

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Wellerson de Oliveira Carneiro Junior

**EFEITO NEUROPROTETOR DE *Hancornia speciosa* E CONSTITUINTES EM
MODELOS *in vitro* E *in vivo* DE TOXICIDADE INDUZIDA POR PEPTÍDEO
AMILOIDE**

Belo Horizonte
2024

Wellerson de Oliveira Carneiro Junior

**EFEITO NEUROPROTETOR DE *Hancornia speciosa* E CONSTITUINTES EM
MODELOS *in vitro* E *in vivo* DE TOXICIDADE INDUZIDA POR PEPTÍDEO
AMILOIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga, FAFAR, UFMG

Coorientadores: Prof^ª. Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana, FAFAR, UFMG

Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, ICB, UFMG

Colaborador: Prof. Rodrigo Maia de Pádua, FAFAR, UFMG

Belo Horizonte

2024

C289e Carneiro Junior, Wellerson de Oliveira.
Efeito neuroprotetor de *Hancornia speciosa* e constituintes em modelos *in vitro* e *in vivo* de toxicidade induzida por peptídeo amiloide [recurso eletrônico] / Wellerson de Oliveira Carneiro Junior. – 2024.
1 recurso eletrônico (168 f. : il.) : pdf

Orientador: Fernão Castro Braga.
Coorientadora: Priscilla Rodrigues Valadares Campana.
Coorientador: Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira.
Colaborador: Rodrigo Maia de Pádua.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Doença de Alzheimer – Teses. 2. Apocinaceas – Teses. 3. Neuroproteção – Teses. 4. Validação de método – Teses. 5. Produtos naturais – Teses. I. Braga, Fernão Castro. II. Campana, Priscilla Rodrigues Valadares. III. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. IV. Pádua, Rodrigo Maia de. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. VI. Título.

CDD: 615.321



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

“EFEITO NEUROPROTETOR DE HANCORNIA SPECIOSA E CONSTITUINTES EM MODELOS IN VITRO E IN VIVO DE TOXICIDADE INDUZIDA POR PEPTÍDEO AMILOIDE”

WELLERSON DE OLIVEIRA CARNEIRO JÚNIOR

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof. Fernão Castro Braga - Orientador (UFMG)

Profa. Priscilla Rodrigues Valadares Campana - Coorientadora (UFMG)

Profa. Danielle da Glória de Souza (UFMG)

Profa. Isabela da Costa Cesar (UFMG)

Prof. Fernando Batista da Costa (USP Ribeirão Preto)

Prof. Mauro Cunha Xavier Pinto (UFG)

Prof. Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira - Coorientador (UFMG)

Belo Horizonte, 13 de agosto de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Batista da Costa, Usuário Externo**, em 13/08/2024, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto, Usuário Externo**, em 13/08/2024, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Rodrigues Valadares Campana, Professora do Magistério Superior**, em 13/08/2024, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

AGRADECIMENTOS

À minha mãe: por ser o pilar que me sustenta!

Agradeço a minha família: pelo amor e apoio incondicionais, por me incentivarem a lutar pelos meus objetivos, e por sempre acreditarem que sou capaz de realizá-los. Amo vocês!

Ao meu orientador Professor Fernão Braga, pela inestimável orientação, confiança, conselhos, paciência, compreensão e ensinamentos.

À minha co-orientadora Professora Priscilla Campana, pela dedicação, apoio e incentivo durante toda a realização desse trabalho, e por ser um exemplo de competência, sabedoria, eficiência, carisma, animação e bom humor.

Agradeço ao meu também co-orientador Professor Antônio Oliveira, primeiro por ter me acolhido como seu aluno de iniciação científica no laboratório de Neurofarmacologia, e, segundo, por todo apoio e auxílio na realização desta tese. Meu exemplo de pesquisador e de ser humano.

À Luciene e à Bárbara pelo apoio técnico, pela amizade, pelas conversas, conselhos e pelo apoio. Admiro muito vocês.

À Juliana Raposo pelo apoio técnico, pelos conselhos, pela amizade. Te admiro muito.

Ao professor Rodrigo Maia pelo apoio, paciência, bom humor e por ter me trazido ao Laboratório de Fitoquímica.

À Maria Luiza pela ajuda na realização deste trabalho, pelas ótimas conversas e desabafos, pela amizade e pelas risadas de sempre.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica, pelas valiosas contribuições, pela amizade e por proporcionarem momentos tão agradáveis.

Aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia, pelas contribuições e pela convivência bastante agradável.

À todos os funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG, que tanto contribuíram para minha formação acadêmica, direta ou indiretamente.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

À mulher que me ensinou a ser homem!

*Olhei no espelho, Ícaro me encarou
Em homenagem àquele que foi sem poder ser*

RESUMO

O efeito protetor de *Hancornia speciosa* contra o déficit cognitivo foi previamente demonstrado em modelo murino de Doença de Alzheimer (DA). O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial neuroprotetor de *H. speciosa* e de seus constituintes em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* relacionados à DA. A composição química do extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HsE) foi investigada por CLUE-DAD-ESI-EM/EM, sendo identificados rutina, ácido clorogênico, bornesitol e proantocianidinas. Em seguida, HsE foi fracionado em coluna de Sephadex LH20, resultando em uma fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3). Procedeu-se à caracterização estrutural das proantocianidinas presentes em HsE e HsFr3 por CLUE-DAD-ESI-EM/EM, após reação de tiólise. Foram identificados quatro isômeros de procianidinas diméricas do tipo B C-glicosiladas e dois isômeros de procianidinas triméricas do tipo B C-glicosiladas. Subsequentemente, realizou-se a padronização de um método de CLUE-ESI-EM para a quantificação dos marcadores químicos identificados (rutina, ácido clorogênico, bornesitol e procianidinas), utilizando monitoramento de reações múltiplas (MRM). O método validado apresentou linearidade, precisão, exatidão e robustez adequados. A quantificação indicou teores (m/m) de $27,2 \pm 0,2\%$ de rutina, $5,6 \pm 0,7\%$ de ácido clorogênico, $6,3 \pm 0,2\%$ de bornesitol e $5,8 \pm 0,1$ de procianidinas em HsE, e $1,2 \pm 0,1\%$ de bornesitol e $95,8 \pm 0,1\%$ de procianidinas em HsFr3. O efeito potencial de HsE (10, 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$), HsFr3 (10 e 30 $\mu\text{g/mL}$) e bornesitol (0,1, 1 e 3 μM) sobre os fatores pró-inflamatórios foi avaliado em células THP-1 estimuladas com LPS. Observou-se redução da excreção de IL-1 β e TNF em todas as concentrações ensaiadas das três amostras, enquanto apenas a maior concentração de HsE reduziu a excreção de IL-6. Estes resultados demonstram a potencial atividade anti-inflamatória de HsE, HsFR e bornesitol a nível sistêmico. Em seguida, foi padronizado um modelo *in vitro* para investigar os efeitos de HsE e derivados em cultura de células neuronais SH-SY5Y estimuladas com peptídeo amiloide (A β_{1-42}). A concentração de 10 μM de A β_{1-42} foi a mais adequada para os ensaios, promovendo 55% de morte celular. O tratamento das células SH-SY5Y com HsE (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$), HsFr3 (1, 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$) e bornesitol (0,1, 1,0 e 3,0 μM) reverteu a citotoxicidade induzida pela A β_{1-42} em todas as concentrações avaliadas, retornando aos níveis basais. Esses achados demonstram o potencial de *H. speciosa* e derivados em reverter fatores danosos que podem levar à neurodegeneração. O efeito neuroprotetor do extrato de *H. speciosa* foi então avaliado em camundongos C57Bl/6 submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção intra-hipocampal de 400 pmol de A β_{1-42} . Os animais foram tratados por 7 dias com administração oral de HsE (10, 30 ou 100 mg/kg/dia) e, após eutanásia, os hipocampus foram removidos à fresco para quantificação de citocinas por ELISA. O tratamento promoveu redução nas concentrações de IL-1 β , TNF e IL-6 em todas as doses administradas, observando-se 80% de redução na maior dose. Adicionalmente, animais submetidos à injeção supracitada de A β_{1-42} foram tratados por via oral com HsE (30 ou 100 mg/kg/dia) ou bornesitol (10 mg/kg/dia). Ao final do protocolo, os animais foram perfundidos e os hipocampus conservados com paraformaldeído a 4% e congelados para imunomarcagem de micróglias. Observou-se redução da microgliose induzida pela A β_{1-42} nos animais tratados com HsE (100 mg/kg/dia) ou com bornesitol, em todas as regiões do hipocampo analisadas (CA1, CA3 e GD). Em CA1 e GD observou-se um retorno da microgliose próxima ao basal. Em conjunto, nossos resultados demonstram a potencialidade do extrato de *H. speciosa*, do bornesitol e das procianidinas constituintes em reduzir fatores associados ao desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas, como a DA. Esta atividade pode estar associada a efeitos sistêmicos, como redução de mediadores pró-inflamatórios e produção de ROS, assim como a efeitos centrais, como redução da neurotoxicidade induzida pelo peptídeo β -amiloide, agindo sobre a inflamação a nível central.

Palavras-chave: neurodegeneração; *Hancornia speciosa*; neuroproteção; neuroinflamação; SH-SY5Y; procianidinas; validação de método analítico.

ABSTRACT

The protective effect of *Hancornia speciosa* against cognitive deficits has been previously demonstrated in a murine model of Alzheimer's Disease (AD). The present work aimed to investigate the neuroprotective potential of *H. speciosa* and its constituents in *in vitro* and *in vivo* experimental models related to AD. The chemical composition of the hydroacetone extract from *H. speciosa* leaves (HsE) was investigated by UHPLC-DAD-ESI-MS/MS, leading to the identification of rutin, chlorogenic acid, bornesitol, and proanthocyanidins as constituents. Subsequently, HsE was fractionated over a Sephadex LH20 column, affording the proanthocyanidin-rich fraction HsFr3. The structural characterization of the proanthocyanidins found in HsE and HsFr3 was carried out by UHPLC-DAD-ESI-MS/MS after thiolysis reaction. Four isomers of C-glycosylated dimeric B-type procyanidins of the and two isomers of C-glycosylated trimeric B-type procyanidins were identified. Next, a UHPLC-ESI-MS method was developed and validated for the quantification of the identified chemical markers (rutin, chlorogenic acid, bornesitol, and procyanidins) using multiple reaction monitoring (MRM). The validated method showed appropriate linearity, precision, accuracy, and robustness. The quantification indicated contents (w/w) of $27.2 \pm 0.2\%$ rutin, $5.6 \pm 0.7\%$ chlorogenic acid, $6.3 \pm 0.2\%$ bornesitol, and $5.8 \pm 0.1\%$ procyanidins in HsE, and $1.2 \pm 0.1\%$ bornesitol and $95.8 \pm 0.1\%$ procyanidins in HsFr3. The potential effect of HsE (10, 30, and 90 $\mu\text{g/mL}$), HsFr3 (10 and 30 $\mu\text{g/mL}$), and bornesitol (1, 10, and 30 μM) on pro-inflammatory factors was evaluated in THP-1 cells stimulated with LPS. A reduction in IL-1 β and TNF secretion was observed after treatment with the three samples, at all tested concentrations, while only the highest concentration of HsE reduced IL-6 secretion. These results demonstrate the potential anti-inflammatory activity of HsE, HsFR, and bornesitol at the systemic level. Then, an *in vitro* model was standardized to investigate the effects of HsE and derivatives in SH-SY5Y neuronal cell culture stimulated with amyloid peptide (A β_{1-42}). The concentration of 10 μM A β_{1-42} was the most suitable for the assays, promoting 55% of cell death. Treatment of SH-SY5Y cells with HsE (10, 30, and 100 $\mu\text{g/mL}$), HsFr3 (0.1, 1, and 3 $\mu\text{g/mL}$), and bornesitol (0.1, 1.0, and 3.0 μM) reversed A β_{1-42} -induced cytotoxicity at all evaluated concentrations, returning to baseline levels. These findings demonstrate the potential of *H. speciosa* and its derivatives in reversing harmful factors that can lead to neurodegeneration. The neuroprotective effect of the *H. speciosa* extract was then evaluated in C57Bl/6 mice subjected to stereotaxic surgery for intra-hippocampal injection of 400 pmol A β_{1-42} . The animals were treated for 7 days by oral route with HsE (10, 30, or 100 mg/kg/day) and, after euthanasia, the hippocampi were freshly removed for cytokine quantification by ELISA. The treatment promoted a reduction in IL-1 β , TNF, and IL-6 concentrations at all administered doses, with an 80% reduction observed at the highest dose. Additionally, the animals injected with A β_{1-42} as described above were treated orally with HsE (30 or 100 mg/kg/day) or bornesitol (10 mg/kg/day). At the end of the protocol, the animals were perfused and the hippocampi preserved with 4% paraformaldehyde and frozen for microglia immunostaining. A reduction in A β_{1-42} -induced microgliosis was observed in the animals treated with HsE (100 mg/kg/day) or bornesitol in all analyzed hippocampal regions (CA1, CA3, and DG). In CA1 and DG, microgliosis returned to near baseline levels. Together, our results demonstrate the potential of the *H. speciosa* extract, bornesitol, and the constituent procyanidins in reducing factors associated with the development and progression of neurodegenerative diseases such as AD. This activity may be associated with systemic effects, such as the reduction of pro-inflammatory mediators and ROS production, as well as central effects, such as the reduction of β -amyloid peptide-induced neurotoxicity, acting on inflammation at the central level.

Keywords: neurodegeneration; *Hancornia speciosa*; SH-SY5Y; neuroprotection; neuroinflammation; procyanidins; analytical method validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Representação esquemática do processamento da APP durante a cascata amiloidogênica. APP gera produtos não amiloidogênicos quando clivada por α -secretase. A clivagem sequencial por β -secretase (BACE-1) e γ -secretase leva predominantemente à formação de fragmentos de peptídeo A β 1-40, além da formação de peptídeos A β 1-42 (5-10%). Pode ocorrer um equilíbrio entre oligômeros e fibrilas, no qual as fibrilas geram oligômeros, levando a efeitos deletérios. O processo de formação do peptídeo amiloide ocorre no complexo lipídico, região da bicamada lipídica que contém marcadores distintos, rica em colesterol, esfingolipídeos e glicolipídeos (adaptado de Reiss et al., 2018)	22
Figura 3.2: Ilustração representando a falha neuronal mediada por oligômeros A β . Oligômeros A β , por meio de processos como peroxidação lipídica, ativa o receptor NMDA e a formação de poros na membrana. Ambos os processos levam ao aumento do influxo de cálcio do meio extracelular para o espaço intracelular do neurônio. O aumento da concentração de Ca ²⁺ intraneuronal leva à depleção dos estoques de neurotransmissores vesiculares, eventualmente causando disfunção neuronal (adaptado de Reiss et al., 2018).	23
Figura 3.3: Fruto, flores e folhas de <i>H. speciosa</i> (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO in <i>Flora Brasil 2020</i>	38
Figura 4.1: Posição anatômica da junção de suturas bregma. (adaptado de ALLAHYARI et al., 2015)	69
Figura 4.2: Região da injeção intra-hipocampal, segundo o atlas Paxinos. Fonte: The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Paxinos e Franklin, 2001)	70
Esquema 1: protocolo 1 de cirurgia estereotáxica, tratamento com HsE (10, 30 ou 100 mg/kg) ou veículo e remoção dos encéfalos à fresco	71
Esquema 2: protocolo 2 de cirurgia estereotáxica, tratamento com HsE (30 ou 100) mg/kg, bornesitol (10 mg/kg) ou veículo e remoção dos encéfalos pós fixação e conservação com PFA 4%	72
Figura 5.1 Cromatograma obtido por CLUE-DAD para o extrato acetona/água (70:30) de folhas <i>H. speciosa</i> registrado no <i>max plot</i> . a) extrato HsE; b) extrato HFP1; c) espectros no UV dos picos identificados nos cromatogramas. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7.2 . Tempos de retenção dos picos 1 (1,23 min.); 2 (2,46 min.); 3 (2,75 min.); 4 (2,95 min.); 5 (4,26 min.); e 6 (6,02 min)	76
Figura 5.2: Cromatograma obtido por CLUE-ESI-EM para o extrato em acetona/água (70:30) de folhas <i>H. speciosa</i> , no modo de ionização negativo (ESI ⁻). a) extrato HsE; b) extrato HFP1 ; c) espectro de massa no modo ESI ⁻ para os picos identificados nos cromatogramas Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7.2 . Tempos de retenção: 1 (1,17 min); 2 (2,35 min); 3 (2,60 min); 4 (2,81 min); 5 (4,14 min); e 6 (6,33 min)	78
Figura 5.3: Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-EM para frações enriquecidas em proantocianidinas obtidas no presente trabalho (HsFr3) (a) e no trabalho anterior (TS2C3) (b) registrado no modo de ionização negativo (ESI ⁻). c) Espectros de massas dos compostos correspondentes aos picos 1 (tr = 1,69 min.); 2 (tr = 4,24 min.); 3 (tr = 4,33 min.); 5 (tr = 4,49 min.); 6 (tr = 4,70 min.); 7 (tr = 4,85 min.) e 4 (tr = 4,39 min.). Condições cromatográficas: vide Material e Métodos, item 4.7.2	81
Figura 5.4: Espectro de massas para os íons produto de 739 <i>m/z</i> [M-H] ⁻ dos picos 1 (a, Tr = 1,69 min), 2 (b, Tr = 4,24min); 3 (c, tr = 4,33 min.) e 5 (d, Tr = 4,49 min) e e para os	

íons produto de m/z 1027 dos picos 6 (e, $t_r = 4,70$) e 7 (f, $T_r = 4,85$ min), vide cromatograma da figura 5.3	84
Figura 5.5. Proposta de vias de fragmentação para as procianidinas caracterizadas na fração rica em proantocianidinas (HsFr3) mostrando as clivagens via (a) quinona metídeo (QM), (b) fissão do anel heterocíclico (HRF) e (c) retro-Diels-Alder (RDA), observados no modo negativo de ionização, aqui representados para a procianidina com massa molecular de 740 Da. Os íons contendo a aglicona são denotados como k,lX , onde os sobrescritos k e l representam as clivagens internas no anel do resíduo de carboidrato	86
Figura 5.6 Cromatogramas obtidos por CLUE-DAD para os produtos da tiólise de TS2C3 em diferentes temperaturas (a) 40, (b) 45 e (c) 50 °C. Condições experimentais vide Parte Experimental, item 4.8.	89
Figura 5.7. Análise por CLUE-DAD-ESI-EM dos produtos da degradação por tiólise de TS2C3. (a) Chromatograma registrado por DAD; (b) cromatograma de contagem total de íons (TIC) obtido por EM; (c) espectro de EM obtido no modo negativo para a ionização do pico 3, demonstrando as estruturas químicas dos principais íons observados. Os picos identificados em (a) e (b) foram: 1, bornesitol; 2, rutina; 3, produtos de tiólise; 4, resíduos de reação. Condições cromatográficas e espectrais vide Parte Experimental, itens 4.7 e 4.9, respectivamente	91
Figura 5.8. Análise por CLUE-DAD-ESI-EM dos produtos da degradação por tiólise de HsE. (a) Chromatograma registrado por DAD; (b) espectro de massas obtido no modo negativo para a ionização do pico 3, demonstrando as estruturas químicas dos principais íons observados. Os picos identificados em (a) foram: 2, ácido clorogênico; 3, rutina; 4, produtos de tiólise; 5, resíduos de reação. Condições cromatográficas e espectrais vide Parte Experimental, itens 4.7 e 4.9, respectivamente.	94
Figura 5.9: Reação de formação do clorogenato de metila nas condições reacionais empregadas para a tiólise de proantocianidinas	95
Figura 5.10: Propostas de fragmentação da rutina para as transições m/z 609 $\rightarrow$ 300 Da (A) e m/z 609 $\rightarrow$ 179 Da (B).	98
Figura 5.11: Propostas de fragmentação do ácido clorogênico para as transições m/z 353 $\rightarrow$ 191 Da (A) e m/z 353 $\rightarrow$ 85 Da (B).	99
Figura 5.12: Propostas de fragmentação do bornesitol para as transições m/z 195 $\rightarrow$ 109 Da (A) e m/z 195 $\rightarrow$ 81 Da (B)	99
Figura 5.13: Propostas de fragmentação do bornesitol para as transições m/z 195 $\rightarrow$ 161 Da (A) e m/z 195 $\rightarrow$ 175 Da (B), proposto por Gomes <i>et al.</i> , 2018.	100
Figura 5.14: Propostas de fragmentação da procianidina B2 para as transições m/z 577 $\rightarrow$ 289 Da (A) e m/z 577 $\rightarrow$ 425 Da (B).	101
Figura 5.15: Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-EM/EM no modo MRM para as SQR rutina (a e b), procianidina B2 (c e d), bornesitol (e e f) e ácido clorogênico (g e h), nas transições de quantificação e confirmação, respectivamente	102
Figura 5.16: Curvas analíticas médias construídas para a quantificação de rutina (a), bornesitol (b), procianidina B2 (c) e ácido clorogênico (d), obtidas por UPLC-ESI-MS/MS, no modo MRM	104

Figura 5.17: Dispersão dos resíduos obtidos nas curvas analíticas médias de rutina (a), bornesitol (b), procianidina B2 (c) e ácido clorogênico (d)	105
Figura 5.18: Avaliação da robustez do método analítico para quantificação de bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidina B2 por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM. Os resultados representam a média $\pm$ DP de três experimentos. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$, em relação à condição nominal.	110
Figura 5.19: Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-EM/EM no modo MRM para as modificações realizadas na análise das procianidinas do tipo B C-glicosiladas caracterizadas no HsE, conforme descrito no item 5.3 e 5.4.	112
Figura 5.20: Teores dos marcadores químicos bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidina B C-glicosilada no extrato hidroacetônico de folhas de <i>H. speciosa</i> (HsE) e na fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) derivada deste. PCB2 = procianidinas diméricas do tipo B C-glicosiladas. Em HsFr3, o ácido clorogênico e a rutina foram representados iguais a zero (abaixo do limite de detecção).	110
Figura 5.21 Viabilidade de células SH-SY5Y estimuladas com diferentes concentrações de peptídeo β -amiloide 1-42. Resultados mostrados como média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$, em 3 replicas biológicas com 3 replicatas cada replicatas (n = 9).	115
Figura 5.22 Efeito do extrato em acetona/água (7:3) (HsE) de folhas de <i>H. speciosa</i> , da derivada rica em proantocianidinas (HsFr3) e do bornesitol sobre a viabilidade das células SH-SY5Y. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukeys. Os dados representam a média $\pm$ DP da porcentagem de viabilidade celular, representado como média de cada replicata (n = 24). Veículo = meio contendo 0,1% de DMSO; bornesitol na concentração de 30 μ M; extrato hidroacetônico 70% de folhas de <i>H. speciosa</i> (HsE) na concentração de 100 μ g/mL e fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) na concentração de 30 μ g/mL.	116
Figura 5.23 Efeito do extrato hidroacetônico de folhas de <i>H. speciosa</i> (HsE), da fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) e do bornesitol sobre citotoxicidade induzida por $A\beta_{1-42}$ em células SH-SY5Y. As barras representam a média de 3 experimentos $\pm$ desvio padrão da média. A dispersão representa a média de 3 experimentos (n total = 12). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. **** $p > 0,0001$, comparado com o grupo $A\beta$	118
Figura 5.24: Otimização de parâmetros no ensaio de estresse oxidativo em células THP-1 estimuladas com LPS. (a) Tempo de exposição ao LPS (10 μ g/mL); (b) padronização da concentração de DCFH-DA (para 30 minutos de exposição); (c) tempo de pré-tratamento. Em todas as análises as concentrações de LPS e quercetina foram mantidas em 10 μ g/mL e 10 μ M, respectivamente. A otimização do tempo de exposição ao DCFH-DA e do tipo de placa de cultivo celular não são apresentadas. Diferenças significativas com o mock (células não estimuladas com LPS; a e b) e às células estimuladas com LPS (c) com os diferentes grupos experimentais foram avaliadas utilizando-se ANOVA de uma via seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukeys. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Mock = células não estimuladas.	120
Figura 5.25: Efeito do extrato de acetona/água (7:3) (HsE) de folhas de <i>H. speciosa</i> , sua fração derivada rica em proantocianidinas (HsFr3) e bornesitol na viabilidade celular de células THP-1, testadas em diferentes concentrações (HsE a 10, 30 e 100 μ g/mL; HsFr3 a 1, 10 e 30 μ g/mL; bornesitol a 0,1, 1 e 3 μ M). Os dados representam a média $\pm$ DP (n =	122

9 de 3 conjuntos separados de experimentos com 3 repetições cada). A análise estatística foi realizada em relação às células do grupo basal e todos os grupos de tratamento utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey's. Basal = células não estimuladas, Quer = quercetina (10 μ M; controle positivo).

Figura 5.26: Efeito do extrato de acetona/água (7:3) (HsE) de folhas de *H. speciosa*, sua fração derivada rica em proantocianidinas (HsFr3) e bornesitol na produção de espécies reativas em células THP-1 induzidas por LPS, testadas em diferentes concentrações (HsE a 10, 30 e 100 μ g/mL; HsFr3 a 1, 10 e 30 μ g/mL; bornesitol a 0,1, 1 e 3 μ M). Os dados representam a média $\pm$ DP ($n = 9$ de 3 conjuntos separados de experimentos com 3 repetições cada). Diferenças significativas entre células estimuladas por LPS e todos os grupos de tratamento utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey's; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$. Basal = células não estimuladas, Quer = quercetina (10 μ M; controle positivo) e NT = célula não tratada.

