesis and activities of quaternary phenylcarbamates of neostigmine, pyridostigmine and physostigmine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 13, p. 4687–4693, 2010.

ZHANG, H. Y.; YAN, H.; TANG, X. C. Non-cholinergic effects of huperzine A: Beyond inhibition of acetylcholinesterase. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, n. 2, p. 173–183, 2008.

## Anexo



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



### C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Síntese da L-hipaforina e D-hipaforina e avaliação da atividade inibitória sobre acetilcolinesterase", registrada com o nº 757/2016, sob a responsabilidade de **Edson dos Anjos dos Santos** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, em reunião de 10/05/2016.

FINALIDADE	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/05/2016 a 10/03/2018
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	64
Peso/Idade	150 - 200g
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central/CCBS/UFMS

*Teixeira*  
**Maria Araújo Teixeira**  
 Coordenadora da CEUA/UFMS  
 Campo Grande, 11 de maio de 2016.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA  
<http://www.propp.ufms.br/ceua>  
[ceua.2000@gmail.com](mailto:ceua.2000@gmail.com)  
 fone (67) 3345-7186