123

Figura 5.27 Atividade do extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HsE), fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) e bornesitol sobre (a) a liberação de TNF; (b) IL-1 β e (c) IL-6 em células THP-1 estimuladas com LPS. As barras representam a média de quatro experimentos $\pm$ desvio padrão da média (DP), com $n = 12$. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. **** $p > 0,0001$, comparado com o grupo NT. Basal = células não tratadas e não estimuladas; NT = células estimuladas e tratadas com veículo; Dexam = dexametasona 10 μ M.

127

Figura 5.28: Atividade do extrato hidroacetônico de folhas de *H. Speciosa* (HsE), fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) e bornesitol sobre (a) a liberação de TNF, (b) IL-1 β e (c) IL-6 em células SH-SY5Y estimuladas com A β_{1-42} . As barras representam a média de três experimentos com três replicatas cada $\pm$ desvio padrão da média (DP), com $n = 12$. As médias foram analisadas por Anova de uma via seguida de pós-teste de Tukey. **** $p > 0,0001$, comparado com o grupo NT. NT = células estimuladas e tratadas com veículo; Dexam = dexametasona 10 μ M, Veic. = veículo (meio DMEM F12 + 0,1% DMSO).

130

Figura 5.29: Efeito do extrato em acetona/água (7:3) (HsE) de folhas de *H. speciosa*, da fração derivada rica em proantocianidinas (HsFr3) e do bornesitol na produção de espécies reativas de oxigênio em células SH-SY5Y induzidas por A β_{1-42} , testadas em diferentes concentrações (HsE a 10, 30 e 100 μ g/mL; HsFr3 a 1, 10 e 30 μ g/mL; bornesitol a 0,1, 1 e 3 μ M). Os dados representam a média $\pm$ DP ($n = 9$, correspondentes a 3 replicatas biológicas e 3 réplicas experimentais). Diferenças estatisticamente significativas entre células estimuladas por A β_{1-42} e todos os grupos de tratamento foram demonstradas por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey's; **** $p < 0,0001$. Mock = células não estimuladas, Quer = quercetina (10 μ M; controle positivo) e NT = célula não tratada.

132

Figura 5.30 Efeito do extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HsE) sobre os níveis de (a) IL-1 β ; (b) IL-6 e (c) TNF em modelo murino de DA induzida pela injeção intrahipocampal de A β_{1-42} . As barras representam a média de 8 replicas $\pm$ desvio padrão da média. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni. **** $p < 0,0001$

136

Figura 5.31 Efeito de HsE e bornesitol sobre a ativação de células Iba-1⁺ em fatias de hipocampo de camundongos C57Bl/6 submetidos à estereotaxia para a injeção de A β_{1-42} intrahipocampal. Imagens representativas da imunomarcagem no CA1 (a), GD (b) e CA3 (c) dos grupos PBS + veículo, PBS + HsE 100, A β_{1-42} + veículo, A β_{1-42} + HsE 30, A β_{1-42} + HsE 100 e A β_{1-42} + bornesitol 10. Gráficos apresentando a dispersão e a análise estatística do resultado quantitativo de Iba-1 em CA1 (a), GD (b) e CA3 (c), nos grupos experimentais. Dados apresentados em relação à área de imunomarcagem. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$, ...

141

comparado com o grupo estimulado e não tratado. Dados analisado por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferoni.

Figura 5.32: Imagens representativas do efeito do extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HsE) e do bornesitol sobre a imunomarcção de iba-1 e DAPI, nas regiões (a) CA1, (b) GD e (c) CA3 de hipocampus murinos em modelo de DA induzida pela injeção intra-hipocampal de A β ₁₋₄₂. As amostras foram testadas nas doses de 30 e 100 mg/kg/dia, para HsE, e 10 mg/kg/dia, para o bornesitol, por 7 dias após a cirurgia estereotáxica. **143**

Figura 7.1: Gráficos de intensidade de sinal e resposta captada pelo equipamento durante a otimização dos parâmetros de MRM. Condições experimentais descritas na Parte Experimental, **item 4.10.1.1**. **146**

Figura 7.2: Cromatograma obtido por CLUE-DAD para a amostra branco da reação de degradação por tiólise. Condições experimentais descritas no Idem **item 4.8**. **150**

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 4.1: Fracionamento do extrato em acetona/água (70:30) de <i>H. speciosa</i> em coluna de Sephadex LH20	53
Tabela 4.2: Gradiente de eluição empregado para a obtenção dos perfis cromatográficos por CLUE	54
Quadro 4.1: Concentrações dos marcadores químicos empregadas na construção da curva de calibração do método analítico	58
Tabela 5.1: Dados espectrais obtidos no UV (nm) e por espectrometria de massas (<i>m/z</i> [M-H] ⁻) para os picos majoritários presentes nos extratos hidroacetônicos de <i>H. speciosa</i> . 1 (1,23 min.); 2 (2,46 min.); 3 (2,75 min.); 4 (2,95 min.); 5 (4,26 min.); e 6 (6,02 min)	79
Tabela 5.2 Parâmetros espectrais estabelecidos para o método de monitoramento de reações múltiplas (MRM) para a quantificação dos marcadores químicos. As transições nomeadas de “1” representam a transição de quantificação e as denominadas de “2” representam a transição de confirmação de cada analito	97
Tabela 5.3: Dados da precisão intradia do método para quantificação do bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidina B2 por CLUE-ESI-EM/EM no modo MRM. Vide Parte Experimental, item 4.9.4.6	106
Tabela 5.4: Dados da precisão interdias do método para quantificação do (a) bornesitol, (b) ácido clorogênico, (c) rutina e (d) procianidina B2 por CLUE-ESI-EM/EM no modo MRM. Vide Parte Experimental, item 4.9.4.6	107
Tabela 5.5: Exatidão do método analítico para quantificação de bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidina B2 por CLUE-ESI-EM/EM no modo MRM, determinada a partir da recuperação dos analitos em amostra fortificada.	108

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µm	micrômetro
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
AMPA	(receptor) alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMP _c	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	anteroposterior
APP	proteína precursora de amiloide
Aβ	proteína β-amiloide
Aβ ₁₋₄₂	fragmento de 42 resíduos de aminoácidos da proteína precursora de amiloide
BACE1	beta-secretase 1
BHE	barreira hematoencefálica
BuChE	butirilcolinesterase
C83	fragmento C-terminal ligado à membrana com 83 aminoácidos
C99	fragmento C-terminal ligado à membrana com 99 aminoácidos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLUE-ESI-EM/EM	cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por electrospray
CMC	carboximetilcelulose
COX-2	ciclo-oxigenase isoforma 2
d.i.	diâmetro interno
DA	doença de Alzheimer
DAD	detector de arranjo de diodos
DAMPs	dano associado a estresse
DV	dorsoventral
ECA	enzima conversora de angiotensina
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agência Europeia de Medicamentos)
ESI	ionização por eletrospray
EtOAc	acetato de etila
EtOH	etanol
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i> (Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos da América)
FR	fase reversa
IL-1β	interleucina 1-beta
IL-6	interleucina 6
g	grama
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN-γ	interferon gama

IL-1	interleucina 1
ip	intraperitoneal
kg	quilograma
LL	látero-lateral
<i>m/z</i>	razão massa / carga
MAP	micróglias associadas a patologias
MCC	medo condicionado ao contexto
MeCN	acetonitrila
MEEM	Mini Exame do Estado Mental
MeOH	metanol
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
MS	espectrometria de massas
NAMPs	<i>microbe-associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados a micróbios)
NFT	emaranhados neurofibrilares
NF-κB	fator de transcrição nuclear kapa B
NMDA	(receptor) N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	dihidrocloreto de O-fenilenediamina
p.o.	<i>per os</i>
PA	padrão analítico
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBS	tampão fosfato-sulfato
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PGE ₂	prostaglandina E2
PKA	proteína quinase dependente de AMP _c
PTFE	politetrafluoretileno
RMN	ressonância magnética nuclear
SAMP	animais com predisposição a senescência acelerada
SNC	sistema nervoso central
TNF	fator de necrose tumoral
TRO	tarefa de reconhecimento de objetos
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra eficiência)
UV	ultravioleta
V	volts
v/v	volume / volume
VIS	visível
WT	<i>wild type</i> (tipo selvagem)

LISTA DE FÓRMULAS ESTRUTURAIS

1. Rutina	39
2. Bornesitol	39
3. Ácido quínico	39
4. Ácido clorogênico	39
5. Ácido gálico	41
6. Ácido siríngio	41
7. 2,7-diidroxixantona	41
8. Lupeol	42
9. 13-hidroxipalitantina	45
10. Hidroxipalitantina	45
11. 3-O-metil-D-inositol	45
12.ADD-66	46
13. Baicalina	118
14. <i>si/o</i> -inositol	119
15. Xilocosídeo	130
16. Andrografolídeo	138
17. D-pinitol	142

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1	Doença de Alzheimer.....	22
3.1.1	Fisiopatologia da DA.....	23
3.1.2	Disfunção sináptica e desbalanço de neurotransmissores.....	28
3.1.3	O papel da neuroinflamação na DA.....	29
3.1.4	Lipopolissacarídeo bacteriano e sua correlação com a DA	30
3.2	Epidemiologia da DA.....	31
3.3	Fatores de risco para a DA potencialmente modificáveis	32
3.4	Modelos <i>in vitro</i> relacionados à DA	36
3.5	Modelos animais para o estudo da DA	37
3.6	Tratamento farmacológico da DA	37
3.7	<i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	40
3.8	Produtos naturais com atividade neuroprotetora: polifenóis e ciclóis	45
3.9	Efeito de <i>H. speciosa</i> sobre a cognição	49
4	PARTE EXPERIMENTAL	51
4.1	EQUIPAMENTOS, REAGENTES E MATERIAIS DE CONSUMO	51
4.1.1	Equipamentos.....	51
4.1.2	Solventes, reagentes e material de consumo	52
4.1.3	Vidrarias e materiais diversos	53
4.2	Reveladores para Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	54
4.3	MATERIAL VEGETAL	55
4.4	PREPARO DO EXTRATO.....	55
4.5	FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20.....	55
4.6	ANÁLISE DO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>H. speciosa</i> POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ULTRAEFICIÊNCIA (CLUE)	57
4.6.1	Preparo das amostras.....	57
4.6.2	Condições cromatográficas	57
4.7	DEGRADAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO E FRAÇÃO POR TIÓLISE	58
4.8	MÉTODO CROMATOGRÁFICO E ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS.....	58
4.8.1	Análises por cromatografia a líquido de ultra-eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLUE-EM)	58
4.8.1.1	Preparo das amostras.....	58
4.8.1.2	Condições cromatográficas	58
4.8.1.3	Parâmetros do espectrômetro de massas.....	59
4.9	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS DE HSE POR LC-MS-ESI.....	59
4.9.1	Método analítico estabelecido para a quantificação dos marcadores químicos de HsE por UPLC-MS	59

4.9.1.1 Estabelecimento de condições de monitoramento de reações múltiplas (MRM) para análise de marcadores químicos.....	59
4.9.1.2 Validação do método analítico.....	60
4.9.1.3 Preparo das soluções de análise.....	60
4.9.1.4 Linearidade.....	61
4.9.1.5 Limite de quantificação.....	61
4.9.1.6 Limite de detecção.....	61
4.9.1.7 Precisão.....	62
4.9.1.8 Exatidão.....	62
4.9.1.9 Robustez.....	62
4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>in vitro</i>.....	63
4.10.1 Cultura de células SH-SY5Y e THP1.....	63
4.10.2 Descongelamento de células.....	63
4.10.3 Manutenção e passagem das células.....	64
4.10.4 Congelamento de células.....	64
4.10.5 Avaliação do efeito HsE, HsFr3 e bornesitol sobre a viabilidade das células SH-SY5Y.....	65
4.10.6 Avaliação do efeito de HsE, HsFr3 e bornesitol sobre a toxicidade induzida por A β ₁₋₄₂ em células SH-SY5Y.....	66
4.10.6.1. Padronização do modelo <i>in vitro</i> de dano celular induzido por A β -42.....	66
4.10.6.2 Avaliação das amostras no modelo padronizado.....	66
4.10.7 Avaliação da viabilidade das células THP-1 pelo ensaio do MTT.....	66
4.10.8 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias em cultivos celulares e tecidos.....	67
4.11 Protocolo de ELISA.....	68
4.12 Padronização do ensaio de estresse oxidativo em células THP-1 e SH-SY5Y..	69
4.13 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-NEUROINFLAMATÓRIA <i>in vivo</i>.....	70
4.13.1 Animais.....	70
4.13.2 Preparo e ativação das alíquotas de A β ₁₋₄₂	71
4.13.3 Cirurgia estereotáxica e injeção intra-hipocampal de A β ₁₋₄₂	71
4.14 Protocolo experimental.....	73
4.15 Obtenção e preparo dos encéfalos para a análise imunohistoquímica.....	75
4.16 Marcação de células Iba-1⁺ para a avaliação de micróglias em fatias de hipocampus murinos.....	76
4.17 Avaliação de citocinas pró-inflamatórias em hipocampus isolados.....	77
4.18 Análise estatística.....	77
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
5.1 Obtenção e análise da composição química de extrato de <i>H. speciosa</i>	78
5.2 Caracterização estrutural das proantocianidinas presentes em HsFr3 por CLUE-DAD-ESI-EM/EM.....	85
5.3 Tiólise da fração enriquecida em proantocianidinas.....	91
5.4 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de marcadores químicos em HsE e HsFr3.....	98
5.4.1 Otimização dos parâmetros de MRM para o desenvolvimento de método analítico.....	99
5.4.2 Validação do método analítico para quantificação de marcadores químicos em HsE e HsFr3.....	104
5.4.2.1 Seletividade.....	104
5.4.2.2 Linearidade.....	106

5.4.2.3	Limite de quantificação e detecção	109
5.4.2.4	Precisão	109
5.4.2.5	Exatidão	110
5.4.2.6	Robustez	112
5.5	Quantificação dos teores dos marcadores em HsE e HsFr3.....	114
5.6	Avaliação <i>in vitro</i> do potencial efeito neuroprotetor de HsE, HsFr3 e bornesitol 116	
5.6.1	Avaliação do efeito de HsE, HsFr3 e bornesitol sobre a toxicidade induzida por A β ₁₋₄₂ em células SH-SY5Y pelo ensaio do MTT	117
5.6.2	Efeito de HsE, HsEFr3 e do bornesitol sobre o estresse oxidativo em células THP-1	123
5.6.3	Atividade de HsE, HsFr3 e bornesitol sobre a liberação de mediadores pró- inflamatórios <i>in vitro</i>	129
5.6.4	Efeito de HsE, HsEFr3 e bornesitol sobre o estresse oxidativo em células SH-SY5Y	135
5.6.5	Avaliação da atividade anti-inflamatória de HsE em modelo murino de dano patológico induzido por A β ₁₋₄₂	137
5.6.6	Efeito de HsE e do bornesitol sobre a microgliose induzida por A β ₁₋₄₂ em modelo murino	142
6	CONCLUSÕES	148
7	ANEXOS.....	149
8	REFERÊNCIAS.....	154

1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é um processo neurodegenerativo progressivo, atualmente irreversível, relacionado principalmente à senescência e à senilidade (Sereniki e Vital, 2008). Dentre os achados patológicos da DA estão o surgimento de agregados de proteína β -amiloide e de emaranhados neurofibrilares de proteína tau (NFT) hiperfosforilada, morte neuronal e neuroinflamação (Čolović *et al.*, 2013).

Demências, como a DA, estão entre os principais fatores que contribuem para incapacidade, dependência e mortalidade em idosos, implicando em custos elevados no cuidado dos pacientes (Huang *et al.*, 2020).

Estudos epidemiológicos indicam a hipertensão como um fator de risco para demências como a DA, existindo fortes evidências de seus efeitos deletérios à função cognitiva (Iadecola *et al.*, 2016; Marfany *et al.*, 2018). Além disso, evidências clínicas indicam que o uso de medicamentos anti-hipertensivos por idosos pode estar associado a uma menor incidência de demências (Tan *et al.*, 2017).

Uma fonte promissora de substâncias anti-hipertensivas são produtos naturais de plantas, incluindo inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), alguns dos quais também apresentam efeitos anti-inflamatórios. Neste contexto, destaca-se a espécie *Hancornia speciosa*, denominada popularmente de mangaba, para a qual nosso grupo de pesquisa demonstrou potencial atividade anti-hipertensiva em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (Serra *et al.*, 2005; Endringer, 2007; Ferreira *et al.*, 2007a; Ferreira *et al.*, 2007b; Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2016; Torres-Rêgo *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2019; Moreira *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2022).

Em trabalho realizado durante o mestrado, demonstramos o potencial efeito neuroprotetor de extrato de folhas de *H. speciosa* (Carneiro Junior, 2020). Não existem estudos sobre os efeitos do constituinte anti-hipertensivo de *H. speciosa*, o ciclitol bornesitol, em modelos de Alzheimer. Assim, tendo em vista evidências clínicas e epidemiológicas que sugerem efeitos benéficos de fármacos anti-hipertensivos na redução do progresso de demências como a DA, propõe-se investigar o efeito da *H. speciosa* e de seus constituintes em modelos experimentais de DA, objeto de estudo do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial neuroprotetor de extrato de *Hancornia speciosa* e de seus constituintes em modelos experimentais relacionados à doença de Alzheimer.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Preparar extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* e realizar estudo de desreplicação por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por electrospray (CLUE-ESI-EM/EM).

2.2.2 Realizar o fracionamento do extrato supracitado visando obter uma fração enriquecida em proantocianidinas;

2.2.3 Desenvolver e validar método de CLUE-ESI-EM/EM para a quantificação de marcadores químicos micromoleculares identificados no extrato e na fração enriquecida em proantocianidinas;

2.2.4 Realizar a caracterização estrutural das proantocianidinas constituintes da fração obtida em 2.2.2 por CLUE-ESI-EM/EM e por reações de degradação de tiólise.

2.2.5 Avaliar *in vitro* o potencial efeito anti-fatores pró-inflamatórios do extrato, da fração enriquecida em proantocianidinas e do bornesitol em células THP-1 estimuladas por LPS;

2.2.6 Avaliar *in vitro* o potencial efeito neuroprotetor do extrato, da fração enriquecida em proantocianidinas e do bornesitol na citotoxicidade induzida por peptídeo amiloide em células SH-SY5Y;

2.2.7 Avaliar o efeito do extrato e do bornesitol na neuroinflamação em modelo murino de neurotoxicidade induzida pela injeção intra-hipocampal de peptídeo beta-amiloide.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) foi primeiramente descrita pelo Doutor Alois Alzheimer, em 1906, ao relatar o comportamento peculiar de uma paciente que apresentava perda acentuada da memória, dificuldade de aprendizado e outras alterações psicológicas, como delírios e a característica de esconder objetos. A paciente deste primeiro relato faleceu quatro anos e meio após a primeira observação de seu caso. Durante a autópsia da paciente, o médico observou uma redução do volume cerebral e a presença de depósitos anormais extracelulares. Este relato foi apresentado na obra “*on the peculiar disease process of the cerebral cortex*” (Lopez *et al.*, 2023; Stelzmann *et al.*, 1995).

A DA é uma doença neurodegenerativa associada ao comprometimento gradual da função cognitiva, incluindo as habilidades de linguagem, práxis e perda de memória, com a perda do reconhecimento facial e da lembrança de nomes, perda da capacidade de julgamento e da estabilidade emocional, além de alterações de personalidade. Até o momento não há diagnóstico inequívoco para a DA, sendo este principalmente clínico, e sua etiologia é desconhecida ou multifatorial. Diversos estudos associam a DA ao envelhecimento, tendo em vista que ela acomete majoritariamente indivíduos com idade superior a 65 anos, e sua prevalência dobra a cada 5 anos, em um efeito de acréscimo exponencial tempo-dependente. Isto sugere que a maioria dos idosos é altamente propensa a desenvolver algum tipo de demência. Portanto, a DA refere-se a um declínio cognitivo e funcional particularmente associado ao envelhecimento e que culmina na morte do paciente (Abeyasinghe *et al.*, 2020).

O critério para diagnóstico clínico da demência do tipo DA passou por modificações e, em 2018, o uso de biomarcadores foi adotado como critério para a caracterização dos estágios pré-clínicos da doença (Jack *et al.*, 2018).

A maioria dos biomarcadores da DA pode ser classificada em biomarcadores fisiopatológicos e biomarcadores topográficos; ambos podem auxiliar o reconhecimento, diferenciação e diagnóstico dos fenótipos da DA. Os biomarcadores fisiopatológicos relacionados à DA incluem tomografia por emissão de pósitrons (PET), concentrações de proteínas amiloide e tau no líquido cefalorraquidiano (LCR) e concentrações plasmáticas de amiloide, tau e outros biomarcadores proteicos. Os

biomarcadores topográficos estão relacionados aos danos cerebrais da patologia da DA, como o hipometabolismo regional na fluorodesoxiglicose (FDG)-PET, tau PET e atrofia regional/local na ressonância magnética estrutural (MRI). Até o momento, nenhum biomarcador de fluidos foi conclusivamente ligado a um fenótipo clínico individual de DA, no entanto, de acordo com suas diferenças de distribuição regional, existem biomarcadores de imagem moleculares, metabólicos e degenerativos correspondentes para os diferentes fenótipos da DA (Dubois *et al.*, 2023).

O início da DA é condizente com o surgimento de agregados de proteína β -amiloide extracelulares, também chamados de placas senis, e de emaranhados neurofibrilares (NFT) intraneuronais de proteína tau hiperfosforilada, além de morte progressiva de neurônios, principalmente de neurônios colinérgicos, acompanhado de neuroinflamação com evidente microgliose e astrocitose, assim como destruição dos mecanismos de comunicação neuronal e evidente atrofia hipocampal e encefálica (Ihara *et al.*, 2018; Miraglia; Vecchio; Rossini, 2017)

Apesar da importância destes achados patológicos, Alois Alzheimer chegou à conclusão, 5 anos após a sua descrição das placas amiloidogênicas e dos NFT, de que estas histopatologias não eram a causa da neurodegeneração na DA, mas sim um epifenômeno característico. No entanto, estudos demonstraram a causalidade entre a agregação destas proteínas e a atrofia cerebral, a desintegração sináptica e a perda neuronal que caracterizam a DA (Ayton e Bush, 2021).

3.1.1 Fisiopatologia da DA

A fisiopatologia da DA ainda não foi completamente estabelecida. Duas principais hipóteses tentam explicar a etiologia da doença relacionando-a às proteínas β -amiloide ($A\beta$) e tau (Selkoe, 2004; Ihara *et al.*, 2018; Lopez *et al.*, 2019).

A proteína beta amiloide ($A\beta$) é um peptídeo curto de 4,2 kDa que consiste em 40-42 aminoácidos. O precursor de $A\beta$ é a proteína precursora de amiloide (APP). Na membrana celular dos neurônios cerebrais, a APP é clivada na presença de secretase para produzir peptídeos $A\beta$ (Devkota *et al.*, 2021).

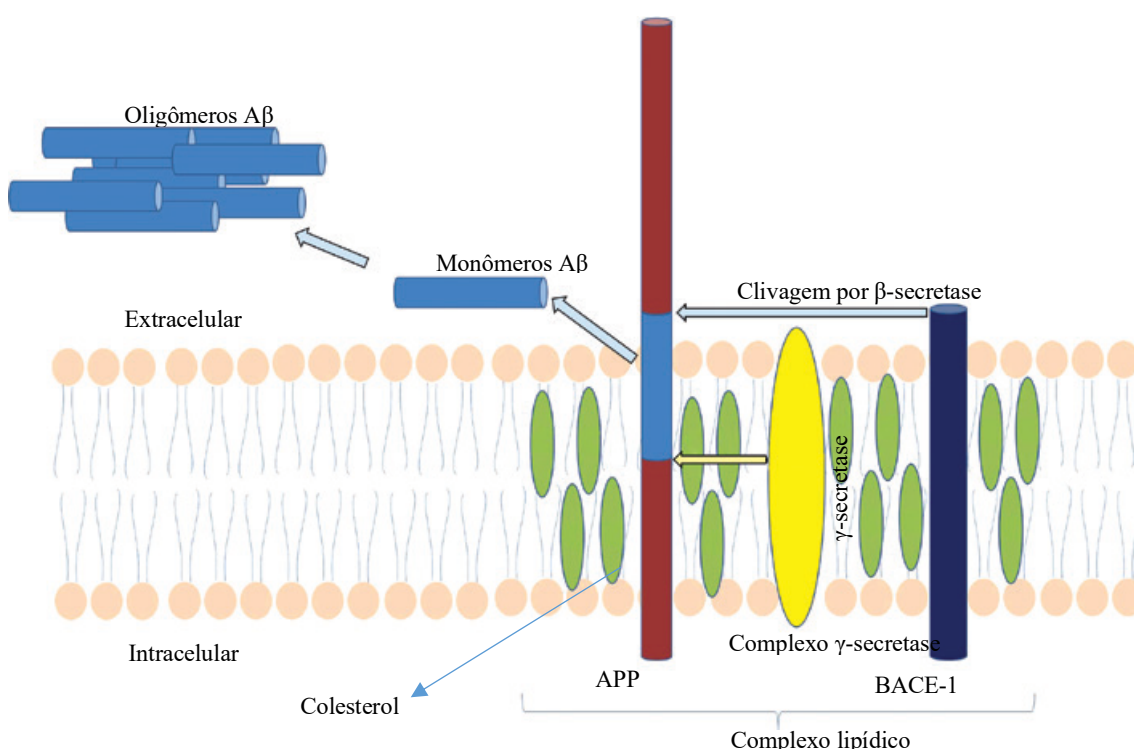
De acordo com a hipótese da cascata amiloidal, a neurodegeneração é iniciada pela clivagem da proteína precursora de amiloide (APP), resultando na produção, agregação e deposição do peptídeo $A\beta$ e de placas difusas e neuríticas. A APP é uma proteína transmembrana do tipo 1 expressa por diversos tipos de células. No cérebro, a APP pode ser clivada por duas vias diferentes, uma amiloidogênica e outra não-

amiloidogênica. A clivagem não-amiloidogênica da APP é realizada pelas α - e γ -secretases. A clivagem da APP pela α -secretase resulta na secreção de produtos extra-celulares chamados de sAPP α e de um fragmento C-terminal ligado à membrana com 83 aminoácidos chamado de C83. A clivagem de C83 pela γ -secretase resulta em outro fragmento secretado chamado de p3, que é solúvel e não patogênico. Os peptídeos β -amiloides que formam as placas senis são resultantes da hidrólise da APP por BACE1, uma enzima β -secretase que cliva a APP transmembrana e, junto com a γ -secretase, gera espécies A β . Na DA as espécies A β formam agregados cerebrais de elevada massa molecular e conformacionalmente complexos. Alta atividade enzimática BACE1 foi encontrada em extratos cerebrais humanos com DA, o que é consistente com o achado de que os neurônios produzem os níveis mais altos de A β (Hampel *et al.*, 2021).

A clivagem por β -secretase resulta na secreção extra-celular de um produto chamado de sAPP β e de um fragmento C-terminal ligado à membrana com 99 aminoácidos chamado de C99. O processamento de C99 por γ -secretases resulta na secreção extracelular de polipeptídeos A β . Estes polipeptídeos formados pela clivagem de C99 apresentam tamanhos variáveis, contendo de 37 a 42 aminoácidos, que são tóxicos. O fragmento A β ₁₋₄₀ e, em especial, o A β ₁₋₄₂ apresentam maior capacidade de formar emaranhados e produzir efeito neurotóxico do que os menores. É importante ressaltar que ambos os processos ocorrem em condições homeostáticas. No entanto, em pacientes com DA há um aumento expressivo da clivagem de APP por β -secretase. Os agregados fibrilares de A β depositam-se majoritariamente no espaço extracelular no entorno de neurônios e de células da glia (**figura 3.1**). Membranas lipídicas podem servir como sítios de nuclearização que aceleram a deposição destes agregados. Estes polipeptídeos têm a capacidade de aderir aos receptores AMPA e a canais iônicos para cálcio, como os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), aumentando o influxo deste íon, podendo levar à desestabilização e desgaste de membranas. Devido a sua toxicidade, esses polipeptídeos iniciam um processo inflamatório, com recrutamento e ativação de células da glia, lesando as células e resultando em morte celular. O processo é exacerbado pelo aumento intra- e extracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), promovendo significativa neurodegeneração. Além disso, essas espécies reativas possuem ação sobre o DNA, podendo causar modificações que

contribuem para o avanço e aparecimento da doença e seus sinais e sintomas (Khan *et al.*, 2020; Soria Lopez *et al.*, 2019).

Figura 3.1: Representação esquemática do processamento da APP durante a cascata amiloidogênica. APP gera produtos não amiloidogênicos quando clivada por α -secretase. A clivagem sequencial por β -secretase (BACE-1) e γ -secretase leva predominantemente à formação de fragmentos de peptídeo $A\beta_{1-40}$, além da formação de peptídeos $A\beta_{1-42}$ (5-10%). Pode ocorrer um equilíbrio entre oligômeros e fibrilas, no qual as fibrilas geram oligômeros, levando a efeitos deletérios. O processo de formação do peptídeo amiloide ocorre no complexo lipídico, região da bicamada lipídica que contém marcadores distintos, rica em colesterol, esfingolipídeos e glicolipídeos (adaptado de Reiss *et al.*, 2018).

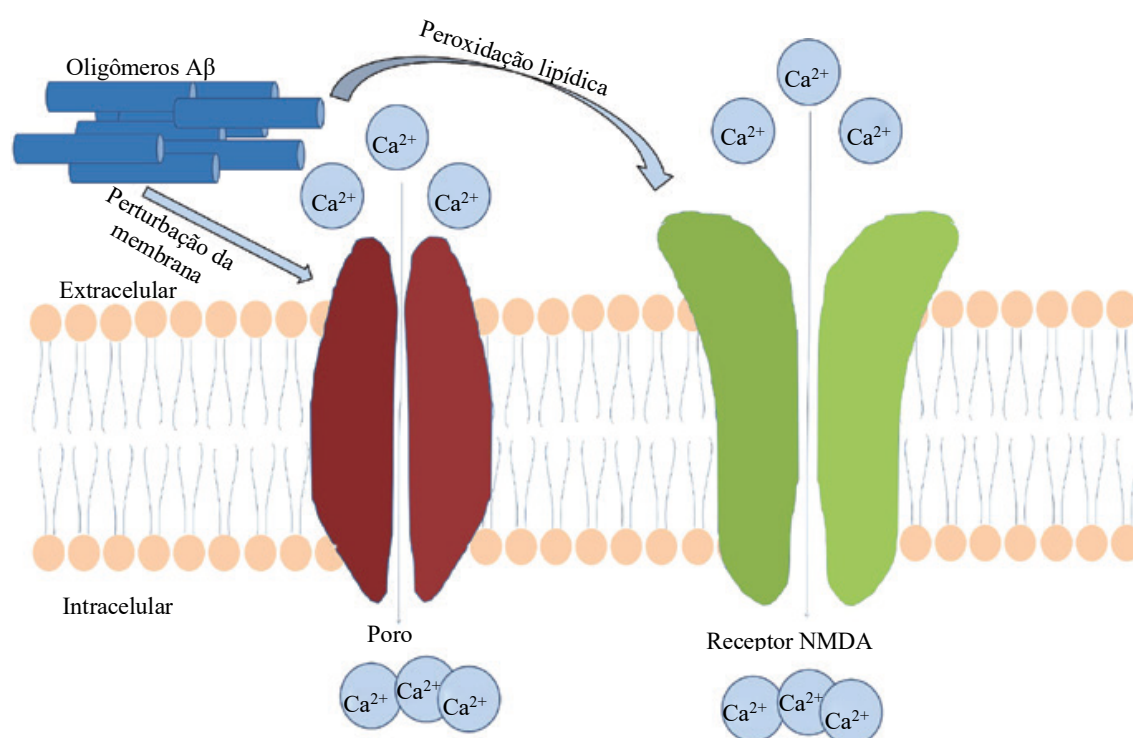


Um mecanismo de toxicidade da $A\beta$ demonstrado é relacionado a seus peptídeos serem capazes de romper a homeostase iônica ao promover o aumento do influxo de íons Ca^{2+} , com consequente aumento da concentração intracelular.

Neurônios saudáveis necessitam de um grande gradiente de concentração iônica entre os ambientes extra e intracelulares e a perda desta diferença de concentração leva a depleção dos estoques de neurotransmissores vesiculares. A hipótese para explicar a depleção observada considera que o influxo de Ca^{2+} resulta na formação de uma estrutura oca na membrana composta por pequenos oligômeros anulares de $A\beta$, com interior hidrofílico e exterior hidrofóbico. Estas estruturas fixam-se junto à membrana originando um “vão” na bicamada lipídica, que resulta na criação

de um poro que atua como canal de Ca^{2+} . Já foi demonstrado em imagens geradas por microscopia de força atômica de alta resolução o aparecimento de estruturas morfológicamente semelhantes a poros formadas por peptídeos A β incorporados à bicamada lipídica. Este achado foi posteriormente reforçado pela observação de atividade semelhante à de poros, principalmente com influxo de Ca^{2+} , em neurônios. A quebra da homeostase do cálcio pode facilmente levar à disfunção mitocondrial, induzindo uma cascata de radicais livres e levando à apoptose neuronal (**figura 3.2**) (Reiss *et al.*, 2018).

Figura 3.2: Ilustração representando a falha neuronal mediada por oligômeros A β . Oligômeros A β , por meio de processos como peroxidação lipídica, ativa o receptor NMDA e a formação de poros na membrana. Ambos os processos levam ao aumento do influxo de cálcio do meio extracelular para o espaço intracelular do neurônio. O aumento da concentração de Ca^{2+} intraneuronal leva à depleção dos estoques de neurotransmissores vesiculares, eventualmente causando disfunção neuronal (adaptado de Reiss *et al.*, 2018).



A hipótese da cascata amiloida é controversa e evidências clínicas indicam que fármacos que atuam inibindo a formação de placas amiloides não apresentam qualquer efeito na reversão ou interrupção do declínio cognitivo. Isto sugere que a hipótese está incorreta ou que o cérebro se torna refratário ao tratamento após um certo tempo. Assim, faz-se necessário buscar intervenções terapêuticas que atuem

em alvos múltiplos, além dos amiloidogênicos, como no processo inflamatório, no estresse oxidativo ou nas vias extra-encefálicas, bem como no controle da inflamação sistêmica e de doenças associadas a fatores de risco para a DA, incluindo diabetes e hipertensão (Khan *et al.*, 2020).

As placas A β cerebelares são geralmente difusas e observadas em estágios avançados da DA, tipicamente em uma densidade mais baixa em comparação com placas no córtex cerebral, possivelmente devido ao aumento da depuração de A β no cerebelo. Notavelmente, a deposição de A β no cerebelo também aumenta em pessoas idosas sem demência, semelhante a outras áreas do cérebro nas quais a densidade de A β aumenta com a idade. Foi sugerido que a disfunção cerebelar possa ocorrer nos estágios iniciais da DA, independente do acúmulo extracelular de placas A β (Lopez *et al.*, 2023).

Outra hipótese que busca explicar como se instala o processo neurodegenerativo é baseado na formação dos emaranhados neurofibrilares de proteína tau (NFT). A tau é uma proteína microtubular axonal que possui um domínio de ligação a microtúbulos, promovendo a polimerização e estabilização destes, afetando sua dinâmica. Desempenha um importante papel no crescimento dos processos neuronais e no desenvolvimento da polaridade neuronal e na integridade do citoesqueleto. Em adultos, existem seis isoformas da proteína tau, sendo que esta proteína possui mais de 30 sítios de fosforilação (Ukmar-Godec *et al.*, 2020).

O sistema de microtúbulos é um componente do citoesqueleto neural, que consiste em proteínas de microtúbulos e proteínas associadas a microtúbulos. Está envolvido em uma variedade de funções celulares. Entre elas, as proteínas tau são as proteínas associadas aos microtúbulos mais abundantes. Cada molécula de proteína tau no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer contém de 5 a 9 grupos fosfato, indicando hiperfosforilação, que inviabiliza a formação de conjuntos de microtúbulos ou a manutenção da estabilidade dos microtúbulos. A ativação, induzida por A β , da p38MAPK intracelular leva à fosforilação anormal das proteínas tau - acelerando a progressão espaço-temporal da patologia da tau e aumentando a formação de placas amiloides, podendo, também, induzir a fosforilação do sítio Ser-214 da proteína tau através da via de sinalização β 2AR-PKA-JNK. A hiperfosforilação da tau também pode levar à localização incorreta dos microtúbulos e ao aumento da propensão à agregação, causando danos aos neurônios. No entanto, não está claro

como e se a hiperfosforilação da tau pode levar diretamente à morte neuronal (Ma *et al.*, 2022).

A ligação da proteína tau com os microtúbulos é regulada pela fosforilação dos resíduos de serina/treonina e é determinada principalmente por um balanço entre a ativação de várias proteínas quinases e fosfatases, como a Fyn-quinase, a 3 β -glicogênio sintase quinase (GSK3 β ; *glycogen synthase kinase-3 β*) e a quinase 5 dependente de ciclina (CDK5; *cyclin-dependent kinase-5*). A quebra deste equilíbrio resulta na fosforilação anormal da tau, que é observado na DA. Cada sítio da proteína tau é fosforilado por uma ou mais proteína quinase. A hiperfosforilação desta proteína, observada na DA, leva à desestabilização e ruptura dos microtúbulos devido ao decréscimo da afinidade de ligação da tau, prejudicando a transmissão sináptica, a transdução de sinal e o transporte axonal e comprometendo a função neuronal e sináptica, além de levar a uma degeneração celular gradual (Huang *et al.*, 2019). A hiperfosforilação da proteína tau resulta em perda da função biológica e também promove sua polimerização e acúmulo na forma de filamentos helicoidais pareados, formando estruturas filamentosas descritas como NFT intracelulares depositados no citosol, que são tóxicos e causam neurodegeneração. Os fatores que levam à hiperfosforilação da tau estão relacionados à mutações ou à desregulação na ação de quinases e fosfatases (Gibbons *et al.*, 2019; Jellinger *et al.*, 2008).

3.1.2 Disfunção sináptica e desbalanço de neurotransmissores

As alterações fisiopatológicas mais graves da DA acontecem no hipocampo e nas regiões corticais e subcorticais, incluindo amígdala e núcleo basal de Meynert. A DA ocasiona a depleção de neurotrofinas e neurotransmissores, bem como o aumento da concentração de íons cálcio intracitoplasmáticos, além de comprometimento do ciclo celular normal. O principal sistema neurotransmissor acometido é o sistema colinérgico, com graves consequências, uma vez que a acetilcolina possui importante papel no aprendizado, atenção e plasticidade sináptica (Lopez *et al.*, 2023; Soria Lopez *et al.*, 2019).

O sistema colinérgico está envolvido no processo de cognição. A disfunção deste sistema é responsável por diversos tipos de demências, dentre elas a DA. Os neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert exibem deposição de placa amiloide e NFTs, eventualmente sofrendo degeneração devido o início de eventos pró-inflamatórios, que deterioram ainda mais a cognição. Alteração no receptor de

acetilcolina permeável ao Ca^{2+} (nAChR) pode causar comprometimento da integridade sináptica. Na região sináptica cortical e do hipocampo, A β exibe ligação máxima a $\alpha 7$ - e $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs (Hampel *et al.*, 2018). A expressão da colina acetil transferase é reduzida e a da acetilcolinesterase (AChE) aumenta, contribuindo para a depleção da acetilcolina e o agravamento da demência. AChE também interage com o peptídeo A β e promove a formação de placas (Ferreira-Vieira *et al.*, 2016). Este processo, junto a fatores genéticos, resulta em disfunção sináptica, contribuindo para a demência e a neurodegeneração (Khan *et al.*, 2020).

3.1.3 O papel da neuroinflamação na DA

A neuroinflamação possui um papel central na patogênese da DA. O processo pode ser desencadeado por diferentes eventos presentes em doenças neurodegenerativas, ocorrendo simultaneamente com as modificações na estrutura encefálica e na plasticidade sináptica, levando à neurodegeneração. A resposta neuroinflamatória é indicativa de uma sequência não específica de morte neuronal em doenças neurodegenerativas. Evidências experimentais sugerem que a inflamação não apenas contribui para os mecanismos de morte neuronal, mas também é um fator chave no controle da interação entre o sistema imune e o sistema nervoso central (SNC) (Lenge Edison, 2021; Teles-Grilo Ruivo e Mellor, 2013).

A resposta imune-inflamatória pode ser benéfica nos estágios iniciais da DA, mas tende a ser deletéria quando se torna crônica. Portanto, a neuroinflamação pode facilitar e exacerbar tanto a patologia amiloide quanto a dos NFTs. A resposta inflamatória no SNC é mediada, inicialmente, por células da glia, principalmente micróglia, que são células do sistema imune inato residentes do SNC. Essas células migram para as regiões acometidas por algum processo lesivo, onde podem proliferar, refinar conexões sinápticas, liberar fatores pró-inflamatórios, exercer atividade fagocítica, liberar quimiocinas ou atuar na produção de fatores neurotróficos, como fatores de crescimento, que objetivam aumentar a sobrevivência neuronal. Dependendo do estágio da DA, este efeito pode ser benéfico ou prejudicial. Embora essas células tenham a capacidade de depurar o β -amiloide em estágios iniciais, no decorrer da doença elas reduzem a expressão de receptores que se ligam ao β -amiloide, mas continuam produzindo citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- γ (IFN- γ), que são neurotóxicas e estimulam a formação de β -amiloide (Desplast, 2019; Webers *et al.*, 2020).

Análises de RNA de células imunes do SNC presentes em várias doenças neurodegenerativas revelaram micróglia associadas a patologias (MAP), um subtipo de micróglia que demonstra uma assinatura transcripcional e funcional única. MAP são associadas com o risco genético à DA, incluindo a ativação de receptores expressos em células mieloides do tipo 2. Micróglia podem induzir respostas inflamatórias contra padrões moleculares associados à neurodegeneração (NAMPs), semelhantemente ao que ocorre com a resposta de macrófagos contra padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e dano associado a estresse (DAMPs) (Ciccocioppo *et al.*, 2019; Deczkowska *et al.*, 2018; Muzio *et al.*, 2021).

Estudos de associação genômica ampla identificaram diversas variantes polimórficas em genes expressos por micróglia que modulam o risco para DA. Estas associações genéticas sugerem um papel relevante do sistema imune e da inflamação na DA, que se iniciam a partir da fagocitose e clearance das placas de A β . Estes achados, associados a outras evidências, sugerem que a neuroinflamação seja mais do que uma consequência da patologia da DA (Efthymiou e Goate, 2017).

Dois dos principais genes envolvidos no aumento do risco para o desenvolvimento de DA são o APOE e TREM2. Estudos em modelos animais associados a análises *post-mortem* de micróglia de tecidos humanos indicam que a ativação coordenada da via de TREM2-APOE em resposta às placas neuríticas leva a mudanças fenotípicas do estado homeostático para o estado de micróglia neurodegenerativa, caracterizada pelo aumento da resposta inflamatória local (Krasemann *et al.*, 2017; Scheltens *et al.*, 2021).

Além da importância da via microglial na neuroinflamação, astrócitos também desempenham um papel importante no processo através da liberação de citocinas que ativam a comunicação bidirecional entre células da glia, neurônios e células endoteliais (Guerrero *et al.*, 2021; Linnerbauer *et al.*, 2020).

3.1.4 Lipopolissacarídeo bacteriano e sua correlação com a DA

Bactérias gram-negativas possuem duas membranas distintas, uma interna e outra externa. Um dos principais constituintes da membrana externa é o lipopolissacarídeo (LPS). Esta molécula é formada pelo lipídeo A, por um núcleo de polissacarídeo e pelo antígeno O, e está associada a processos toxigênicos e inflamatórios em diversas doenças humanas (Wang e Quinn, 2010).

Estudos têm demonstrado que desbalanço na microbiota intestinal podem contribuir para o desenvolvimento e avanço da DA. Alterações na microbiota intestinal levam ao aumento da permeabilidade da membrana do intestino, resultando em disfunção da barreira hematoencefálica e consequentemente promovendo a neuroinflamação, lesão e morte neuronal e, em ultima instância, ao desenvolvimento de DA (Megur *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2023).

É possível que o LPS possa acessar o cérebro diretamente através da transdução nervosa periférica, dos órgãos circunventriculares, da área postrema ou mesmo ao nível do hipotálamo. O LPS se liga à porção CD14 das membranas microgлияis, levando à formação do complexo CD14-micrógлия, que pode interagir com receptores do tipo toll TLR-4. Por sua vez, o TLR-4 ativa a micrógлия por iniciação da cascata de transdução, levando a rápida transcrição e liberação de citocinas proinflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF, o que pode levar ao aumento da expressão de APP e a formação de placas A β (Zakaria *et al.*, 2017). Em modelo murino, é possível observar um aumento de A β no hipocampo sete dias após a administração de LPS intraperitoneal (Skrzypczak-Wiercioch e Sałat, 2022).

3.2 Epidemiologia da DA

Nas últimas décadas, a pirâmide etária tem sofrido uma forte inversão no Brasil, com o aumento do número de pessoas vivendo com 60 anos ou mais. Segundo dados do IBGE (Brasil, 2022), cerca de 7,0% da população brasileira apresenta idade superior a 60 anos. Estima-se que esse percentual se eleve a mais de 11% em 2030. Estimativas obtidas por meta-análises apontam que a incidência de perda cognitiva em algum grau é de 22,5 em indivíduos com idade entre 75 e 79 anos, de 40,9 em indivíduos com idade entre 80 e 84 anos, e superior a 60 em indivíduos com mais de 85 anos, por mil habitantes (Gillis *et al.*, 2019).

O crescimento da população de idosos no Brasil e no mundo deverá resultar em aumento no número de pessoas vivendo com demência. Segundo Gustavsson *et al.* (2023), o número global de pessoas com demência, DA prodrômica, na qual se iniciam os primeiros sintomas clínicos, mas ainda não alcançam os critérios diagnósticos, e DA pré-clínica foi estimado em 32, 69 e 315 milhões, respectivamente. Juntos, eles totalizam 416 milhões de pessoas, ou 22% da população mundial com 50 anos ou mais.

Além dos aspectos sociais e dos impactos gerados na vida do paciente, de seus familiares e das pessoas no seu convívio social, a DA implica em custos elevados no cuidado dos pacientes. Os custos médios de cuidados médicos de pessoas com 65 anos ou mais com DA ou outras demências são quase três vezes superiores aos custos com pacientes sem estas condições. No Brasil, o relatório da Renade (2023) estima um gasto total de 87 bilhões de reais no atendimento e tratamento de pacientes com DA.

3.3 Fatores de risco para a DA potencialmente modificáveis

Fatores de risco relacionados a diferentes faixas etárias estão associados ao desenvolvimento da DA. O nível educacional adquirido antes dos 45 anos de idade, doenças crônicas (como diabetes, hipertensão, obesidade e depressão) e fatores associados ao estilo de vida (tabagismo, etilismo, isolamento social e poluição do ar) estão entre os fatores associados a uma maior predisposição para o desenvolvimento da DA (Sabia *et al.*, 2017; Singh-Manoux *et al.*, 2017)

Ainda não está claro como o nível educacional adquirido antes dos 45 anos de idade impacta a cognição; no entanto, evidências apontam que melhorar a qualidade e o acesso educacional pode ser importante para reduzir o declínio cognitivo e o risco de demência durante a velhice (Kremen *et al.*, 2019). Um estudo com randomização Mendeliana que utilizou variantes genéticas associadas a fatores de risco modificáveis para a DA como variáveis instrumentais, concluiu que elevado nível educacional está associado a reduzida prevalência de DA. Este estudo teve como participantes 17 mil pacientes com DA e 37 mil voluntários controle (Larsson *et al.*, 2017).

Estudos epidemiológicos indicam que a hipertensão é um fator de risco para o desenvolvimento da DA (Iadecola *et al.*, 2016; Marfany *et al.*, 2018). O comprometimento cognitivo é comum em pacientes com doenças cardiovasculares. Um em cada três pacientes de clínicas de cardiologia apresenta algum grau de comprometimento cognitivo, dependendo da condição cardíaca, comorbidades e idade. Em até metade destes casos, o comprometimento cognitivo pode passar despercebido; no entanto, pode afetar a autogestão e a adesão ao tratamento. A alta prevalência de comprometimento cognitivo em pacientes com doença cardíaca é provavelmente devida a fatores de risco comuns a estas patologias, bem como às consequências diretas da disfunção cardíaca no cérebro. Além disso, as intervenções cardíacas podem ter efeitos benéficos no funcionamento cognitivo (van Nieuwkerk *et*

al., 2023). Um estudo de coorte longitudinal, iniciado em 1961, visava investigar o envelhecimento de um grupo de voluntários, os quais eram submetidos a exames clínicos e laboratoriais a cada três ou seis anos. Como critério de elegibilidade para o estudo, foi determinado que os participantes não poderiam ter hipertensão prévia. Entre os anos de 1992 e 2005 foram realizados testes cognitivos com os participantes do estudo. A análise dos resultados dos testes cognitivos, sua comparação com os testes anteriores, e a idade de desenvolvimento de quadro hipertensivo em alguns pacientes permitiu formular a hipótese de que hipertensão, por período de tempo prolongado, poderia estar relacionada ao desenvolvimento de demência (Power *et al.*, 2013).

A associação entre hipertensão e o desenvolvimento de DA também é sustentada por pesquisas de biomarcadores diretamente associados à DA. Comparado aos encéfalos de pessoas normotensas, os cérebros de pessoas com histórico de hipertensão apresentaram maior nível de placas senis e NFT. Similarmente, a hipertensão foi identificada como um fator de risco para depósitos corticais de β -amiloide fibrilar (Ashby *et al.*, 2016).

Hipertensão crônica pode alterar a permeabilidade da β -amiloide intra- e extracerebral através da barreira hematoencefálica, ou por meio da matriz extracelular perivascular. Isto pode contribuir para o desenvolvimento de angiopatia amiloide em vasos sanguíneos do cérebro, o que é uma ocorrência comum na DA (Jochemsen *et al.*, 2015).

Adicionalmente, evidências clínicas sugerem que o uso de anti-hipertensivos esteja relacionado à menor incidência de demência em idosos. Em estudo de coorte prospectiva realizado com 1208 participantes, com idade igual ou superior a 75 anos, sem demências pré-diagnosticadas, foram realizados exames clínicos e laboratoriais após três e seis anos para a detecção de demência. Durante o período do estudo, 125 participantes foram diagnosticados com algum tipo de demência. A maior parte dos indivíduos que desenvolveu a doença apresentava algum tipo de doença vascular, sendo que a incidência foi menor entre aqueles que faziam o uso de terapia anti-hipertensiva (Tan *et al.*, 2018).

O uso de bloqueadores dos receptores da angiotensina II pode proporcionar o maior benefício entre os agentes anti-hipertensivos. A inibição dos receptores da angiotensina II tipo 1 (ATR1) reduz a pressão arterial. No entanto, foi observado em modelos animais que este bloqueio resulta na regulação positiva dos receptores tipo

2 da angiotensina II (ATR2). A ativação deste receptor resulta na redução do estresse oxidativo e da neuroinflamação e na melhora do fluxo sanguíneo cerebral, o que pode levar a uma redução nas placas amiloides e na incidência de DA. (Adesuyan *et al.*, 2022).

Um estudo de coorte realizado na França relatou que o uso de inibidores da ECA em idosos com DA está associado a um baixo nível de declínio cognitivo. Em outro estudo, inibidores da ECA (iECA) que atravessam a barreira hematoencefálica e possuem atividade central foram associados à redução de 65% de declínio cognitivo por ano de exposição. Também se observou uma associação entre melhora na neuroinflamação e ativação microglial com o uso de inibidores da ECA (Torika *et al.*, 2016). O captopril é um dos iECA que reduz a formação de Ang II e exerce efeitos antiinflamatórios benéficos em cultura glial tratada com lipopolissacarídeo (LPS). Em modelo murino de epilepsia induzida por ácido caínico, o captopril preveniu a epileptogênese e melhorou o comprometimento cognitivo. O tratamento com captopril inibiu a ativação e interação glial, bem como a expressão de citocinas e quimiocinas. Além disso, reduziu a produção de complemento C3 nos astrócitos, ao mesmo tempo que inibiu a ativação glial mediada pela sinalização C3-C3ar, prevenindo potencialmente a perda sináptica, a epileptogênese e o comprometimento cognitivo (Dong *et al.*, 2022).

A hipertensão promove o desenvolvimento e acúmulo de placas ateroscleróticas nas artérias carótidas, vertebrais e cerebrais intracranianas. A disfunção endotelial contribui para o desenvolvimento da aterosclerose, devido a uma combinação de estresse de cisalhamento e fluxo turbulento, aumento de radicais livres e redução da sinalização de NO que aceleram a inflamação e o acúmulo de células imunológicas. A aterosclerose extracraniana aumenta o risco de declínio cognitivo, enquanto a aterosclerose intracraniana tem sido associada à DA. Um estudo proteômico recente em amostras de autópsia de indivíduos com DA ou comprometimento cognitivo leve com aterosclerose intracraniana identificou regulação sináptica e plasticidade reduzidas, bem como mielinização aberrante como potenciais mecanismos de sinalização que contribuem para o declínio cognitivo. É importante ressaltar que essas contribuições foram independentes das placas amiloides e dos emaranhados neurofibrilares, bem como de outras patologias cerebrais, revelando assim uma nova ligação entre a aterosclerose e o comprometimento cognitivo na DA (Santisteban *et al.*, 2023).

Em uma meta-análise que reuniu estudos envolvendo entre 2 a 3 milhões de pacientes com diabetes do tipo 2, em cerca de 14 estudos de coorte, e que inclui aproximadamente 100 mil pacientes com demência, diabetes foi associada ao aumento do risco para o desenvolvimento de demência (Chatterjee *et al.*, 2016). O risco de demência aumenta com a demora para iniciar o tratamento e a severidade da diabetes (McMillan *et al.*, 2018).

Mais recentemente, estudos pré-clínicos têm demonstrado que fármacos direcionados à sinalização cerebral da insulina produzem efeitos neuroprotetores, enquanto estudos clínicos de fase II e III visam avaliar o efeito de compostos antidiabéticos na prevenção do declínio cognitivo e na melhora dos sintomas da DA. Nestes estudos, fármacos direcionados aos receptores cerebrais de incretina representam uma das mais promissoras estratégias para o tratamento da DA. Notavelmente, agonistas do receptor de peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), como a liraglutida, têm sido os mais promissores nestes estudos, demonstrando melhora no metabolismo da glicose e da funcionalidade neuronal (Nowell *et al.*, 2023).

A aprendizagem parece modificar a expressão e a função dos receptores de insulina em áreas específicas do cérebro. Pesquisas em animais apontam para a regulação positiva do mRNA do receptor de insulina na região CA1 do hipocampo após o treinamento da memória espacial, levando ao aumento da presença do receptor de insulina no hipocampo. Além disso, a insulina pode influenciar significativamente a memória e a aprendizagem, uma vez que a insulina tem um papel fundamental na formação do desenvolvimento e sustentabilidade das sinapses, promovendo a formação da espinha dendrítica. Além da cognição, a sinalização da insulina também pode regular estados emocionais. Por exemplo, ratos com receptores hipotalâmicos de insulina diminuídos apresentaram sintomas semelhantes a depressão e ansiedade. Por outro lado, a administração de insulina em camundongos reforçou a memória de objetos e apresentou efeitos de redução da ansiedade (Albar *et al.*, 2024).

A resistência à insulina significa que os tecidos-alvo sistêmicos, como tecido adiposo, músculo e órgãos como o fígado, estão menos sensíveis à insulina e não conseguem regular adequadamente a homeostase da glicose. Alguns fatores, como a inflamação, disfunção mitocondrial e níveis elevados de estresse oxidativo, levam ao distúrbio da cascata de sinalização da insulina e são importantes desencadeadores da resistência à insulina. Em condições pró-inflamatórias, a ativação das células gliais

pode levar a danos neuronais progressivos. Além disso, a insulina regula as vias metabólicas que mantêm a aprendizagem e a memória e o transporte/metabolismo da glicose. Na disfunção cognitiva diabética, a resistência à insulina causa disfunção metabólica dos neurônios e afeta a função da memória (Li *et al.*, 2023).

Desta forma, compostos capazes de tratar os fatores de risco modificáveis para a DA, associados à sua capacidade de atuar em múltiplos alvos, como na resolução da inflamação, inibição da liberação de citocinas pro-inflamatórias e nas vias de oxidação são candidatos promissores ao tratamento da DA.

3.4 Modelos *in vitro* relacionados à DA

Diversas linhagens celulares são empregadas como modelo *in vitro* para estudo da DA. Como exemplo, podemos citar o uso de cultura de células de linhagem primária derivadas de roedores e células derivadas de tumores humanos, como o neuroblastoma e feocromocitoma. Mais recentemente, células-tronco pluripotentes vêm sendo utilizadas para criar um modelo *in vitro* de DA pela transferência de células com genes associados com DA familiar de início precoce, ou com mutação de proteínas transmembrana como a presenilina 1 e 2 ou APP (Stefanescu *et al.*, 2020).

A linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y é empregada como modelo *in vitro* da DA e de outras doenças neurodegenerativas a partir de sua diferenciação em diferentes linhagens celulares pelo emprego de vários fatores de diferenciação celular (Kaya *et al.*, 2024).

Três aspectos das células SH-SY5Y devem ser considerados para sua utilização em estudos *in vitro* como modelo de DA (Kovalevich *et al.*, 2021), descritos a seguir. (a) As culturas incluem células aderentes e não aderentes, ambas viáveis; (b) a diferenciação parental apresenta dois fenótipos morfológicos distintos: células semelhantes a neuroblastos e células semelhantes a células epiteliais. As células morfolologicamente semelhantes a neuroblastos contêm tirosina hidroxilase e dopamina- β -hidroxilase, que são características de neurônios catecolaminérgicos, enquanto as células semelhantes a epitélio apresentam células sem estas atividades enzimáticas. (c) SH-SY5Y podem se diferenciar para neurônios mais maduros (Ross *et al.*, 1983).

3.5 Modelos animais para o estudo da DA

Umas das principais dificuldades em se estudar doenças neurodegenerativas é o estabelecimento de modelos confiáveis e reprodutíveis. No caso da DA existem alguns modelos animais já bem estabelecidos e que permitiram obter alguns avanços sobre a doença, seu desenvolvimento e tratamento (Kinoshita, 2012; Bellozi, 2014).

Os modelos utilizados geralmente mimetizam os sintomas da DA por reproduzir as lesões da doença, porém geralmente não mimetizam outros mecanismos patogênicos. Alguns modelos induzem a depleção colinérgica nos animais teste, tendo em vista que a redução de acetilcolina (ACh) está relacionada com a perda de algumas capacidades cognitivas e da memória, como visto em modelos de animais tratados com atropina. Um modelo bastante utilizado, que mimetiza os danos gerados pelo acúmulo de placas senis, envolve a injeção de peptídeo β -amiloide 1-40, 1-42 ou 25-35 no hipocampo, podendo ser administrado em apenas um dos hemisférios, ou nos ventrículos (Chen et al., 2010; Passos et al., 2010). Este modelo de injeção intrahipocampal de A β é amplamente utilizado (Freitag et al., 2022; Skrzypczak-Wiercioch e Salat, 2022).

Além dos modelos induzidos por danos, existem os modelos transgênicos de demência, no qual se utiliza animais com predisposição a senescência acelerada (SAMP) das linhagens SAMP 8 e SAMP 10. Existem também os modelos genéticos de Alzheimer desenvolvidos com a criação de camundongos transgênicos capazes de superexpressar proteínas como a APP, ou expressar proteínas mutantes envolvidas na patogenia da DA. Entre os modelos genéticos estão aqueles que envolvem a expressão de presenilina mutante, que induz a deposição de placas senis resultando em perda de memória, morte neuronal e neuroinflamação. Outros modelos envolvem a expressão de proteína tau que leva à formação de NFT (tauP_{301L}). Modelos genéticos podem interferir ou modular a ação de β - e γ -secretase (Chen et al., 2010; Passos et al., 2010; Bellozi, 2014).

3.6 Tratamento farmacológico da DA

Os fármacos atualmente disponíveis para tratar DA apresentam limitações, não conseguindo reverter ou impedir o avanço da doença. Porém, são eficazes em contribuir para uma melhor qualidade de vida do paciente.

A DA era inicialmente conhecida como “síndrome da deficiência colinérgica” e, dessa forma, a principal abordagem da terapia farmacológica envolvia o uso de fármacos para aumentar a função colinérgica no encéfalo, buscando-se obter efeitos benéficos com o uso tanto de agonistas muscarínicos quanto nicotínicos. Segundo Hake (2012), inicialmente testou-se o uso de cloreto de colina e fosfato de colina, que são precursores da síntese de Ach. Estudos randomizados não demonstraram eficácia no uso desses fármacos. Ainda no campo dos agonistas colinérgicos, a administração intracerebroventricular de fármacos como o betanecol demonstrou eficácia na melhora dos sintomas da DA. Porém, este procedimento é de alto risco, já que envolve o implante cirúrgico de um reservatório conectado ao espaço subaracnóideo. O uso de agonistas colinérgicos foi desaconselhado devido à incidência de reações adversas por ativação de vias colinérgicas periféricas, tendo em vista que estes agonistas são pouco seletivos (Hake, 2012).

Dentre as estratégias mais bem adaptadas ao uso clínico, pode-se citar o uso de inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Exemplificando, foi demonstrada melhora transitória leve da memória após tratamento de pacientes com a fisostigmina, embora esta tenha uso limitado devido sua curta meia-vida e à alta probabilidade de produzir reações adversas, ainda que em doses terapêuticas (Hake, 2012).

Atualmente, os inibidores da AChE aprovados pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), pelo FDA (U.S. *Food and Drugs Administration*) e pela EMA (*European Medicines Agency*) são: donepezil, rivastigmina e galantamina. A tacrina foi inicialmente utilizada, porém foi abandonada devido à alta incidência de reações adversas, principalmente hepatotoxicidade (Čolović *et al.*, 2013).

O donepezil inibe seletivamente a AChE no sistema nervoso central (SNC), tendo leve efeito sobre esta enzima em outros sítios do organismo. Possui tempo de meia-vida elevado ($59,7 \pm 16,1$ horas), o que permite uso em dose única diária. A rivastigmina e a galantamina devem ser administradas duas vezes ao dia. Os três fármacos produzem modesta melhora nos índices cognitivos e estão indicados no tratamento de DA leve a moderada. Os seus efeitos adversos são menos graves que os da tacrina e envolvem náuseas, diarreia, vômitos e insônia. A rivastigmina inibe também a butirilcolinesterase (BuChE) e a galantamina também possui atividade agonista nicotínica (Čolović *et al.*, 2013; Ministério da Saúde, 2013).

A memantina, um antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, é utilizada em pacientes com DA mais grave, com resultados satisfatórios (Sinforiani

et al., 2012). O uso de antioxidantes, anti-inflamatórios e hormônios é controverso e não apresenta eficácia comprovada. Também foram desenvolvidos agentes antiagregantes de placas senis e modificadores do processamento da APP (Mendiola-Precoma *et al.*, 2016).

Em 2021, o aducanumabe se tornou o primeiro medicamento modificador de curso da DA a ser aprovado pelo FDA (Cummings *et al.*, 2021). Apesar de demonstrar efetividade em depurar placas amiloides, os dados apresentados ao FDA não demonstraram melhoras clínicas (Walsh *et al.*, 2021). Dois ensaios clínicos duplo-cego de fase 3 realizados em escala global, conduzidos simultaneamente, randomizados e controlados por placebo demonstraram resultados contraditórios. Enquanto um deles demonstrou possível benefício na redução do depósito, indicando benefício no tratamento de pacientes com DA em estágio prodrômico a moderado, o segundo não demonstrou qualquer benefício (Vaz e Silvestre, 2020). Além disso, o uso do aducanumabe apresenta significantes efeitos adversos, alto custo e a necessidade de administração intravenosa (Prillaman, 2022; Salloway *et al.*, 2022). Até o momento, apenas o FDA aprovou o registro do aducanumabe (Mahase, 2021). A EMA negou o registro por considerar os dados insuficientes para determinar a eficácia do medicamento (EMA, 2022).

A imunoterapia emergiu como uma opção de tratamento promissora para a DA, embora ainda permaneçam muitos desafios. Vários anticorpos monoclonais entraram em ensaios clínicos com graus variados de sucesso. O programa clínico de bapineuzumab, um anticorpo monoclonal com elevada afinidade para todas as formas de A β , foi encerrado porque o efeito clínico desejado não foi alcançado. Solanezumab foi desenvolvido para atingir a região intermediária do A β monomérico solúvel. Nos estudos de fase 3, o solanezumab não conseguiu atingir os objetivos clínicos primários. Crenezumab, um anticorpo monoclonal IgG4, que se liga às formas monoméricas e oligoméricas de A β , foi investigado num ensaio de fase 3 com resultados semelhantes. Os resultados dos ensaios clínicos com solanezumab e crenezumab não mostraram sinais de efeito clínico ou foram limitados, e a eliminação da placa foi limitada. Lecanemabe recebeu aprovação acelerada da FDA em janeiro 2023 (Commissioner FDA, 2023). Na União Europeia, o Lecanemabe ainda está em fase de análise de registro (EMA, 2024).

Entretanto, a incerteza em torno do valor clínico e econômico a longo prazo das terapias direcionadas à amiloide destaca a necessidade de uma infraestrutura para

acompanhar o uso destes medicamentos e o seu impacto nos cuidados de rotina (Jönsson *et al.*, 2023).

Muitas estratégias terapêuticas têm sido tentadas ao longo das décadas, mas o tratamento disponível atualmente no Brasil é baseado no tratamento sintomático da DA (Brasil, 2023; Fish *et al.*, 2019). No entanto, pesquisas têm demonstrado que ao menos 30% dos casos de DA podem ser devido a fatores de risco modificáveis (Livingston *et al.*, 2020), o que demonstra a importância de se buscar estratégia multi-alvos e multi-fatoriais, como se observa na potencialidade de produtos naturais, como os derivados de *Hancornia speciosa*.

3.7 *Hancornia speciosa* Gomes

Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae), popularmente conhecida como mangaba, mangava ou mangabeira, é uma árvore frutífera (**figura 3.3**) de clima tropical nativa no Brasil, ocorrendo principalmente nas regiões centro-oeste, norte, nordeste e sudeste. Tem nos frutos o seu principal atrativo, sendo consumidos *in natura*, em virtude de suas características organolépticas e do elevado valor nutritivo. Os frutos também são utilizados na produção de doces, compotas, vinhos, vinagre e, principalmente, sucos e sorvetes, com grande aceitação comercial e utilização agroindustrial (Lederman *et al.*, 2000; Vieira Neto, 2001).

Diversos usos etnomédicos estão registrados na literatura para diferentes partes da planta. A casca possui propriedades adstringentes e é indicada para tratar afecções hepáticas. O látex é utilizado no tratamento de doenças fúngicas, tuberculose, úlceras, herpes, dermatoses e verrugas. O chá das folhas é indicado para o tratamento de cólicas menstruais e o decocto da raiz utilizado para tratar luxações, hipertensão e como hipoglicemiante. Em um estudo etnobotânico de plantas medicinais do cerrado, decoctos da casca foram relatados para o tratamento de diabetes e obesidade, e o unguento das cascas para tratar dermatoses (Rodrigues & Carvalho, 2001; Nogueira *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2007).

Moraes e colaboradores (2008) relataram atividade gastroprotetora e atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* para extratos etanólicos de cascas do caule da espécie. Rufino e colaboradores (2009) comprovaram a atividade captadora de radicais livres usando o modelo DPPH para os frutos da espécie. A atividade anti-inflamatória foi demonstrada em camundongos, associada à inibição da produção de óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2) e citocinas (Marinho *et al.*, 2011), sendo também

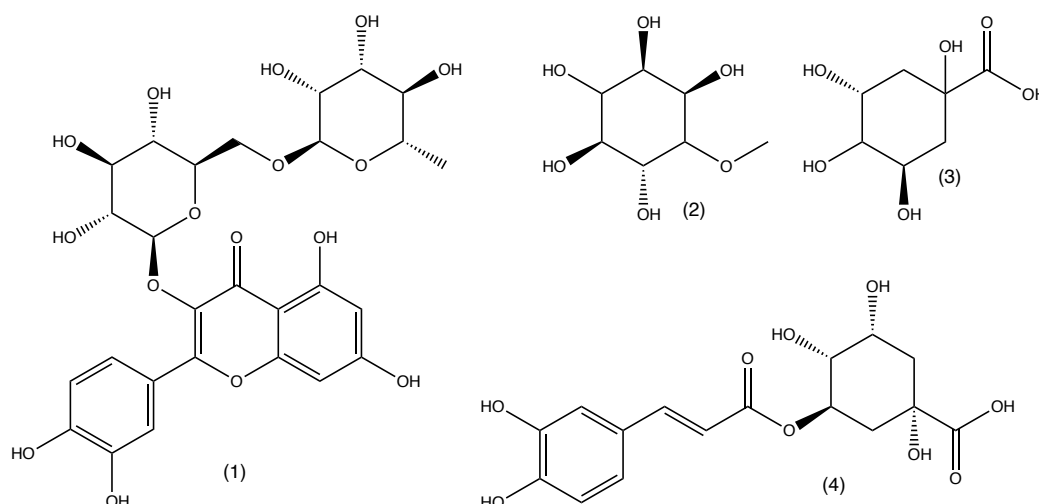
relatada em modelo de edema de pata induzido por carragenina, e atividade hipoglicemiante em ratos com diabetes induzido por aloxana (Klein et al., 1996; Lima & Martins, 1996). A literatura também descreve a atividade antifúngica de *H. speciosa* em ensaios de difusão em ágar (Costa et al., 2008). O látex da espécie foi apontado como ativo contra *Candida albicans* (Silva et al., 2010).

Figura 3.3: Fruto, flores e folhas de *H. speciosa* (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO in *Flora Brasil 2020*)



Nosso grupo de pesquisa vem investigando o potencial farmacológico das folhas de *H. speciosa* há cerca de 15 anos. Assim, a atividade anti-hipertensiva do extrato etanólico de folhas da espécie e de uma fração derivada deste foi caracterizada como resultante de inibição da ECA e de efeito vasodilatador, decorrente do aumento nos níveis de óxido nítrico plasmático. Os principais constituintes bioativos identificados foram rutina (1), bornesitol (2), ácido quínico (3) e ácido clorogênico (4). Também já foi relatada atividade antioxidante e anti-inflamatória de extratos de *H. speciosa* (Endringer et al., 2009; Endringer et al., 2014; Ferreira, 2007; Moreira et al., 2019, 2020; Pereira et al., 2022; Serra et al., 2005; Silva et al., 2011, 2016; Torres-Rêgo et al., 2016).

Serra e colaboradores (2005) relataram a atividade inibitória da ECA *in vitro* para o extrato etanólico das folhas. Em outro trabalho, foi relatada a atividade vasodilatadora do extrato etanólico de folhas em preparações *ex vivo* de anéis de aorta de rato pré-contraídas com fenilefrina, bem como efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica superior de ratos. O efeito vasodilatador foi caracterizado como sendo dependente do endotélio, via óxido nítrico, da ativação de canais de potássio e da liberação de fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Ferreira et al., 2007; Ferreira, 2007).



Silva e colaboradores (2016) demonstraram o mecanismo hipotensor da fração padronizada de *H. speciosa* após administração por via oral nas doses de 0,03 a 1 mg/kg. De acordo com os autores, a redução da resistência periférica pela produção de óxido nítrico (NO) e aumento da produção de H_2O_2 nas artérias mesentéricas de ratos hipertensos seria responsável pela resposta hipotensora. Em um estudo anterior, os autores demonstraram que uma fração padronizada de *H. speciosa* enriquecida em ciclitóis, como o bornesitol, e em flavonoides, como a rutina, produziu efeito hipotensor em camundongos normotensos. Houve uma redução significativa da pressão arterial sistólica em ratos normotensos após a administração intraperitoneal e oral da fração nas doses de 1 a 100 mg/Kg. De acordo com os resultados, o mecanismo de ação envolve a inibição da ECA, redução da produção de angiotensina II, efeito vasodilatador direto pela ativação de proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e de canais de potássio, bem como aumento dos níveis séricos de óxido nítrico (Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2016).

Em trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, o fracionamento cromatográfico do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* resultou no isolamento de L-(+)-bornesitol (2) e rutina (1), definidos como marcadores químicos da espécie (Endringer, 2007). Bornesitol foi identificado como constituinte majoritário de extratos etanólicos de folhas de diferentes acessos genéticos de *H. speciosa*, atingindo teores superiores a 8% m/m em algumas amostras (Pereira *et al.*, 2012).

Conforme indicado anteriormente, um dos constituintes anti-hipertensivos de *H. speciosa* já identificados é o bornesitol [(1,2,3,5/4,6)-1-O-metil-*mio*-inositol] (2), um derivado de *mio*-inositol encontrado em diversas espécies de plantas (NISHBE *et al.*, 2001). Esta substância é um ciclitol e sua estrutura química apresenta apenas um

grupo hidroxila na posição axial, estando os demais na posição equatorial (2) (Post e Anderson, 2002).

Além do efeito inibitório da ECA, também foi avaliado, pelo nosso grupo o efeito inibitório do bornesitol sobre o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), o qual é observado em alguns inibidores da ECA em uso clínico, como o captopril, e atua como um efeito adicional no tratamento de doenças cardiovasculares. Tanto o extrato de *H. speciosa* quanto o bornesitol isolado apresentaram significativa inibição do NF- κ B (Endringer *et al.*, 2009).

Sua potente atividade anti-hipertensiva já foi demonstrada por nosso grupo de pesquisa em uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo* (Ferreira *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011). Bonesitol apresenta potente atividade inibitória da ECA, *in vitro*, e estudos de *docking* molecular demonstraram que este e outros ciclitois se ligam à mesma região da ECA humana, a qual é diferente de inibidores clássicos da ECA, como o captopril (Endringer *et al.*, 2014).

Estudos em modelo de camundongos hipertensos induzido por acetato de deoxicorticosterona (DOCA-SAL), um extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* enriquecido em bornesitol e flavonoides demonstrou redução da pressão arterial sistólica, sendo este efeito de longa duração e em doses baixas (0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg) (Silva *et al.*, 2016).

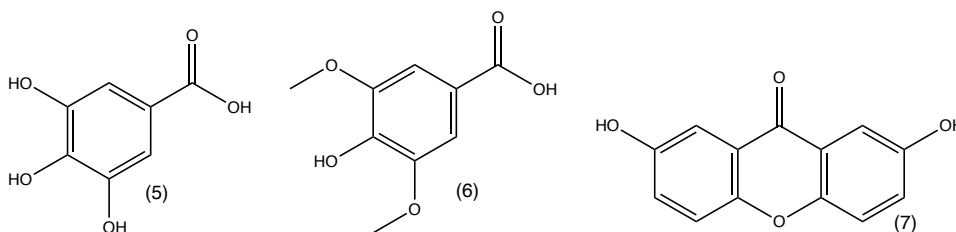
Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o bornesitol reduz a pressão sanguínea de ratos Wistar, em baixas doses (1,0 e 3,0 mg/kg), quando administrado por via intravenosa. O mecanismo de ação envolve a inibição sistêmica da ECA e o aumento da produção de NO. Estes resultados ressaltam os achados anteriores de que o bornesitol é um marcador biológico da atividade anti-hipertensiva de *H. speciosa* (Moreira *et al.*, 2019).

Nosso grupo de pesquisa também demonstrou que um extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* é capaz de reduzir a concentração de glicose no sangue através da inibição da α -glicosidase intestinal e estimulação da captação de glicose pelos adipócitos *in vitro* e por avaliação indireta de α -glicosidase e por teste de tolerância à glicose *in vivo*, em camundongos submetidos a sobrecarga de amido (Pereira *et al.*, 2015). Além disso, Tomazi *et al.* (2021) demonstraram o efeito hipoglicemiante de um extrato aquoso do látex de *H. speciosa* em modelo *in vivo*, no qual zebrafish foi tratado com o extrato após injeção intraperitoneal de aloxana. Neste trabalho, também, foi demonstrada a capacidade de alguns constituintes do extrato em inibir enzimas

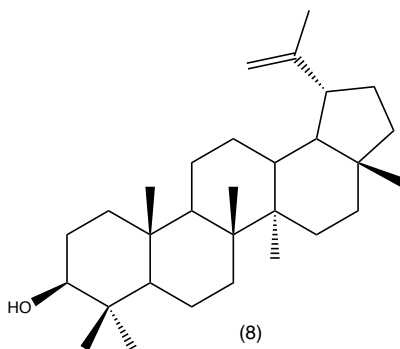
relacionadas ao metabolismo de carboidratos (β -galactosidase e maltase-glucoamilase). Estudos computacionais sugeriram que este efeito pode ser, pelo menos parcialmente, devido à presença de bornesitol, uma vez que demonstraram a capacidade de inositóis em interagir com as estas enzimas.

Nosso grupo de pesquisa também realizou a avaliação da toxicidade pré-clínica de um extrato padronizado de folhas de *H. speciosa*. A partir dos resultados do estudo de toxicidade aguda, o extrato foi classificado na categoria 5 do *Globally Harmonized System*, possuindo baixa toxicidade oral em dose única (resultados não publicados). Da mesma maneira, nos estudos de toxicidade crônica não foram encontrados indícios de toxicidade expressiva para os animais tratados, sendo observados valores elevados da enzima creatinina quinase (CK). Um aumento semelhante na atividade dessa enzima já foi descrito na literatura para diversos fármacos, incluindo lidocaína D, penicilina, quinidina e succinilcolina, entre outros (Motta, 2010), mesmo em doses terapêuticas, não constituindo um empecilho para seu uso clínico.

A composição química de *H. speciosa* também inclui ácidos orgânicos e seus derivados, como os ácidos gálico (5), siríngico (6), 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico, 3-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico) (4) e 5-O-cafeoilquínico, além de *cis*-clorogenato de metila, *trans*-clorogenato de metila, 2,7-diidroxixantona (7) e 2,7-dimetoxixantona, bem como procianidinas do tipo B (Rodrigues *et al.*, 2006).



Outros compostos apolares foram obtidos através do fracionamento dos extratos hexânico e etanólico de folhas de *H. speciosa*. O extrato hexânico resultou em uma mistura de hidrocarbonetos, álcoois de cadeia longa e triterpenos como o lupeol (8). No extrato etanólico foram identificados rutina (1) e ácido clorogênico (4) (Barros, 2008).



3.8 Produtos naturais com atividade neuroprotetora: polifenóis e ciclóis

Produtos naturais com atividade anti-inflamatória, antioxidante e anti-amiloidogênica podem interagir com mediadores neuroinflamatórios. A permeabilidade de diversos desses produtos através da barreira hematoencefálica (BHE) permanece inconclusiva, mas alguns deles são capazes de atravessar a BHE (Kam *et al.*, 2012).

Existem relatos na literatura do potencial neuroprotetor de compostos polifenólicos. Dentre estes compostos, destacam-se os flavonoides. Dentre os efeitos benéficos relatados para esta classe de metabólitos, estão inclusos a proteção contra neurotoxinas, melhora do aprendizado e da memória, além de outras funções cognitivas, e decréscimo da inflamação neuronal. Estes efeitos são devidos, principalmente, a dois principais mecanismos primários: a angiogênese e a ação na sinalização neuronal. Estes dois mecanismos resultam na proliferação neuronal, principalmente no hipocampo, e aumento da sobrevivência neuronal (Al Amin *et al.*, 2024).

Quercetina, um flavonoide de ampla ocorrência e extraído de diversas plantas, como *Morus alba* (Dajas, 2012), reverteu o dano neurodegenerativo induzido por manganês em ratos Dawley Sprague. O efeito neuroprotetor foi atribuído à capacidade da quercetina em reduzir o estresse oxidativo induzido por manganês (Bahar *et al.*, 2017). Descamps (2013) identificou que dois flavonoides, rutina e galangina, encontrados em *Fagopyrum esculentum* e *Alpinia officinarum*, respectivamente, são capazes de impedir a clivagem de BACE1 atuando como inibidores seletivos de β APP-BACE1, em animais tratados *per os*, desta forma atuando no controle da produção excessiva de A β .

Um extrato de *Nelumbo nucifera* enriquecido em proantocianidinas, administrado *per os* nas doses de 30, 60 e 90 mg/kg, por seis semanas, levou à melhora do aprendizado e memória em modelo murino de dano induzido por D-

galactose (modelo de DA), assim como reduziu significativamente a concentração de NO e A β , e a atividade das enzimas monoamino oxidase do tipo B e acetilcolinesterase (Gong *et al.*, 2016).

Camundongos transgênicos Tg2576 para DA foram tratados com catequina, na dose de 80 mg/kg/dia, *per os*, e com uma mistura de proantocianidinas, na dose de 120 mg/kg/dia, *per os*, por 5 meses. Os animais apresentaram benefícios cognitivos através da melhora da plasticidade sináptica no encéfalo (Wang *et al.*, 2012).

Compostos polifenólicos com atividade antidiabética descrita também poderiam atuar benéficamente no SNC. A insulina pode ser transportada através da barreira hematoencefálica, ligando-se aos substratos do receptor de insulina, mediando assim as vias de sinalização da insulina para regular as funções fisiológicas. As vias de sinalização da insulina prejudicadas, incluindo as vias PI3K/Akt/GSK3 β e MAPK, podem causar danos ao cérebro na patogênese da DA. A disfunção mitocondrial e a superexpressão de TXNIP também podem ser ligações causais entre DA e diabetes (Wang *et al.*, 2023).

Neste sentido, alguns compostos polifenólicos já foram descritos como potencialmente úteis no tratamento concomitante das duas patologias, diabetes e DA. Dentre estes, a curcumina demonstrou potencial em reduzir o declínio da memória e em regular o metabolismo da glicose em camundongos transgênicos APP^{swe}/PS1^{dE9}, agindo por meio da via da PI3K/Akt e atuando nos receptores de insulina (Wang *et al.*, 2017). Achados semelhantes também foram relatados para o resveratrol, que regula o metabolismo da glicose e inibe a fosforilação da proteína tau através da via da PI3K/Akt (Ghafouri-Fard *et al.*, 2022). Na mesma direção, a quercetina inibe a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo, atuando, também, no controle do metabolismo da glicose e na prevenção do comprometimento cognitivo, com ação principalmente pela via da MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) (Zu *et al.*, 2021).

Em resumo, os flavonóides têm recebido considerável atenção como candidatos para a terapia da DA, tendo em conta as suas propriedades antiamiloidogênicas, antioxidantes e anti-inflamatórias. Diversas evidências experimentais sugerem que eles possam melhorar a memória e a função cognitiva e prevenir a neurodegeneração. Entre os flavonoides promissores para o tratamento de doenças neurodegenerativas estão a miricetina, rutina, quercetina, fisetina, canferol, apigenina e hesperidina, que demonstraram, *in vitro*, possuir atividades

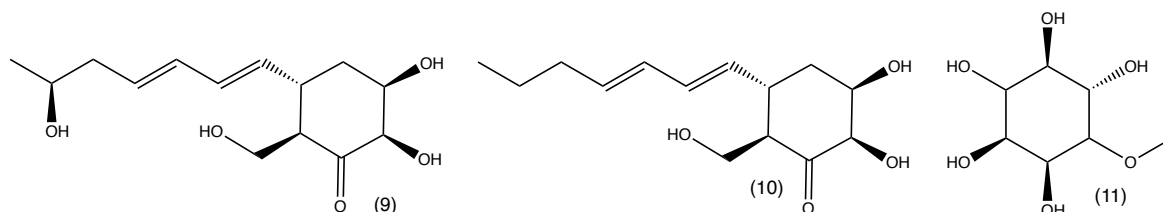
antiamiloidogênicas e desestabilizadoras de fibrilas, sendo capazes de atuar como quelantes de metais e de reduzir o estresse oxidativo (Bellavite, 2023).

Dentre os compostos polifenólicos também se destacam as proantocianidinas como potencialmente úteis para a prevenção e tratamento da DA. As proantocianidinas podem atenuar os achados patológicos da DA, como os depósitos amiloides extracelulares e emaranhados neurofibrilares através da redução do acúmulo de A β e da proteína tau hiperfosforilada. As proantocianidinas podem atuar melhorando a perda cognitiva e modulando a plasticidade sináptica. Dentre os possíveis mecanismos relatados, estão a regulação positiva do regulador de informação silenciosa 1 (SIRT1), que é essencial para a plasticidade cognitiva e sináptica normal, e estimulação do elemento de ligação e resposta de cAMP (CREB), que atua na mudança da memória de curto prazo para a de longo de prazo. Com base na interação das procianidinas com o eixo CREB-SIRT1, é provável que elas promovam a função cognitiva e reduzam os danos da DA (Zhao *et al.*, 2019). Neste mesmo sentido, uma fração enriquecida em proantocianidinas de sementes de lótus foi capaz de levar a uma melhora cognitiva e a uma redução dos depósitos de A β e uma marcada redução da fosforilação de CREB, em camundongos transgênicos APP/PS1 (Wang *et al.*, 2023).

É importante reforçar que diversos trabalhos já relataram as potencialidades de proantocianidinas em agir em diferentes processos patológicos que poderiam interferir na patogênese da DA. Dentre eles, podem ser citadas as ações de (a) redução da neurotoxicidade de A β pela inibição agregação, demonstrada *in vitro* em células SH-SY5Y (Mizuno *et al.*, 2019) e PC-12 (Toda *et al.*, 2011) estimuladas com A β 1-42, (b) regulação da oxidação e ativação da sinalização CREB/BDNF, relatada em células PC-12 (Huang *et al.*, 2018), (c) redução da hiperativação de micróglia e estresse oxidativo, observada em ratos Wistar que receberam injeção intrahipocampal de A β 1-40 (N'Go *et al.*, 2021) e (d) inibição da agregação de polipeptídeo amiloide de ilhotas humanas, que também está relacionado ao desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2 (Xu *et al.*, 2021).

Dentre os produtos naturais com potencial atividade na DA ressalta-se ainda os derivados do ácido quínico, a saber, os ácidos 3,4-di-O-cafeoil-muco-quínico e o 5,4-dicafeoil-quínico. Estes derivados apresentaram efeito protetor de dano induzido por tetra-hidropapaverolina em modelo de células de glioma, conforme descrito em uma revisão sistemática por Shal e colaboradores (2018). Em estudo *in vitro* realizado

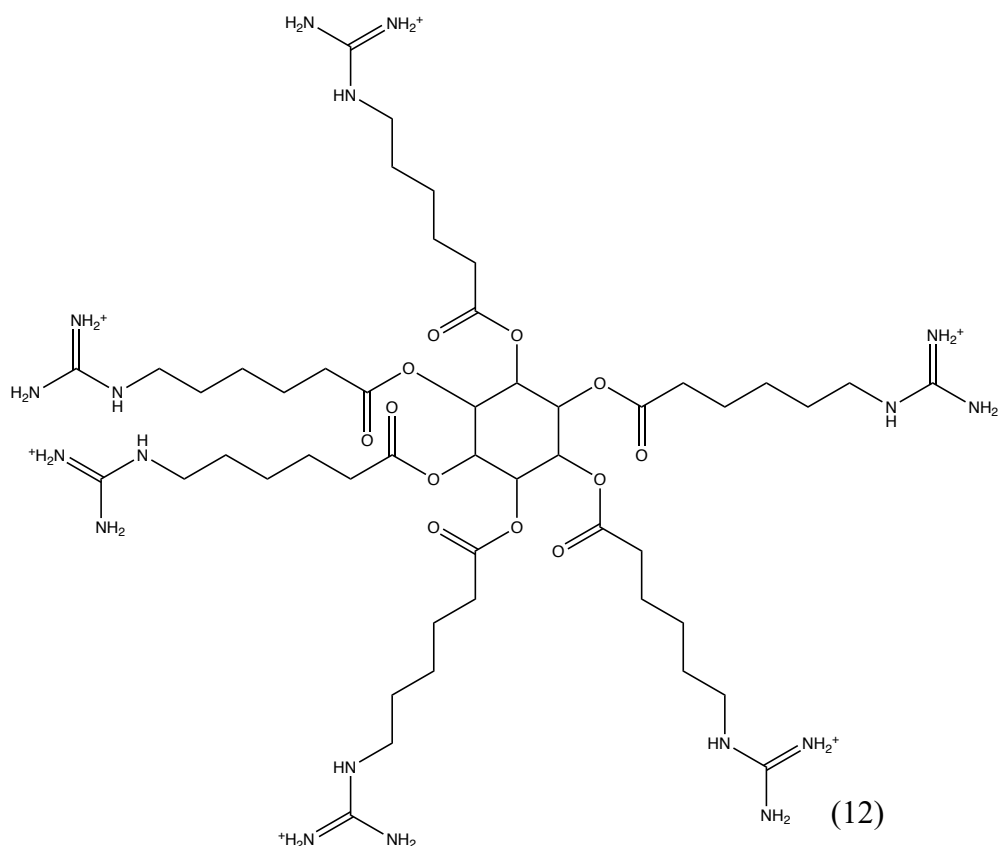
por Huang e colaboradores (2014), o ciclitol 13-hidroxipalitantina (9), isolado de fungos do gênero *Penicillium*, exibiu atividade inibitória da AChE ($CI_{50} = 12 \mu M$), enquanto um derivado, que não possui uma hidroxila na posição 13 (10), foi significativamente mais potente ($CI_{50} = 79 \text{ nM}$). Por sua vez, o 3-O-metil-D-inositol (11), isolado de folhas de *Bauhinia rufescens*, também apresentou atividade inibitória da AChE *in vitro* ($IC_{50} = 463,77 \mu M$) (Muhammad *et al.*, 2018).



O desequilíbrio na concentração de inositol é associado a algumas doenças neurodegenerativas, incluindo a DA. Em cérebros de pacientes com DA há um aumento dos níveis de mio-inositol comparado a pessoas saudáveis, sendo este achado associado ao acúmulo de depósitos neurotóxicos de amiloide (Frej *et al.*, 2017).

Em uma revisão de literatura, Derkaczew *et al.* (2023) concluíram que alterações no metabolismo do *mio*-inositol podem contribuir para o desenvolvimento de doenças que levam à atrofia de estruturas cerebrais, seja pela promoção da deposição de proteínas ou pelo aumento da liberação de cálcio, o que acaba resultando no aumento da degeneração neuronal. O uso de suplementação adequada poderia aumentar significativamente a qualidade de vida dos pacientes com doenças neurodegenerativas de diversas etiologias.

Um derivado de *scilo*-inositol (AAD-66), administrado nas doses de 25 a 30 mg/dia, *per os*, por 10 semanas, (12) promoveu melhoras no déficit cognitivo de camundongos transgênicos 5xFAD (Tg6799), mutantes na APP/PS1, testados em modelo de labirinto em Y e de labirinto aquático de Morris, além de reduzir os depósitos de A β no cérebro destes animais (Lee *et al.*, 2017).



3.9 Efeito de *H. speciosa* sobre a cognição

Anteriormente, ao avaliarmos os efeitos de um extrato hidroacetônico de *H. speciosa* sobre a cognição de camundongos submetidos à cirurgia esterotáxica para a injeção intrahipocampal de A β ₁₋₄₂, obtivemos resultados que apontaram para o seu potencial neuroprotetor (Carneiro Junior, 2020). Desta forma, considera-se importante relatar os principais resultados obtidos anteriormente.

A injeção intra-hipocampal de A β ₁₋₄₂ induziu perda cognitiva nos camundongos avaliados pela tarefa de reconhecimento de objetos (TRO) ($50,1 \pm 7,2\%$, $n = 10$) quando comparado ao grupo controle ($73,3 \pm 8,5\%$, $n = 9$) ($p < 0,01$). O déficit cognitivo induzido por A β ₁₋₄₂ foi revertido pelo tratamento por via oral dos camundongos com o extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HPF1) nas doses de 30 ($68,6 \pm 14,2\%$, $n = 8$) e 100 mg/kg ($78,4 \pm 7,0\%$, $n = 9$) (Carneiro Junior, 2020). Os valores percentuais entre parênteses representam a taxa de reconhecimento do objeto novo, indicando se foi observado, ou não, melhora cognitiva nos animais. Quanto mais alto o valor percentual, maior foi o reconhecimento do objeto.

O mesmo extrato foi avaliado no modelo de medo condicionado ao contexto. Observou-se que a injeção intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$ induziu perda cognitiva nos camundongos ($14,4 \pm 8,4\%$, $n = 10$) quando comparado ao grupo controle ($45,3 \pm 3,5\%$, $n = 9$), sendo a perda cognitiva entendida como menor tempo de *freezing* dos animais. O déficit cognitivo induzido por $A\beta_{1-42}$ foi revertido pelo tratamento dos camundongos com HPF1 nas doses de 30 ($46,6 \pm 6,8\%$, $n = 9$) e 100 mg/kg ($47,4 \pm 4,3\%$, $n = 9$) (Carneiro Junior, 2020).

Os resultados obtidos nos dois testes comportamentais realizados indicam que o extrato em acetona / água (70:30) de folhas de *H. speciosa* reverteu significativamente a perda cognitiva induzida por injeção intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$ nas doses de 30 e 100 mg/kg.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 EQUIPAMENTOS, REAGENTES E MATERIAIS DE CONSUMO

4.1.1 Equipamentos

- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB204.
- Balança analítica Sartorius, modelo BP 211D.
- Balança semi analítica Núcleo, modelo NC 1000.
- Balança semi analítica Sartorius, modelo BP 3100 S.
- Banho-maria Fanem, modelo 146.
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400.
- Bomba peristáltica de bancada Watson Marlow, modelo 120S.
- Capela de fluxo laminar vertical Veco, modelo BioProtector 09
- Centrífuga Quimis, modelo Q222TM.
- Estufa de secagem Fanem, modelo 502 A.
- Estufa de CO₂ Forma Scientific, modelo 3158.
- Evaporador rotatório Buchi, modelo R-114.
- Lavador de microplacas Bio-Rad, modelo ImmunoWash 1575.
- Liofilizador de bancada LioTOP K105.
- Medidor de pH Metrohm, modelo 827 pH lab.
- Microscópio Olympus, modelo CKX41.
- Moinho de facas.
- Sistema de cromatografia a líquido de ultra eficiência Waters, modelo Acquity H-Class, equipado com injetor automático, detector de arranjo de diodos (DAD) 2996, espectrômetro de massas triplo quadrupolo Waters, modelo TQ-XS, equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI) e software MassLynx para processamento de dados.
- Sistema de purificação de água Tipo 1 (ultrapura) Millipore, modelo Direct-Q 3.
- Soprador térmico serigráfico Skil, modelo 8003 1800W.
- Ultra centrífuga Hermle, modelo Z 323 K.
- Ultrafreezer Liobras.
- Vórtex Mixer, Vixar.

4.1.2 Solventes, reagentes e material de consumo

- Acetato de etila grau P.A., Vetec.
- Acetona grau P.A., Vetec.
- Acetonitrila grau CLAE, Tedia.
- Ácido acético glacial grau P.A., Neon.
- Ácido clorídrico grau P.A., Alphatec.
- Ácido clorídrico grau P.A., Vetec.
- Ácido clorogênico, 95% de pureza, Sigma
- Ácido fórmico grau CLAE, Sigma-Aldrich.
- Ácido sulfúrico grau P.A., Isofar.
- Albumina de soro bovino (BSA), Sigma.
- Álcool etílico comercial, Emfal.
- Amiloide-beta 1-42 (ref.: 03112; lote: 75949914); Life Technologies.
- Aminoácidos não-essenciais, Gibco.
- Anasedan (cloridrato de xilazina 2%), Ceva.
- Anisaldeído grau P.A., Vetec.
- Brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT), Sigma Aldrich.
- *n*-Butanol grau P.A., Synth.
- Cetamin (cloridrato de cetamina 10%), Syntec.
- Cloreto de sódio, Sigma-Aldrich.
- Fosfato de sódio bibásico, Merck.
- Fosfato de sódio monobásico, Merck.
- Hidróxido de sódio, Merck.
- Peróxido de hidrogênio 5%, Synth.
- Sacarose, Merck.
- Coluna para CLUE ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (1,7 µm; 2,1 × 50 mm d.i.).
- Cromatofolhas (Al) de sílica gel 60, Merck.
- Dexametasona, Sigma.
- Diclorometano grau P.A., Neon.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) grau P.A., Sigma-Aldrich.
- Epicatequina(4beta-->8)epicatequina, 90% de pureza, Extrasynthese.
- Etanol absoluto grau P.A., LS Chemicals.

- Etanol absoluto grau P.A., Neon.
- L-glutamina, Gibco.
- Fosfato de sódio bibásico, Merck.
- Frascos para cultura celular com tampa com filtro, não tratados, de 25 cm² e 75 cm², Corning.
- *n*-Hexano grau P.A., Neon.
- Kit ELISA IL-1 β humano, DY201 Duo Set, R&D Systems.
- Kit ELISA TNF- α humano, DY210 Duo Set, R&D Systems.
- Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), Sigma.
- Meio de cultura DMEM/F12, Gibco.
- Metanol grau CLAE, Merck.
- Metanol grau P.A., Neon.
- Microplaca de 96 poços para cultivo celular, CellStar 655180, Greiner-Bio-One.
- Microplaca de 96 poços para imunoensaio, Nunc F, MaxiSorp, Invitrogen.
- Pipetas sorológicas descartáveis, estéreis, de 5 mL, 10 mL e 25 mL, Sarstedt.
- Piruvato, Gibco.
- Rutina tri-hidratada, 95% de pureza, Sigma.
- Sephadex LH-20, Sigma.
- Seringa estéril para insulina descartável de 1 mL, SR.
- Sistema de filtração esterilizante, descartável, membrana de 0,22 μ m, capacidade para 500 mL e 1000 mL, Corning.
- Soro fetal bovino estéril, Gibco, Invitrogen.
- Tolueno grau P.A., Vetec.
- Tubo de plástico tipo safe-lock de 2 mL, MDI.
- Tubos para centrifuga tipo Falcon, em polipropileno, de 15 mL e 50 mL, Corning.
- Tubos para centrifuga tipo Falcon, em polipropileno, de 15 mL e 50 mL, Sarstedt.
- Unidade filtrante PTFE 0,22 e 0,45 μ m, Corning.
- Vanilina P.A., Isofar.

4.1.3 Vidrarias e materiais diversos

- Béqueres, provetas, e balões de fundo redondo de diferentes tamanhos.

- Borrifador de vidro.
- Câmara de Neubauer, Labor Optik.
- Coluna cromatográfica de vidro de 73 cm × 3,5 cm d.i.
- Contador manual de células, Milky Way.
- Cromatoplasmas de vidro de 5 × 10 cm e 10 × 10 cm.
- Cubas cromatográficas de vidro Pyrex.
- Dessecador de vidro com saída a vácuo Pyrex.
- Erlenmeyers e funis de separação de diferentes volumes.
- Frascos de cintilação de vidro com tampa de 20 mL, Sigma Aldrich.
- Lamínulas para câmara de Neubauer.
- Micropipeta automática multicanal de 10-200 µL, Brand, modelo Transferpette electronic.
- Micropipetas manuais monocanais de 0,5-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 1000-5000 µL, Eppendorf.
- Microseringa 10 µL, agulha fixa – Hamilton, modelo 80300 / Sge 002000.
- Percolador em aço inox 304, com tampa e disco perfurado, capacidade para 3 litros.
- Pipeta de Pasteur de vidro.
- Seringas e agulhas de diferentes dimensões.
- Vials de vidro de 2 mL com tampas e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de CLAE e UPLC-MS, Analítica.

4.2 Reveladores para Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

- Reagente anisaldeído - ácido sulfúrico (WAGNER & BLADT, 1996):

Misturaram-se 0,5 mL de anisaldeído, 10,0 mL de ácido acético glacial, 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, sob resfriamento, nesta ordem.

- Reagente vanilina – ácido sulfúrico (WAGNER & BLADT, 1996):

Pesou-se 1,0 g de vanilina grau PA e dissolveu-se em 100 mL de etanol, e armazenou-se. Misturaram-se 5 mL de ácido sulfúrico em 100 mL de etanol. As soluções foram adicionadas, no momento do uso, na proporção (1:1).

4.3 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *H. speciosa* foram adquiridas secas e rasuradas do Laboratório Catedral e material testemunho foi depositado no Herbário BHCB sob número 165.298.

4.4 PREPARO DO EXTRATO

O extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* foi obtido e caracterizado em trabalho anterior do grupo (Carneiro Junior, 2020). No presente trabalho, objetivou-se obter maior massa do extrato para a realização de ensaios biológicos, bem como para avaliar a reprodutibilidade do processo extrativo.

Para tanto, uma quantidade adicional do extrato foi preparado conforme descrito em trabalho anterior (Carneiro Junior, 2020). Deste modo, uma porção de 200 gramas do material vegetal foi pulverizada em moinho de facas e submetido à extração por percolação exaustiva, com solução de acetona / água (70:30), à temperatura ambiente, durante 20 dias. O extrato obtido foi concentrado, sob pressão reduzida, em rotoevaporador, à 50 °C, e a água residual foi removida por liofilização. Após a liofilização, o extrato foi mantido em dessecador, sob vácuo, para impedir a absorção de água da umidade ambiente.

Após seco, obteve-se 70,8 gramas de extrato de *H. speciosa* em acetona/água (70:30), com um rendimento de 35,4% (m/m).

4.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20

Uma porção do extrato em acetona/água (70:30) de folhas de *H. speciosa* (1,5 g) foi solubilizada em 5 mL de EtOH (PA) e sonicada em banho de ultrassom por 30 min. A solução foi então centrifugada a $820 \times g$, por 10 minutos, e o precipitado foi novamente sonificado, por 10 minutos, com 5 mL de EtOH. Este procedimento foi repetido 5 vezes. Ao fim, descontando a perda de massa do extrato que não solubilizou em EtOH, utilizou-se 1,0 g, do extrato que foi solúvel nas solubilizações descritas, concentrados em volume final de 5 mL de EtOH. Esta solução foi então aplicada no topo de uma coluna de vidro ($73 \times 3,5$ cm, d.i.) empacotada com Sephadex LH20 (270,10 g).

As frações foram coletadas com auxílio de coletor automático de frações, sendo recolhidos aproximadamente 25 mL (volume de 500 gotas) por tubo de ensaio, a um fluxo de eluição de 1,0 mL/min. A eluição foi realizada com EtOH (PA), seguido de

diferentes proporções de EtOH / acetona; acetona / MeOH; MeOH e EtOH / água, sendo os resultados apresentados na **tabela 4.1**. A coluna foi recondicionada com EtOH ao fim de cada fracionamento.

Após este primeiro fracionamento, foi realizado um refracionamento em condição isocrática (metanol/água 70:30).

Tabela 4.1 Fracionamento do extrato em acetona/água (70:30) de *H. speciosa* em coluna de Sephadex LH20.

Fração (HsFr)	Solvente	Massa (mg)	Rendimento (%)
1	EtOH	337	33,7
2	EtOH/Acetona (9:1)	239,8	24,0
3	EtOH/Acetona (7:3)	16,9	1,7
4	EtOH/Acetona (1:1)	5,8	0,6
5	EtOH/Acetona (2:8)	75,8	7,6
6	MeOH/Acetona (1:1)	119,7	12,0
7	MeOH	101,8	10,2
8	Água/Etanol (1:1)	11,6	1,2
9	Água/Acetona (1:1)	62,7	6,3
TOTAL		908,4	90,8
TOTAL APLICADO NA COLUNA:		1000,0	

4.6 ANÁLISE DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *H. speciosa* POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ULTRAEFICIÊNCIA (CLUE)

4.6.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas diretamente em tudo plásticos do tipo *safe lock* e solubilizadas em metanol grau CLAE. Foram empregadas concentrações de 1 mg/mL para o extrato e de 0,5 mg/mL para as frações.

Todas as amostras foram solubilizadas com auxílio de banho de ultrassom, durante 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a $8480 \times g$, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de seringa do tipo politetrafluoretileno (PTFE) de 0,22 μm de tamanho de poro e transferidos para *vials* de vidro com tampa rosqueável. O volume de injeção foi de 5 μL , injetado de forma automática em sistema CLUE.

4.6.2 Condições cromatográficas

Para a obtenção dos perfis cromatográficos, empregou-se coluna ACQUITY UPLC® BEH Shield, RP18 (1,7 μm ; 2,1 $\times$ 50 mm, d.i.), detecção por detector de arranjo de diodos (DAD), com varredura de 200 a 400 nm, fluxo de 0,3 mL/minuto e temperatura de 40 °C. Foi utilizada eluição em gradiente linear de acetonitrila grau CLAE e água ultrapura grau 1, sendo ambos solventes acidificados com 0,1% v/v de ácido fórmico grau CLAE, seguido de etapas isocráticas para limpeza e recondicionamento da coluna (**tabela 4.2**).

Tabela 4.2 – Gradiente de eluição empregado para a obtenção dos perfis cromatográficos por CLUE.

Tempo (minutos)	*Água (%)	*Acetonitrila (%)
0,0	85	15
5,0	65	35
5,5	5	95
6,5	5	95
7,0	85	15
10,0	85	15

*Acidificados com 0,1% v/v de ácido fórmico.

4.7 DEGRADAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO E FRAÇÃO POR TIÓLISE

A tiólise para a análise de proantocianidinas foi realizada conforme descrito por Gea *et al.* (2011), com modificações.

A amostra (extrato de folhas de *H. speciosa* ou fração enriquecida em proantocianidinas) foi dissolvida, por sonicação, em metanol grau CLAE, para concentração de 4 mg/mL. Desta solução, 50 µL foram transferidos para tubo plástico do tipo *safe lock* de 1,50 mL. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de metanol acidificado com ácido clorídrico (3,3%; i.e., 8,92 mL de HCl 37% em 100 mL de solução metanólica). Em seguida, adicionou-se 100 µL de benzilmercaptano (5% v/v), em metanol.

O tubo foi fechado, lacrado com Parafilm e incubado à 40, 45 ou 50 °C, por 30 minutos. A reação foi interrompida introduzindo o tubo em banho de gelo. Após o término da reação, adicionou-se 250 µL de água ultrapura grau 1. As amostras foram centrifugadas, os sobrenadantes foram filtrados (PTFE; 0,22 µm) e transferidos para *vials* de vidro. Os *vials* foram estocados à -22 °C até o momento da análise, a qual ocorreu em período inferior a 24 horas após a interrupção da reação.

Os sobrenadantes foram analisados por CLUE acoplado a detector de arranjo de diodos e a espectrômetro de massas. As condições analíticas foram as mesmas descritas nos itens 4.7 e 4.9.

4.8 MÉTODO CROMATOGRÁFICO E ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS

4.8.1 Análises por cromatografia a líquido de ultra-eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLUE-EM)

Os perfis cromatográficos do extrato de folhas de *H. speciosa* e das frações selecionadas oriundas do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 foram avaliadas por CLUE-EM.

4.8.1.1 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.7.1.

4.8.1.2 Condições cromatográficas

Para a obtenção dos perfis cromatográficos, empregou-se coluna ACQUITY UPLC® BEH Shield, RP18 (1,7 µm; 2,1 × 50 mm d.i.), detecção por detector de arranjo

de diodos (DAD), com varredura de 200 a 500 nm, fluxo de 0,300 mL/minuto e temperatura de 40 °C. Foi utilizada eluição em gradiente de acetonitrila grau CLAE e água ultrapura grau 1, sendo ambos solventes acidificados com 0,1% v/v de ácido fórmico grau CLAE (**tabela 4.2**). Foi inserido um intervalo de 5 minutos entre cada injeção para reequilibrar a coluna. Os solventes foram submetidos a banho de ultrassom por 15 minutos e a função *degasser* do equipamento foi ativada para remoção do ar presente nos eluentes.

4.8.1.3 Parâmetros do espectrômetro de massas

Foi empregado um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (TQ-D, Waters), com ionização por *electrospray* em 35 V. A temperatura da fonte foi ajustada em 120 °C, enquanto a temperatura e o fluxo do gás de dessolvatação foram mantidos a 350 °C e 500 L/h, respectivamente. As análises foram realizadas no modo *MS Scan*, sendo monitorada uma faixa de massas de 100 a 2000 Daltons com ionização em modo positivo e negativo. Já no modo *Daughter Scan*, adotou-se uma faixa de massas variável (de acordo com a massa do íon precursor fragmentado), no modo de ionização negativo e energia de colisão com rampa de 20 a 70 V.

4.9 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS DE HSE POR LC-MS-ESI

Para a quantificação, foi empregado o método de MRM descrito no **item 4.10.1.1**.

4.9.1 Método analítico estabelecido para a quantificação dos marcadores químicos de HsE por UPLC-MS

Abaixo será descrito os parâmetros analisados no desenvolvimento do método analítico.

4.9.1.1 Estabelecimento de condições de monitoramento de reações múltiplas (MRM) para análise de marcadores químicos

A fim de desenvolver método para quantificação de marcadores químicos no extrato acetônico de *H. speciosa* procedeu-se com a determinação dos parâmetros

de monitoramento de reações múltiplas (MRM) para a análise de bornesitol, rutina, ácido clorogênico e proantocianidina do tipo B (epicatequina(4beta-->8)epicatequina, Extrasynthese, 90% de pureza).

Para tanto, preparou-se uma solução a 10 µg/mL de rutina, bornesitol, ácido clorogênico e proantocianidina do tipo B. Esta solução foi analisada por infusão direta em espectrômetro de massas do tipo TQ-D (Waters). A infusão direta foi realizada de modo combinado com o fluxo de eluentes que foram utilizados nas condições iniciais da análise cromatográfica.

Utilizou-se a ferramenta *intelli start* para a determinação automática dos parâmetros otimizados para a análise de transições específicas para cada um dos analitos. Posteriormente, realizou-se a otimização manual dos parâmetros apresentados.

4.9.1.2 Validação do método analítico

A validação do método cromatográfico e espectroscópico desenvolvido foi realizada em acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017).

As análises estatísticas foram realizadas nos softwares Microsoft Excel, versão 16.45 (Microsoft Corporation, 2024) e GraphPad Prism, versão 9.3.1 (GraphPad Software, 2021).

4.9.1.3 Preparo das soluções de análise

As soluções padrão utilizadas na análise foram preparadas no dia do ensaio, pesando-se exatamente 1,0 mg de cada um dos analitos avaliados (bornesitol, procianidina B2, rutina e ácido clorogênico), em tubos plásticos do tipo safe-lock de 2,0 mL de capacidade. Adicionou-se, então, 1,0 mL de metanol, gerando soluções de concentração 1,0 mg/mL para cada marcador químico. Esta solução foi sonicada por 10 minutos e, posteriormente, centrifugada a uma rotação de 6708 × g, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em filtros de PTFE (0,20 µm) e injetou-se 5 µL automaticamente no sistema cromatográfico.

As soluções de cada analito foram preparadas individualmente e, então, empregadas o preparo de soluções contendo os quatro marcadores químicos, nas concentrações descritas abaixo, para cada nível da curva analítica, diluídas em metanol. Desta forma, para cada nível de concentração da curva analítica foi utilizada

uma única solução contendo os marcadores nas concentrações descritas no **quadro 4.1**. Foram realizadas análises simultâneas de todos os analitos descritos abaixo.

Quadro 4.1: Concentrações dos marcadores químicos empregadas na construção da curva de calibração do método analítico.

	Concentração (µg/mL)				
Nível	1	2	3	4	5
Bornesitol	20	30	40	60	80
Procianidina B2	5	10	20	30	40
Rutina	12,5	25	50	75	100
Ácido clorogênico	5	10	20	30	40

4.9.1.4 Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela construção de curvas de calibração contendo cinco pontos injetados em triplicatas. As concentrações nominais da faixa de calibração foram descritas no **quadro 4.1**. Os dados obtidos foram analisados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários e os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas em dois dias distintos foram avaliadas estatisticamente por análise de variância, sendo consideradas estatisticamente equivalentes para $p < 0,05$.

4.9.1.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi determinado a partir da equação recomendada pela Comissão Internacional de Harmonização (ICH - International Commission on Harmonization) (ICH, 1996):

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{S}$$

Em que:

σ : desvio padrão do intercepto da curva analítica

S: inclinação da curva analítica

4.9.1.6 Limite de detecção

O limite de quantificação (LD) foi determinado a partir da equação recomendada pela Comissão Internacional de Harmonização (ICH - International Commission on Harmonization) (ICH, 1996):

$$LD = 3,3 \frac{\sigma}{S}$$

Em que:

σ : desvio padrão do intercepto da curva analítica

S: inclinação da curva analítica

4.9.1.7 Precisão

A precisão foi avaliada utilizando seis determinações no ponto médio de concentração de cada analito na curva analítica (ver **quadro 4.1**), com três repetições para cada etapa. A precisão intradia foi analisada no mesmo dia e a precisão interdias foi determinada de maneira semelhante, em três dias consecutivos, por analistas diferentes (n=18). Os valores de DPR (Desvio-Padrão Relativo, %) foram calculados com base nas áreas obtidas para a precisão intradia (n=6) e para a precisão interdias (n=18). As médias dos teores entre os dias de determinação foram comparadas pelo teste de ANOVA de uma via ($p < 0,05$).

4.9.1.8 Exatidão

A exatidão foi investigada a partir de estudos de recuperação de soluções de HsE fortificadas com bornesitol, rutina, ácido clorogênico e HsFR3 (utilizada em substituição às proantocianidinas B2) utilizando três concentrações dos intervalos lineares (nível 1, 3 e 5, **quadro 4.1**), em triplicata. As concentrações foram determinadas com base na curva de calibração e comparadas com o valor teórico. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores de DPR (%).

4.9.1.9 Robustez

A robustez foi determinada por meio de pequenas variações dos parâmetros cromatográficos e espectrométricos, em relação à condição nominal. Cada parâmetro foi analisado em três determinações no ponto médio (nível 3 do **quadro 4.1**) de concentração dos analitos nas curvas analíticas, em triplicata. Os parâmetros foram: temperatura do forno (27 e 33 °C), fluxo da fase móvel (0,27 e 0,33 mL/min), temperatura do gás de dessolvatação (440 e 460°C) e fluxo do gás de dessolvatação (790 e 890 L/h).

As modificações inseridas foram avaliadas individualmente e comparadas com os resultados aferidos nas condições analíticas. A avaliação estatística das áreas obtidas foi feita por teste ANOVA de uma via.

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *in vitro*

Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em capela de fluxo laminar previamente higienizada com solução de etanol a 70% v/v e com irradiação de luz ultravioleta por 15 minutos. Todos os materiais de consumo também foram higienizados antes de serem colocados na capela de fluxo laminar.

4.10.1 Cultura de células SH-SY5Y e THP1

Células da linhagem SH-SY5Y (neuroblastoma humano, ATCC CRL2266) foram cultivadas em meio Eagle de Dulbecco modificado (DMEM) com meio do tipo Ham F12 (DMEM/F12). O meio foi suplementado com 1% de L-glutamina, aminoácidos não essenciais e piruvato, além de 10% ou 20% de soro fetal bovino (SFB). As células foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro.

Células THP-1 (células de leucemia monocítica humana aguda, ATCC TIB-202) foram mantidas em garrafas de cultura de 25 ou 75 cm² em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meio RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado.

Durante a realização do trabalho, somente foram utilizadas culturas de SH-SY5Y e THP-1 com até cinco passagens.

4.10.2 Descongelamento de células

O criotubo contendo células congeladas foi retirado do nitrogênio líquido, onde era estocado, e mantido em temperatura ambiente até descongelamento completo. As células foram transferidas para tudo do tipo Falcon de 15 mL, e foram adicionados 9 mL de meio completo contendo 20% de SFB. A suspensão de células foi centrifugada a 800 × g. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 5 mL de meio contendo 20% de SFB, transferidas para garrafa de 25 cm² e incubadas em estufa à 37 °C e 5% de CO₂.

4.10.3 Manutenção e passagem das células

As culturas foram mantidas à 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade de 90%, em frascos de 25 cm² sendo posteriormente transferidas para frascos de 75 cm² e, a partir de então, mantidas em meio suplementado com soro fetal bovino a 10%.

O meio de cultura foi substituído a cada três dias, ou de acordo com a necessidade, e as transferências e repicagens para novos frascos eram realizadas quando se atingia confluência entre 75 e 80%.

Para a transferências da cultura (repique) do frasco de 25 cm² para o de 75 cm², o meio foi completamente removido. A cultura foi, então, lavada com 5 mL de tampão fosfato salino (PBS). Após aspiração do PBS, 1,5 mL de tripsina (0,05% de tripsina-EDTA 1×) foi adicionado e as células foram incubadas em estufa (37 °C; 5% CO₂), por 2 a 3 minutos. Após o período de incubação, a garrafa era levemente agitada para desprender o conteúdo total de células. Foi adicionado 8,5 mL de meio contendo 20% de SFB. As células eram, então, transferidas para uma nova garrafa.

Quando houve necessidade de separar parte das células para congelamento e reposição de estoque, não menos que dois quintos das células era transferido para o frasco novo (75 cm²). O restante era transferido para tudo do tipo Falcon e procedia-se conforme descrito no item referente ao congelamento de células (**item 4.10.4**).

4.10.4 Congelamento de células

As células transferidas para o tubo Falcon (conforme descrito no **item 4.10.3**), em um volume total de 10 mL, completados com meio com 20% de SFB, foram centrifugadas a 800 × g, por 2 minutos, à 4 °C. O meio foi então aspirado e as células eram ressuspensas em meio com 20% de SFB, complementado com 5% (v/v) de DMSO, em volume suficiente para que se obtivesse uma concentração entre 2 a 5 milhões de células por mL. A partir de então, transferiu-se 1 mL da suspensão para criotubos destinados ao congelamento das células.

Os criotubos foram mantidos por 2 horas em freezer a -20 °C, sendo, posteriormente, mantidas em ultrafreezer a -80 °C, por 24 horas. Após este período, os criotubos foram estocados em nitrogênio líquido.

4.10.5 Avaliação do efeito HsE, HsFr3 e bornesitol sobre a viabilidade das células SH-SY5Y

Para a avaliação do efeito citotóxico e posterior avaliação do efeito protetor ao dano celular induzido por beta-amiloide às células neuronais SH-SY5Y, utilizou-se o ensaio de viabilidade descrito neste item. Este procedimento foi realizado conforme descrito por CAMPLING *et al.* (1988).

A uma microplaca para cultivo celular de 96 poços foram adicionados 200 µL de suspensão celular, com densidade de 1×10^5 células/poço. A microplaca foi incubada em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C, por 24 horas. Neste intervalo de tempo foi observada a adesão das células SH-SY5Y à superfície dos poços da microplaca. Após 24 horas, o meio com 10% SFB foi retirado da microplaca, com auxílio de pipetador manual multicanal, com o devido cuidado para não danificar a monocamada de células aderidas, e então foram adicionados 100 µL de meio com 2% de SFB. Em seguida foi realizada a diluição das frações, do bornesitol e do extrato em meio completo (2% SFB) contendo 0,1% de DMSO. Na sequência, foram adicionados 100 µL das amostras a serem testadas nas concentrações de 10,0; 30,0 e 90,0 µg/mL, para o extrato e fração, e a 10; 30 e 90 µM, para o bornesitol. Nesta mesma microplaca, também foram plaqueadas células que só foram expostas ao meio e ao veículo de diluição das amostras testadas (meio com 2% de SFB contendo 0,1% de DMSO).

Após a adição das amostras, a microplaca foi retornada à estufa e incubada por 48 horas. Após a incubação, foram removidos 110 µL de meio de cada poço e foram adicionados 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL em PBS). A microplaca foi incubada por 2 horas, à 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de incubação, adicionou-se 100 µL de DMSO em todos os 96 poços da microplaca. Com auxílio do pipetador automático, o conteúdo de todos os poços foi homogeneizado até solubilizar os cristais de formazana formados. A absorbância foi medida em 510 nm em leitor de microplacas. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\left[\frac{(A - B)}{C} - B \right] \times 100$$

Onde, A, B e C são os valores de absorbância dos poços nos quais estão presentes células tratadas com amostras (A), branco (B) e células tratadas com o diluente das amostras (C), respectivamente.

4.10.6 Avaliação do efeito de HsE, HsFr3 e bornesitol sobre a toxicidade induzida por A β ₁₋₄₂ em células SH-SY5Y

4.10.6.1. Padronização do modelo *in vitro* de dano celular induzido por A β -42

As células foram plaqueadas, conforme descrito acima, e, após 24 horas, foram adicionadas concentrações de 0,5; 1,0; 10; e 20 μ M de beta-amiloide 1-42 (A β ₁₋₄₂).

A A β ₁₋₄₂ utilizada neste estudo foi previamente ressuspensa em água Milli-q® e aliquoteada em quantidade suficiente para formar soluções com concentração de 20 μ M, em 2 mL, por tubo do tipo *safe lock*. Antes de se estimular as células com a A β ₁₋₄₂, a mesma foi ativada em estufa à 37°C, por 48 horas. Como diluente, foi utilizado meio DMEM/F12 sem soro fetal bovino.

Após 24 horas de estímulo, procedeu-se com o ensaio de viabilidade celular, conforme descrito no **item 4.11.5**.

4.10.6.2 Avaliação das amostras no modelo padronizado

Células SH-SY5Y foram plaqueadas em placa de cultura de 96 poços. Após 24 horas, foram estimuladas com 10 μ M de A β ₁₋₄₂. Após 24 horas de estímulo, as células foram tratadas com HsE (10, 30 e 90 μ g/mL), HsFr3 (1, 10 e 30 μ g/mL) e bornesitol (0,1; 1 e 3 μ M). Após 24 horas de tratamento, foi realizado ensaio da viabilidade celular pelo método do MTT, conforme procedimento descrito no **item 4.11.5**.

4.10.7 Avaliação da viabilidade das células THP-1 pelo ensaio do MTT

A uma microplaca para cultivo celular de 96 poços foram adicionados 200 μ L de suspensão celular na densidade de 5×10^5 células/poço, cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Após 48 horas, as células foram tratadas com 20 ng/mL de PMA (acetato de forbol miristrato) (Park *et al.*, 2007). A microplaca foi incubada em estufa, com 5% de CO₂, a 37 °C, por 24 horas. Neste intervalo de tempo foi observada a adesão dos macrófagos à superfície dos poços da microplaca.

Após 24 horas, o meio contendo PMA foi retirado da microplaca, com auxílio de pipetador multicanal, com o devido cuidado para não danificar a monocamada de células aderidas, e então foram adicionados 100 μ L de meio RPMI contendo 10% de SFB.

Em seguida, realizou-se a diluição das frações e extratos em meio RPMI completo, contendo 0,1% de DMSO, nas mesmas concentrações descritas no **item 4.11.5**. A partir deste momento, o teste foi realizado da maneira exatamente idêntica à descrita no **item 4.11.5**.

4.10.8 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias em cultivos celulares e tecidos

Os ensaios com as células THP-1 foram realizados pela doutora Kátia Michelle Freitas, no Laboratório de Fitoquímica.

A uma microplaca para cultivo celular de 24 poços foram adicionados 200 µL de suspensão de células THP-1 na densidade de 1×10^6 células/poço, cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Após 48 horas, as células foram tratadas com 20 ng/mL de PMA (acetato de forbol miristrato) (Park *et al.*, 2007). A microplaca foi incubada em estufa, com 5% de CO₂, à 37 °C, por 24 horas. Neste intervalo de tempo foi observada a adesão dos macrófagos à superfície dos poços da microplaca.

Após 24 horas, o meio contendo PMA foi retirado da microplaca, com auxílio de pipetador multicanal, com o devido cuidado para não danificar a monocamada de células aderidas, e então foram adicionados 100 µL de meio RPMI 10% novo. Em seguida, foi realizada a diluição das frações e extratos em meio RPMI completo contendo 0,1% de DMSO. Foram adicionados, então, 100 µL das amostras a serem testadas nas concentrações de 10,0; 30,0 e 90,0 µg/mL, para o extrato e fração, e 1,0; 10,0 e 30,0 µM, para o bornesitol. Após a adição das amostras, a microplaca foi retornada à estufa e incubada por 3 horas. Meio sem extrato foi adicionado ao controle.

Após esse período, foram adicionados 200 µL de uma solução a 100 µg/mL de LPS diluído em meio RPMI completo à microplaca e essa foi novamente incubada por 20 horas. Dexametasona a 10 µM foi utilizada como controle positivo e células cultivadas na ausência de LPS foram utilizadas como controle basal.

Após incubação, foram transferidos 300 µL do sobrenadante para 3 outras microplacas de 96 poços, sendo transferido 100 µL para cada uma delas, para posterior quantificação de interleucina-1β (IL-1β), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-6 (IL-6), por ELISA, conforme protocolo descrito pelo fabricante.

As células SH-SY5Y foram cultivadas em uma microplaca para cultivo celular de 24 poços, tendo sido adicionados 200 μ L de suspensão celular na densidade de 1×10^6 células/poço, cultivada em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB, e 1% de aminoácidos não-essenciais, L-glutamina e piruvato. Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram estimuladas com 200 μ L de A β ₁₋₄₂, na concentração de 10 μ M, por 24 horas. Foram adicionados, então, 100 μ L das amostras a serem testadas nas concentrações de 10,0; 30,0 e 90,0 μ g/mL, para o HsE, 1,0; 10,0 e 30,0 μ g/mL, para HsFr3 e 0,1; 1,0 e 3,0 μ M para o bornesitol. Após a adição das amostras, a microplaca foi retornada à estufa e incubada por 12 horas. Meio sem amostra foi adicionado ao controle. A retirada do sobrenadante para a realização do ensaio de ELISA procedeu da mesma forma descrita acima, quando se descreve o procedimento com as células THP-1.

Para os ensaios realizados com hipocampus murinos, após o sétimo dia de tratamento (vide **item 5.13**) os animais foram eutanasiados e os encéfalos foram removidos e dissecados para a coleta dos hipocampus a fresco. O material coletado foi homogeneizado, individualmente, e centrifugados a $5600 \times g$, à 4 °C, por 15 minutos. O volume de 100 μ L do sobrenadante foi plaqueado, em cada poço, em placa de 96 poços para a realização de ELISA para a quantificação de citocinas pró-inflamatórias.

As concentrações de TNF, IL-1 β e IL-6 foram, então, determinadas por ELISA. As concentrações foram corrigidas e expressas em razão da massa de cada hipocampo.

4.11 Protocolo de ELISA

Os kits de ELISA utilizados para determinação de IL-1 β , IL-6 e TNF foram obtidos da R&D Systems (DY201 DuoSet, DY210 DuoSet e DY279 DuoSet, respectivamente para as citocinas humanas e DY401 DuoSet, DY406 DuoSet e DY410 DuoSet para as citocinas murinas) e os procedimentos foram realizados conforme as orientações do fabricante. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100 μ L/poço de uma solução de anticorpo de captura (anticorpo humano ou murino anti-IL-1 β , anti-IL-6 ou anti-TNF), nas concentrações de 4,0 μ g/mL, em PBS. Essa solução permaneceu em contato com a microplaca *overnight*, à 4°C. Posteriormente, as microplacas foram lavadas (3 vezes) com tampão de lavagem (PBS/Tween 0,1%) em um lavador de microplacas automático. Logo após, foram

adicionados 200 µL/poço da solução de bloqueio contendo 1% de albumina de soro bovino em PBS. O tempo de bloqueio foi de 2 horas. Em seguida os padrões de IL-1 β (250 a 3,91 pg/mL para a citocina humana e 2000 a 31,25 pg/mL para a citocina murina) ou TNF humano (1000 a 15,63 pg/mL para a citocina humana e 1000 a 31,25 pg/mL para a citocina murina) ou IL-6 humano (1000 a 15,63 pg/mL para as citocinas humana e murina) e as amostras (100 µL do sobrenadante/poço, para os sobrenadantes celulares, e 50 µL para o homogenato de hipocampo) foram adicionados à microplaca. Após incubação *overnight* à 4 °C, a microplaca foi lavada e foram adicionados 100 µL/poço de anticorpo de detecção biotinilado (anticorpos humanos ou murinos anti-IL-1 β ou anti-TNF ou anti-IL-6 nas concentrações de 0,2 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,1 µg/mL em solução de bloqueio estéril, respectivamente), sendo a microplaca incubada por 2 horas. Transcorrido este período e após lavagem, adicionou-se à microplaca, em ausência de incidência de luz, 100 µL de solução contendo estreptavidina conjugada à peroxidase (R&D Systems). A microplaca foi então incubada por 30 minutos, ao abrigo da luz. Na sequência, a microplaca foi novamente lavada e adicionados 100 µL/poço de uma solução contendo o-fenilenodiamina (OPD) e peróxido de hidrogênio nas concentrações de 0,4 mg/mL e 0,2 µL/mL em tampão citrato pH 5,0, respectivamente. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido clorídrico 1 mol/L. O produto de oxidação do OPD foi quantificado por colorimetria, em um leitor de placas de ELISA, no comprimento de onda de 490 nm.

4.12 Padronização do ensaio de estresse oxidativo em células THP-1 e SH-SY5Y

O efeito das amostras no estresse oxidativo celular foi medido em células THP-1 estimuladas com LPS, conforme protocolo descrito por Aranda *et al.* (2013) e em células SH-SY5Y estimuladas com A β ₁₋₄₂, de acordo com o descrito por Mairuae *et al.* (2019), com modificações.

Diversas condições foram inicialmente investigadas para a realização do ensaio, compreendendo a duração do pré-tratamento (2, 3 ou 4 h), o intervalo e a duração do estímulo (3, 6, 9 e 12 h para células THP-1 e 6, 12 e 24h para as células SH-SY5Y), a concentração de 2',7'-dichlorofluorescina diacetato (DCFH-DA; 10 e 20 µM) e a duração da marcação com DCFH-DA (15 e 30 min). Os experimentos foram realizados com as condições padronizadas descritas abaixo.

Células THP-1 foram semeadas em uma placa de microtitulação de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células por poço por 24 horas e depois tratadas por 2 horas com 100 μ L, por poço, de HsE (10, 30 e 100 μ g/mL), HsFr3 (1, 10 e 30 μ g/mL) e bornesitol (0,1, 1 e 3 μ M) dissolvidos em meio RPMI enriquecido com 2% de SFB, ou com o mesmo volume de meio de cultura. Posteriormente, 100 μ L de solução LPS (100 ng/mL) foram adicionados aos poços e as células foram mantidas nesta condição por 75 min. Os tratamentos não foram removidos antes de se estimular as células com LPS.

Células SH-SY5Y foram semeadas em uma placa de microtitulação de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células por poço por 24 horas e depois tratadas por 4 horas com 100 μ L, por poço, de HsE (10, 30 e 100 μ g/mL), HsFr3 (1, 10 e 30 μ g/mL) e bornesitol (0,1, 1 e 3 μ M) dissolvidos em meio DMEM-F12 enriquecido com 2% de FBS, ou com o mesmo volume de meio de cultura. Posteriormente, 100 μ L de solução de peptídeo A β_{1-42} (10 μ M) foram adicionados aos poços e as células foram mantidas nesta condição por 6 horas. Os tratamentos não foram retirados antes de se adicionar o estímulo com A β_{1-42} .

Em ambos os experimentos, as células foram coradas com DCFH-DA (20 μ M) por 30 min e mantidas sob atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar a 37 °C. A fluorescência DCF foi então medida num leitor de microplacas multimodo Varioscan™ Lux (Thermo Scientific) a 493 nm (comprimento de onda de excitação) e 522 nm (comprimento de onda de emissão). Os dados foram expressos como porcentagem de ROS em relação ao grupo não tratado.

4.13 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-NEUROINFLAMATÓRIA *in vivo*

Os ensaios de atividade anti-inflamatória *in vivo* foram realizados em modelo murino de dano patológico induzido por peptídeo amiloide, semelhante à doença de Alzheimer (DA). Os testes foram executados pelo doutorando no Laboratório de Neurofarmacologia do ICB/UFMG, sob supervisão do Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira.

4.13.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens (WT, *Wild Type*), machos, com idade entre 10-12 semanas, obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Mantiveram-se os animais em temperatura controlada de 23

°C, agrupados em seis animais por caixa, sendo permitido livre acesso à água e ração. Foi mantido um ciclo claro/escuro com duração de 12 horas cada. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMG). O projeto foi previamente aprovado pelo CEUA (protocolo de aprovação do CEUA/UFMG: 297/2018; reunião do dia 01/10/2018).

4.13.2 Preparo e ativação das alíquotas de A β ₁₋₄₂

Uma porção de 1 mg de A β ₁₋₄₂ foi solubilizada em 167 μ L de água Milli-Q, esterilizada por filtração em filtro de 0,20 μ m, e a solução obtida foi dividida em alíquotas de 10 μ L, as quais foram mantidas em freezer a -20 °C. Anteriormente ao uso, à alíquota foi adicionado 6,63 μ L de PBS, sendo esta solução mantida em estufa à 37 °C, por 48 horas, para a ativação da A β ₁₋₄₂.

4.13.3 Cirurgia estereotóxica e injeção intra-hipocampal de A β ₁₋₄₂

Camundongos C57Bl/6 foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), em um volume de 100 μ L. Antes de iniciar o procedimento cirúrgico, foi realizado o teste de reflexo podal para determinar se os camundongos estavam realmente anestesiados. Em seguida, foram submetidos à tricotomia do escalpo e seus crânios fixados em um aparelho esterotático (Insight). Procedeu-se à assepsia do escalpo com álcool iodado e uma incisão sagital para a exposição da caixa craniana. A microinjeção foi realizada com uma agulha gengival 30 G, sendo introduzida no hipocampo dorsal direito nas coordenadas -1,9 mm anteroposterior (AP); -1,5 mm médio-lateral (ML) e +2,3 mm dorsoventral (DV) em relação ao ponto anatômico de intersecção perpendicular entre a sutura coronal e a sutura sagital no crânio (bregma) (**figura 4.1**). As coordenadas foram determinadas de acordo com o atlas Paxinos (**figura 4.2**) (Paxinos e Franklin, 2001). A agulha foi conectada a um seguimento de polietileno (P10) e este a uma seringa Hamilton de 10 μ L. As injeções de 400 pmol do peptídeo beta amiloide 1-42 (A β ₁₋₄₂) ou PBS foram realizadas a uma taxa de infusão de 0,5 μ L/min, sendo administrado um volume de 0,5 μ L por sítio. Após a injeção, a agulha foi mantida no encéfalo por 2 min., para evitar que houvesse refluxo dos volumes injetados. Após cada injeção, a bomba de infusão foi acionada para verificar se não havia entupimentos na agulha. Ao fim da cirurgia, os animais foram observados até a completa recuperação, sendo então,

levados ao biotério, onde permaneceram até o término dos tratamentos e dos procedimentos experimentais.

O grupo controle negativo para déficit cognitivo induzido por injeção intra-hipocampal de β -amiloide foi obtido pela administração intra-hipocampal de tampão fosfato salino (PBS), sendo tratado com o mesmo veículo (água destilada com 0,5% de carboximetilcelulose – CMC) utilizado para a solubilização das amostras-teste e pela mesma via (gastrointestinal). O grupo controle positivo para déficit cognitivo induzido por β -amiloide foi obtido pela administração intra-hipocampal de 400 pmol de $A\beta_{1-42}$ ativada, sendo tratado com veículo (0,5% CMC).

Tanto o peptídeo β -amiloide (solubilizado em PBS) quanto o PBS foram administrados em um volume total igual a 0,5 μ L por camundongo e injetado apenas no hipocampo direito para que o lado esquerdo pudesse ser usado como um parâmetro de controle interno individual.

Figura 4.1: Posição anatômica da junção de suturas bregma (adaptado de ALLAHYARI *et al.*, 2015).

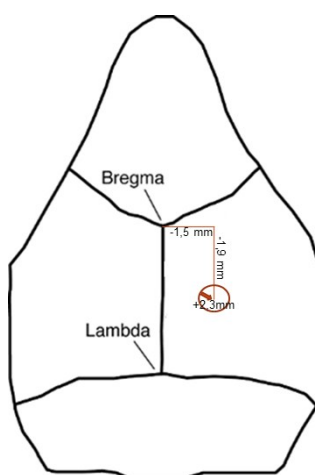
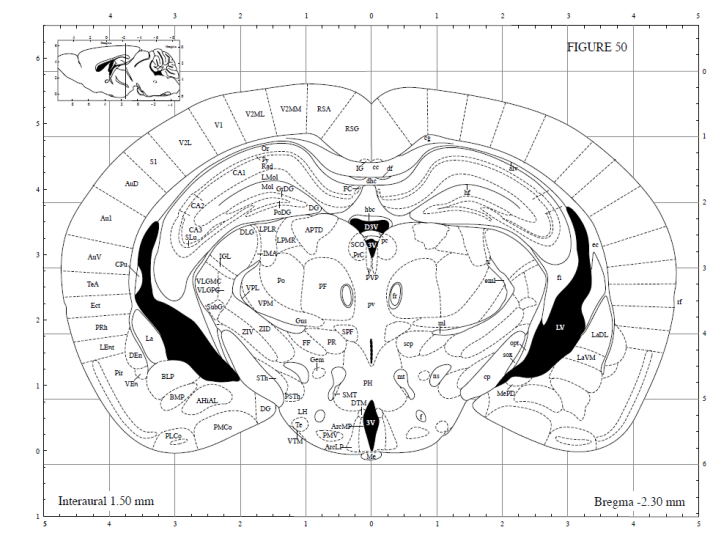


Figura 4.2: Região da injeção intra-hipocampal, segundo o atlas Paxinos. Fonte: PAXINOS E FRANKLIN (2001).



4.14 Protocolo experimental

Após 24 horas da cirurgia estereotáxica, os animais foram tratados com veículo ou com o extrato acetona/água (70:30) de *H. speciosa* nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg, administrada por via oral (gavagem), no volume de 100 μ L, sendo um tratamento diário, durante 7 dias. Como veículo, foi utilizado carboximetilcelulose (CMC) a 0,5% (m/v) em salina.

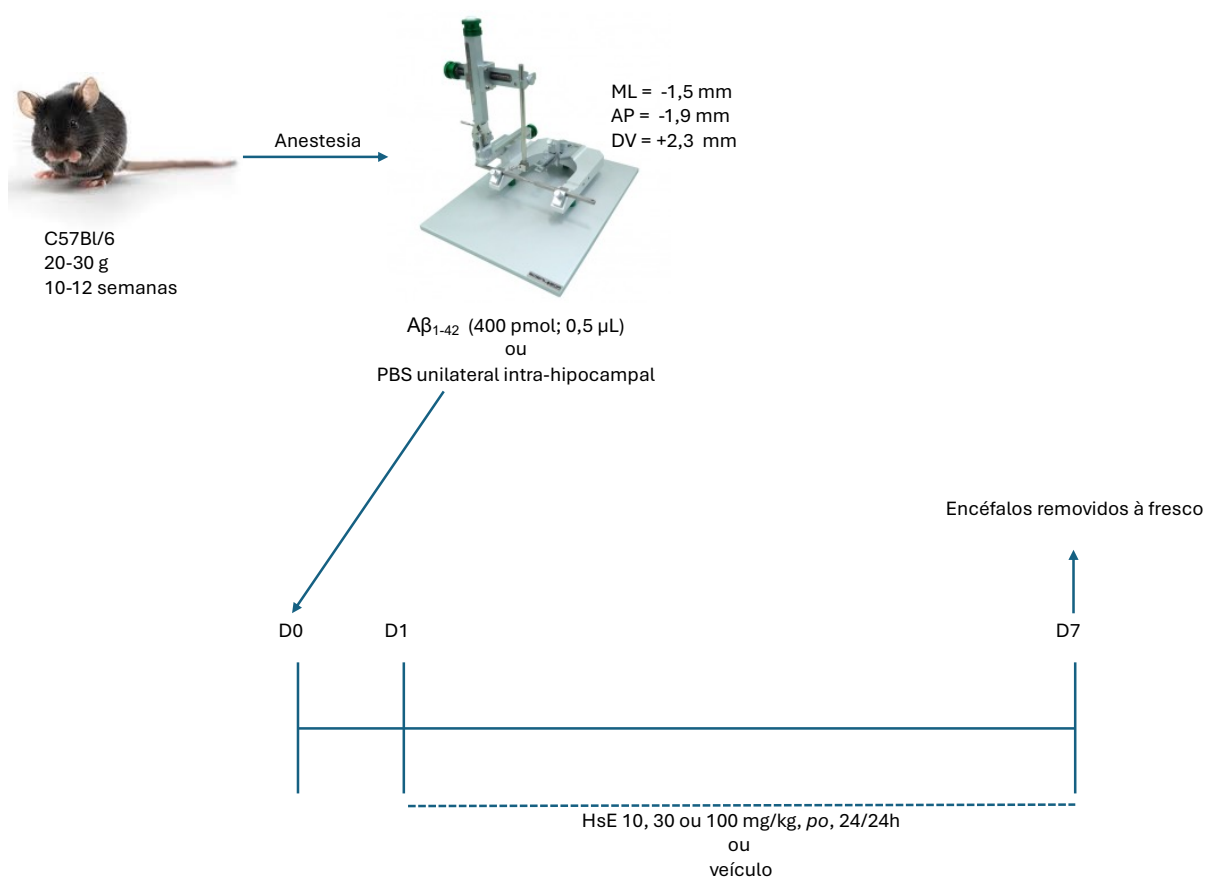
Para a avaliação de citocinas pró-inflamatórias, no sétimo dia, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical (sob anestesia) e os encéfalos foram coletados a fresco para a dissecação dos hipocampus (**esquema 1**).

Neste primeiro esquema, de acordo com a substância administrada durante a cirurgia (A β 1-42 ou PBS) e o tratamento recebido, os camundongos foram divididos em seis grupos experimentais: PBS + veículo; PBS + *H. speciosa* 30 mg/kg; A β 1-42 + veículo; A β 1-42 + *H. speciosa* 10 mg/kg; A β 1-42 + *H. speciosa* 30 mg/kg e A β 1-42 + *H. speciosa* 100 mg/kg.

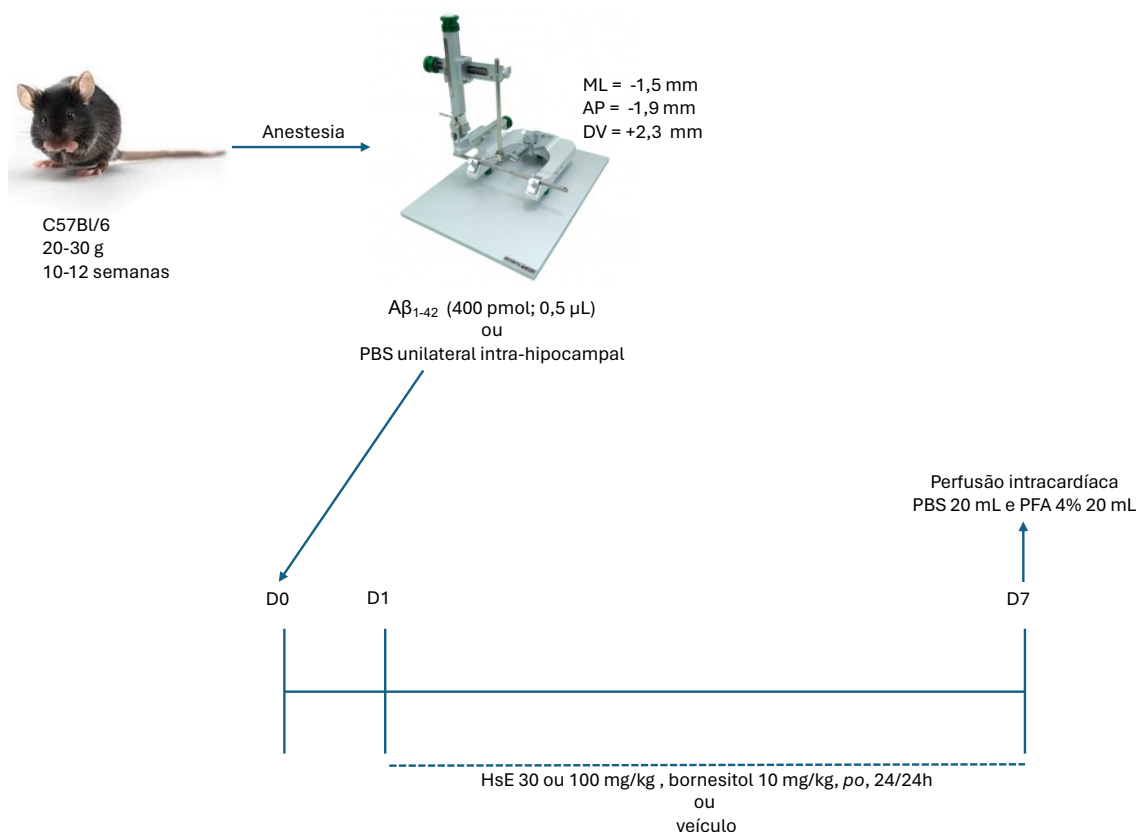
Para a realização de ensaios de imunohistoquímica, outros grupos de animais foram submetidos aos mesmo procedimentos descritos nesta seção. No entanto, ao sétimo dia de tratamento, os animais foram anestesiados, com solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), e foram submetidos à perfusão transcardíaca com paraformaldeído para a fixação e conservação dos encéfalos, que foram, então,

coletados (**esquema 2**). O procedimento de perfusão e conservação dos encéfalos está descrito no **item 4.15**.

Neste segundo esquema, de acordo com a substância administrada durante a cirurgia (A β 1-42 ou PBS) e o tratamento recebido, os camundongos foram divididos em seis grupos experimentais: PBS + veículo; PBS + *H. speciosa* 30 mg/kg; A β 1-42 + veículo; A β 1-42 + *H. speciosa* 30 mg/kg; A β 1-42 + *H. speciosa* 100 mg/kg e A β 1-42 + bornesito 10 mg/kg.



Esquema 1: protocolo 1 de cirurgia estereotáxica, tratamento com HsE (10, 30 ou 100 mg/kg) ou veículo e remoção dos encéfalos à fresco.



Esquema 2: protocolo 2 de cirurgia estereotáxica, tratamento com HsE (30 ou 100) mg/kg, bornesitol (10 mg/kg) ou veículo e remoção dos encéfalos pós fixação e conservação com PFA 4%.

4.15 Obtenção e preparo dos encéfalos para a análise imunohistoquímica

Para a obtenção e conservação de encéfalos para análise histoquímica, os animais submetidos à cirurgia estereotáxica (conforme descrito na seção 4.15) foram perfundidos com solução de paraformaldeído 4% (PFA) em PBS, pH 7,4.

Os animais foram anestesiados com solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal da região púbica até a região da artéria jugular para se expor o coração e para que se pudesse acompanhar a eficácia da perfusão ao se observar a mudança de coloração do fígado e dos pulmões dos animais.

Uma agulha foi inserida no ventrículo esquerdo, sendo conectada a um sistema de perfusão, composto por uma bomba peristáltica. O sangue foi removido com solução de PBS (pH 7,4; 20 mL), sendo realizada uma incisura no arco aórtico para garantir o extravasamento do sangue. Após a perfusão com PBS, perfundiu-se os animais com solução de PFA (pH 7,4; 20 mL). A taxa de perfusão foi de 4 mL/min.

Posteriormente, os encéfalos foram removidos e submergidos em solução fixadora de PFA 4%, por 16 horas. Após a fixação, os encéfalos foram retirados da solução de PFA e transferidos para solução de sacarose 30%, em PBS, para o processo de crioproteção, mantidos nesta solução até que tornassem isotônicos com a mesma (observado pela deposição do encéfalo no fundo do tubo utilizado).

Após a crioproteção, os encéfalos foram retirados da solução crioprotetora e o excesso de solução de sacarose foi removido com o auxílio de papel absorvente. Em seguida, os cérebros foram congelados em um processo de congelamento rápido com isopentano, resfriado com gelo seco. Cada encéfalo foi submerso em isopentano, envolto por gelo seco, por um período de 20 segundos, sendo mantidos em gelo seco até o seu armazenamento. Os encéfalos foram armazenados em freezer -80 °C até que fossem fatiados para a realização dos ensaios posteriores.

Os cérebros estocados foram cortados com o auxílio de um criostato (Leica) a -20 °C na espessura de 30 µm e colocados em uma solução crioprotetora (etilenoglicol 24%; glicerol 24% NaH₂PO₄ 0,1256% e Na₂HPO₄ 0,436% diluídos em PBS) e estocados a -20 °C.

4.16 Marcação de células Iba-1⁺ para a avaliação de micróglia em fatias de hipocampus murinos

Para a imunomarcagem de Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1* - molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1), foram utilizados os cortes de hipocampo de 30 µm de espessura dos animais submetidos à cirurgia esterotáxica e à perfusão intracardíaca.

As fatias armazenadas em solução crioprotetora foram lavadas 3 vezes com PBS (10 min cada lavagem), os cortes foram permeabilizados e os sítios inespecíficos foram bloqueados por incubação por 1 hora em solução de bloqueio (10% de soro fetal bovino (FBS) e 0,3% de Triton-X em PBS). Em seguida, foram incubados por 2 dias com o anticorpo primário de coelho anti-Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1* - marcador de micróglia; coelho 1:1000, Wako). Após este período, os cortes foram novamente lavados 3 vezes com PBS (10 min cada lavagem) e incubados com anticorpo secundário de cabra anti-coelho (Alexa Fluor 594 1:1000, Life Technologies, diluído em solução de 5% de SFB e 0,3% Triton-X em PBS), por 1 hora. Os cortes foram então lavados 3 vezes com PBS e incubados com DAPI 1,75

µg/mL, por 15 minutos. Ao final, foram lavados mais 3 vezes com PBS e montados em lâminas gelatinizadas com auxílio do meio de montagem Fluoromount (Sigma).

As lâminas foram observadas ao microscópio óptico de fluorescência LSM880 (Zeiss) no aumento de 20 vezes, sendo tiradas fotos das regiões *cornus ammonis* (CA) 1 e 3 e giro dentado (GD) do hipocampo para a quantificação de células marcadas. A quantificação foi realizada pela análise de intensidade de fluorescência através do software ImageJ (versão 1.53).

4.17 Avaliação de citocinas pró-inflamatórias em hipocampus isolados

Após a eutanásia dos animais, os encéfalos foram coletados à fresco e imediatamente dissecados para a remoção dos hipocampus. Os hipocampus foram, então, homogeneizados em 150 µL de tampão de lise RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 140 mM; P-40 1%; deoxicolato de sódio 1% e SDS 0,1%), na concentração média de peso de tecido por volume de tampão de 80µg/mL, para a análise de citocinas, conforme descrito no **item 4.11 e 4.12**.

4.18 Análise estatística

Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida por pós-teste de Bonferroni ou pós-teste de Tukey. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão da média.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 8®. Considerou-se como estatisticamente significativos os resultados com valor de *p* menor do que 0,05, para um intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e análise da composição química de extrato de *H. speciosa*

Conforme descrito na revisão de literatura (**item 3.9**), relatamos anteriormente o potencial efeito neuroprotetor de um extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (Carneiro Junior, 2020). Os resultados promissores despertaram o interesse em investigar a composição química deste extrato e ampliar o estudo de suas atividades biológicas relacionadas à DA. O fracionamento deste extrato resultou em uma fração enriquecida em proantocianidinas, que apresenta potencial efeito na DA, tendo em vista os relatos na literatura que indicam potencialidade de proantocianidinas em atuarem como agentes neuroprotetores.

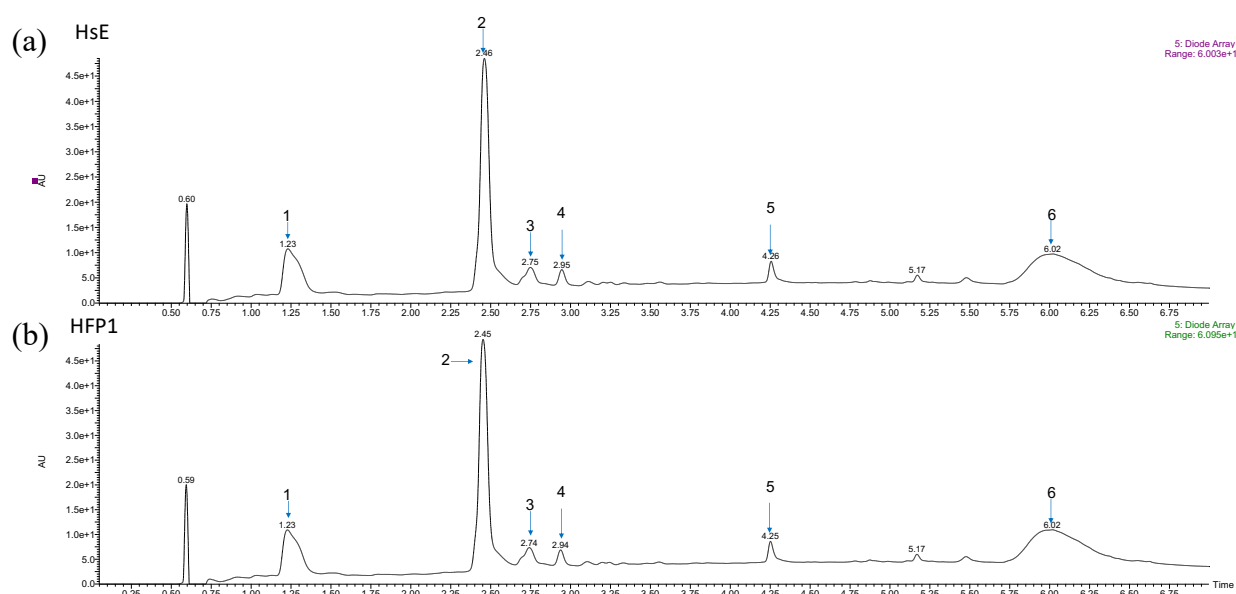
A fim de obter massa suficiente de extrato para a caracterização química e avaliação da atividade biológica, bem como para fracionar e obter a fração rica em proantocianidinas supracitada, preparamos um novo extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HsE). A composição química do extrato obtido (HsE) foi comparada com aquela do extrato preparado anteriormente (HFP1), para o qual se demonstrou o potencial efeito neuroprotetor (**item 3.9**).

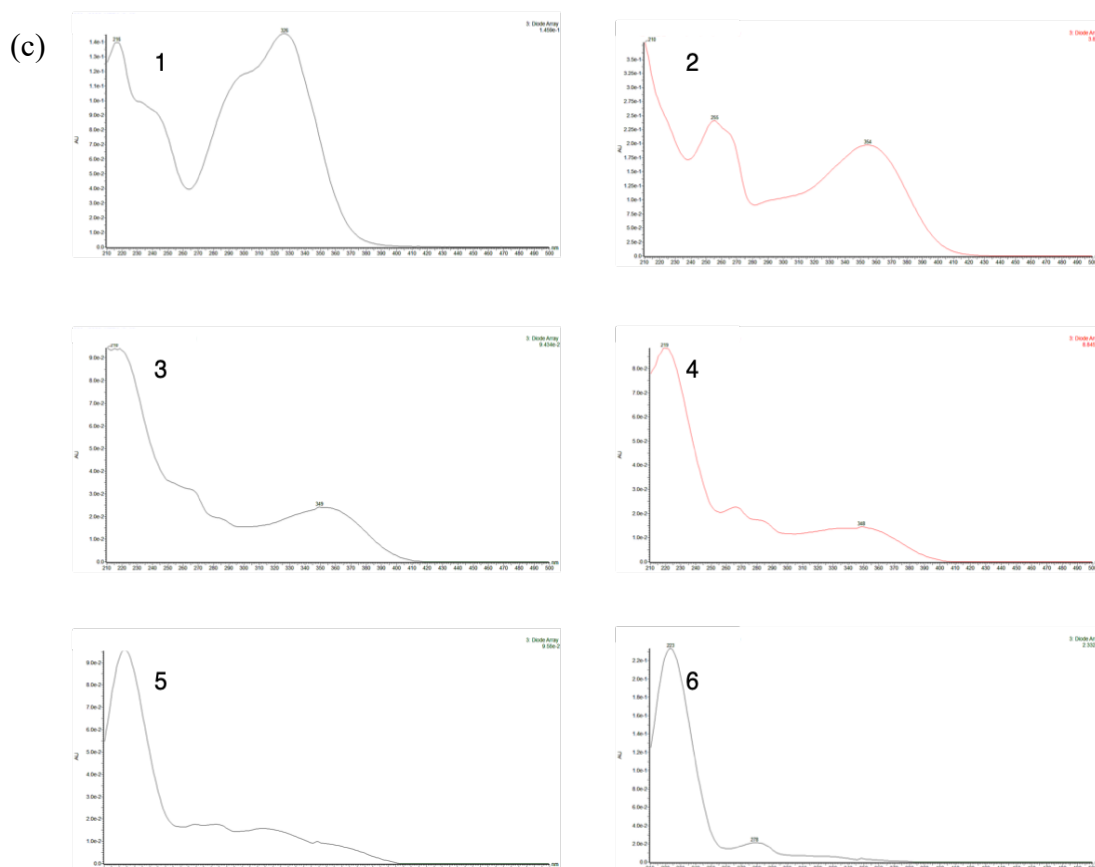
Inicialmente, foram obtidos perfis por CLUE-DAD-ESI-EM/EM para os extratos hidroacetônicos de folhas de *H. speciosa* (HsE e HFP1) e os picos majoritários tiveram seus espectros no UV e de massas investigados. A obtenção de perfis cromatográficos é uma etapa fundamental em um estudo fitoquímico, por fornecer informações que auxiliam na caracterização da composição química da matriz. Desta forma, é possível determinar o grau de complexidade, polaridade e prováveis classes de metabólitos secundários constituintes da amostra. Além disso, torna possível padronizar o extrato e derivados a serem submetidos a testes farmacológicos, conferindo maior confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados encontrados. Desta forma, quando se faz necessário produzir quantidades adicionais de determinado extrato, é possível avaliar se ele apresenta perfil químico semelhante ao extrato original (Moracci *et al.*, 2020).

Os perfis cromatográficos obtidos para HsE e HFP1 indicaram a presença de substâncias com diferentes polaridades (**figura 5.1**). Os cromatogramas obtidos demonstram a presença de pico majoritário correspondente à rutina (pico 2, tempo de retenção (t_r) = 2,46 minutos, λ_{max} = 255 e 354 nm), identificado por comparação com substância química de referência (SQR) analisadas nas mesmas condições. Também

foi observado um pico com $\lambda_{\max}$ em torno de 217, 241 e 324 nm para o constituinte eluído em 1,23 minutos (pico 1), valores compatíveis com ácidos orgânicos do tipo C₆-C₃, como o ácido clorogênico, o qual já foi descrito em extratos de folhas de *H. speciosa* (Pereira *et al*, 2022). Também foi possível observar a presença de substâncias com $\lambda_{\max}$ em torno de 278 nm, compatíveis com proantocianidinas (tr = 6,02 minutos; pico 6). Outros picos majoritários encontrados apresentaram espectros no UV compatíveis com ácidos fenólicos (tr = 2,75; 2,95 e 4,26 minutos; picos 3; 4; e 5, respectivamente).

Figura 5.1 Cromatograma obtido por CLUE-DAD para o extrato acetona/água (70:30) de folhas *H. speciosa* registrado no *max plot*. a) extrato HsE; b) extrato HFP1; c) espectros no UV dos picos identificados nos cromatogramas. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, **item 4.7.2**. Tempos de retenção dos picos 1 (1,23 min.); 2 (2,46 min); 3 (2,75 min.); 4 (2,95 min.); 5 (4,26 min); e 6 (6,02 min).



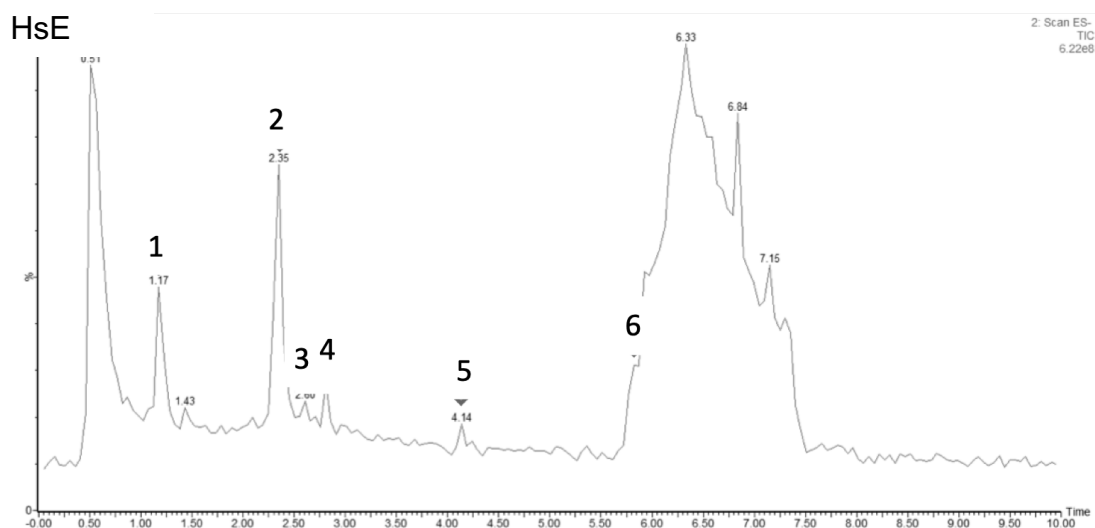


A similaridade do extrato obtido no presente trabalho (HsE) com aquele preparado anteriormente durante o mestrado do autor (HFP1) (Carneiro Junior, 2020) fica evidente pelos perfis cromatográficos (**figura 5.1**). Na sequência, procedeu-se à análise de HsE por CLUE-MS, visando identificar a massa molar dos constituintes majoritários (picos 1 a 6) e os resultados obtidos estão representados na **figura 5.2**.

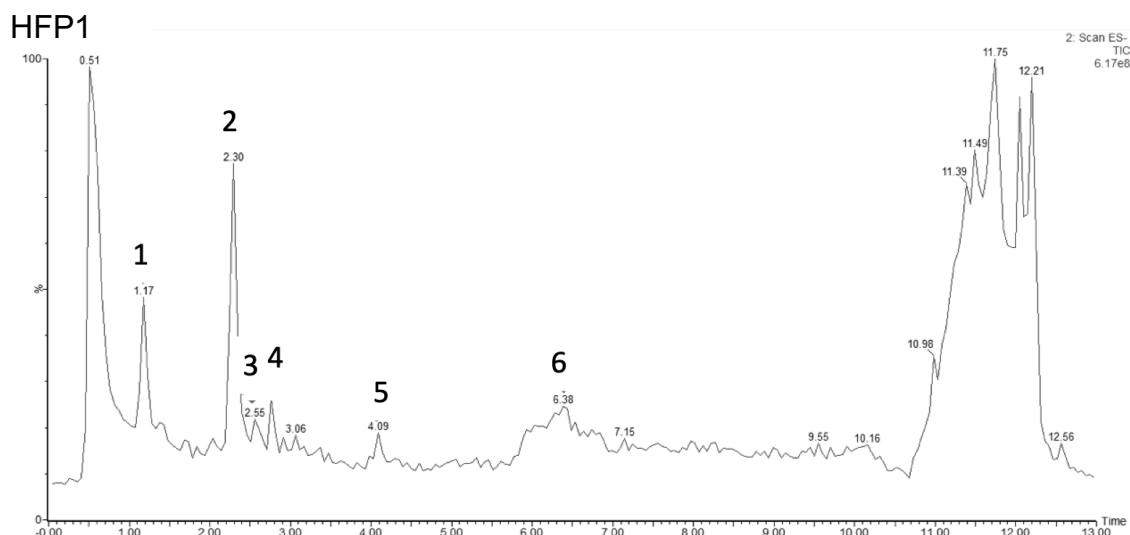
O espectro de massas registrado para o pico 1 ($t_r = 1,23$ min.) indicou tratar-se de um composto com m/z 353 $[M-H]^-$, sugerindo tratar-se do ácido clorogênico (massa molecular de 354 Da). Já para o pico 2 ($t_r = 2,46$ min.), o espectro de massas demonstrou tratar-se de um composto com m/z de 609 $[M-H]^-$, indicando a presença de rutina (massa molecular de 610 Da, confirmada pela análise de SQR nas mesmas condições). Os picos 3, 4 e 5 apresentam espectros com picos base em m/z 463 $[M-H]^-$, m/z 593 $[M-H]^-$ e m/z 753 $[M-H]^-$, respectivamente. O espectro de massas registrado para o pico 6 apresentou-se bastante complexo, não sendo possível identificá-lo de forma inequívoca. Tal achado para o pico 6 é esperado devido à alta complexidade das proantocianidinas, incluindo compostos isoméricos.

Figura 5.2: Cromatograma obtido por CLUE-ESI-EM para o extrato em acetona/água (70:30) de folhas *H. speciosa*, no modo de ionização negativo (ESI⁻). a) extrato HsE; b) extrato HFP1; c) espectro de massa no modo ESI⁻ para os picos identificados nos cromatogramas. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, **item 4.7.2**. Tempos de retenção: 1 (1,17 min); 2 (2,35 min); 3 (2,60 min); 4 (2,81 min); 5 (4,14 min); e 6 (6,33 min).

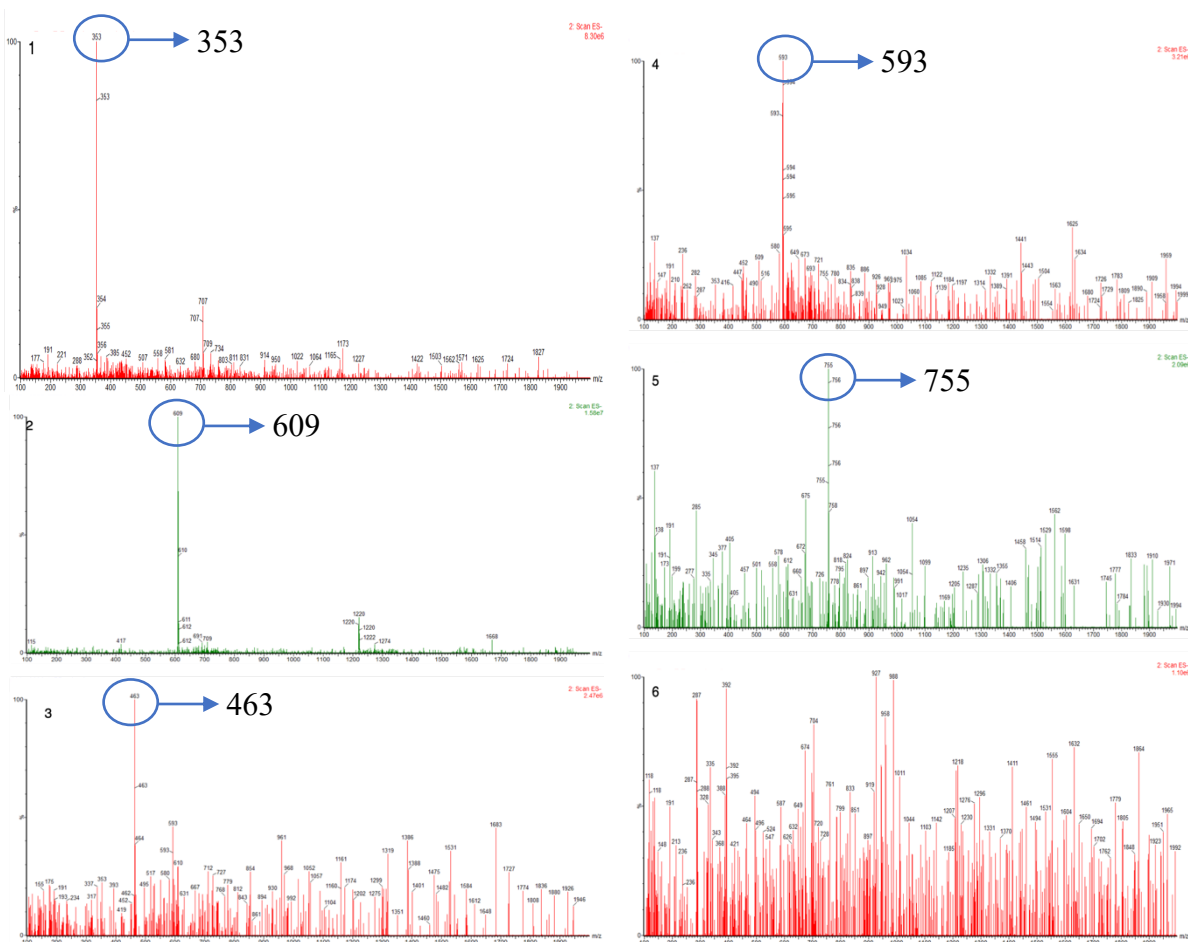
a)



b)



c)



Os resultados obtidos foram comparados com aqueles registrados para o extrato HFP1 preparado anteriormente (**figura 5.1 e 5.2**) e estão dispostos na **tabela 5.1**.

Tabela 5.1: Dados espectrais obtidos no UV (nm) e por espectrometria de massas (m/z $[M-H]^-$) para os picos majoritários presentes nos extratos hidroacetônicos de *H. speciosa*. Com os tempos de retenção: 1 (1,23 min.); 2 (2,46 min); 3 (2,75 min.); 4 (2,95 min.); 5 (4,26 min); e 6 (6,02 min).

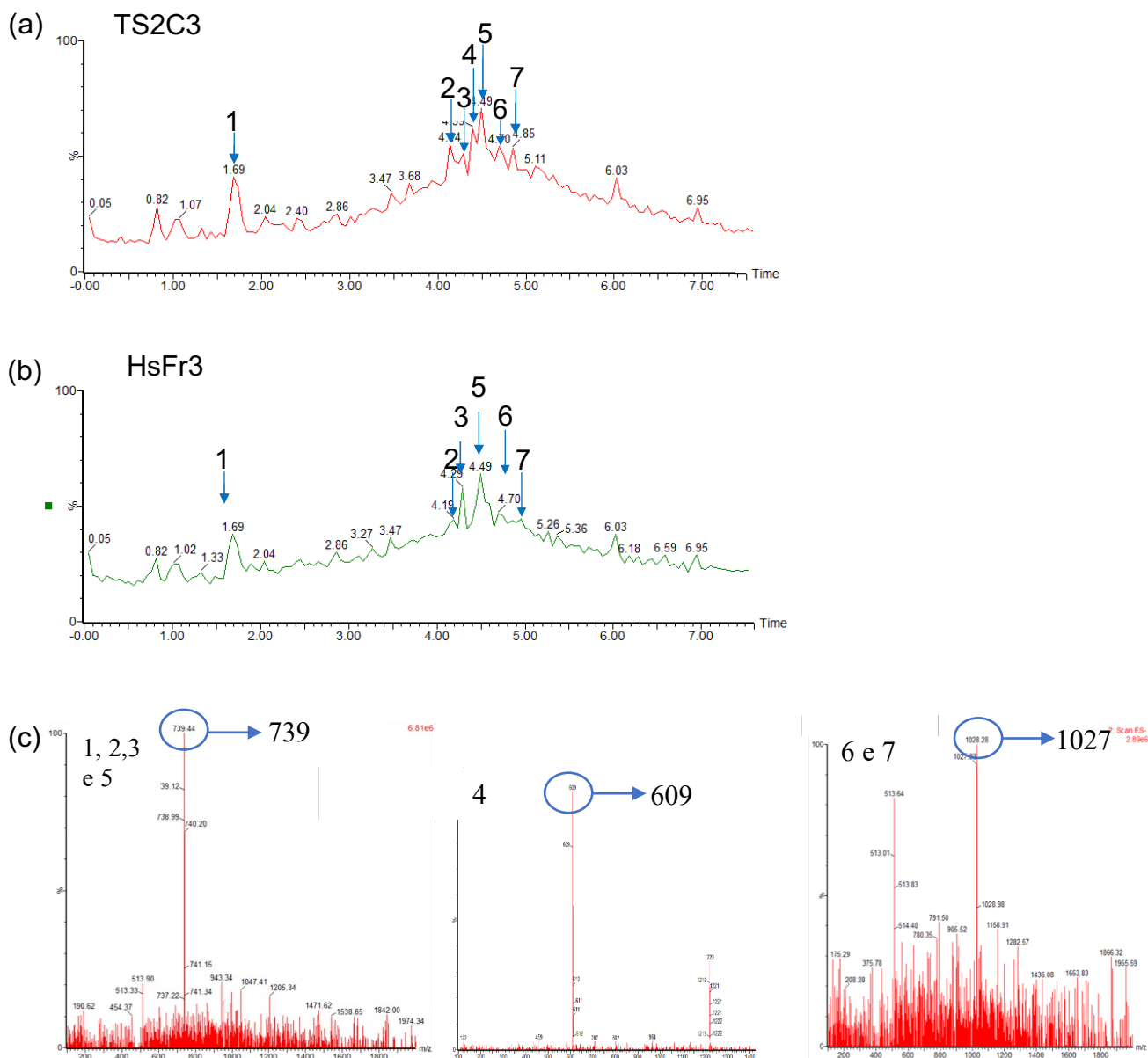
Pico	Tempo de retenção (min)		UV (λ_{max} nm)	m/z $[M-H]^-$
	Extrato HsE	Extrato HFP1		
1	1,23	1,23	217, 241 e 324	353
2	2,46	2,45	255 e 354	609
3	2,75	2,74	265, 282 e 349	463
4	2,76	2,71	270, 282 e 358	593
5	4,26	4,25	280, 315 e 358	755
6	6,02	6,02	278	Mistura

Quando comparado ao cromatograma registrado para o extrato HFP1, preparado anteriormente (Carneiro Junior, 2020), observa-se grande similaridade com o extrato HsE obtido neste trabalho (**figuras 5.1 e 5.2**). Este resultado indica que a metodologia empregada para o preparo do extrato enriquecido em proantocianidinas (extrato hidroacetônico a 70%) é reprodutível. Esta padronização assegura a reprodutibilidade dos ensaios biológicos descritos neste trabalho e sua análise comparativa com os resultados obtidos com o extrato HFP1. Cabe destacar que ambos os extratos foram preparados com o mesmo lote da droga vegetal folhas de *H. speciosa*.

Na sequência, realizou-se o fracionamento de HsE visando obter uma fração rica em proantocianidinas para posterior análise da composição química e avaliação de atividade biológica. O fracionamento foi realizado em coluna de Sephadex LH20, com eluição isocrática de metanol/água (70:30), conforme descrito anteriormente, porém realizou-se uma desengorduração prévia do extrato com diclorometano. A composição química da fração obtida no presente trabalho (HsFr3) foi comparada por CLUE-EM com aquela produzida anteriormente (TS2C3).

Os espectros de massas registrados para os picos 1 ($t_r = 1,69$ min.), 2 ($t_r = 4,24$ min.), 3 ($t_r = 4,33$ min.) e 5 ($t_r = 4,49$ min.) da fração HsFr3 indicaram a presença de compostos com m/z de 739 $[M-H]^-$, confirmando a presença de isômeros de proantocianidina anteriormente relatados (massa molecular de 740 Da) (Carneiro Junior, 2020). Por sua vez, o espectro de massas obtido para o pico 6 ($t_r = 4,70$ min.) e 7 ($t_r = 4,85$ min.; **Figura 5.3**) indicou tratar-se de uma substância com m/z de 1027 $[M-H]^-$, compatível com uma proantocianidina trimérica (massa molecular de 1028 Da) anteriormente descrita. A análise da fração TS2C3 (obtida anteriormente) indica perfil bastante semelhante à HsFr3, com exceção da presença do pico 4 ($t_r = 4,39$ min.) corresponde a um composto com m/z de 609 $[M-H]^-$, atribuído à rutina. Ressalta-se que a fração HsFr3 não apresenta pico relativo à rutina ou de outros constituintes que não sejam proantocianidinas. Isto evidencia que o desengorduramento do extrato, realizado com diclorometano, e o refracionamento realizado em condição isocrática foram eficazes em remover a rutina residual que ainda estava presente na fração anteriormente obtida. Desta forma, podemos concluir que se obteve uma fração ainda mais enriquecida em proantocianidinas.

Figura 5.3: Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-EM para frações enriquecidas em proantocianidinas obtidas no presente trabalho (HsFr3) (a) e no trabalho anterior (TS2C3) (b) registrado no modo de ionização negativo (ESI⁻). (c) Espectros de massas dos compostos correspondentes aos picos 1 (tr = 1,69 min.); 2 (tr = 4,24 min.); 3 (tr = 4,33 min.); 5 (tr = 4,49 min.); 6 (tr = 4,70 min.); 7 (tr = 4,85 min.) e 4 (tr = 4,39 min.). Condições cromatográficas: vide Material e Métodos, **item 4.7.2**.



encontrar o solvente que garanta o tamanho adequado de poro para uma separação mais eficaz. O procedimento adotado eliminou satisfatoriamente a rotina da fração HsFr3, resultando na obtenção de uma fração enriquecida em proantocianidinas sem a presença de outros compostos polifenólicos. Na sequência do trabalho, procedeu-se a caracterização estrutural das proantocianidinas presentes em HsFr3 (**item 5.2**).

5.2 Caracterização estrutural das proantocianidinas presentes em HsFr3 por CLUE-DAD-ESI-EM/EM

Para aprofundar na caracterização das estruturas químicas das proantocianidinas presentes na fração enriquecida, experimentos de espectrometria de massas de segunda ordem foram conduzidos para os íons em m/z 739 $[MH]^-$ e m/z 1027 $[MH]^-$.

O modo negativo de ionização foi empregado na análise tendo em vista a acidez dos hidrogênios fenólicos, proporcionando maior sensibilidade e seletividade que o modo positivo de ionização (Bussy *et al.*, 2021). Os fragmentos resultantes para cada pico analisado e os valores correspondentes de TR são apresentados na **figura 5.4**.

A fragmentação do íon desprotonado em m/z 739 $[M-H]^-$ gerou os íons produto apresentados na **figura 5.4** para cada um dos picos analisados. O íon produto em m/z 289 $[M-451-H]^-$ foi atribuído à (epi)catequina desprotonada. Uma vez que não é possível determinar a quiralidade de C3 em flavan-3-óis por espectrometria de massa para definir os epímeros (por exemplo, epicatequina ou catequina), adotamos aqui a designação (epi)catequina.

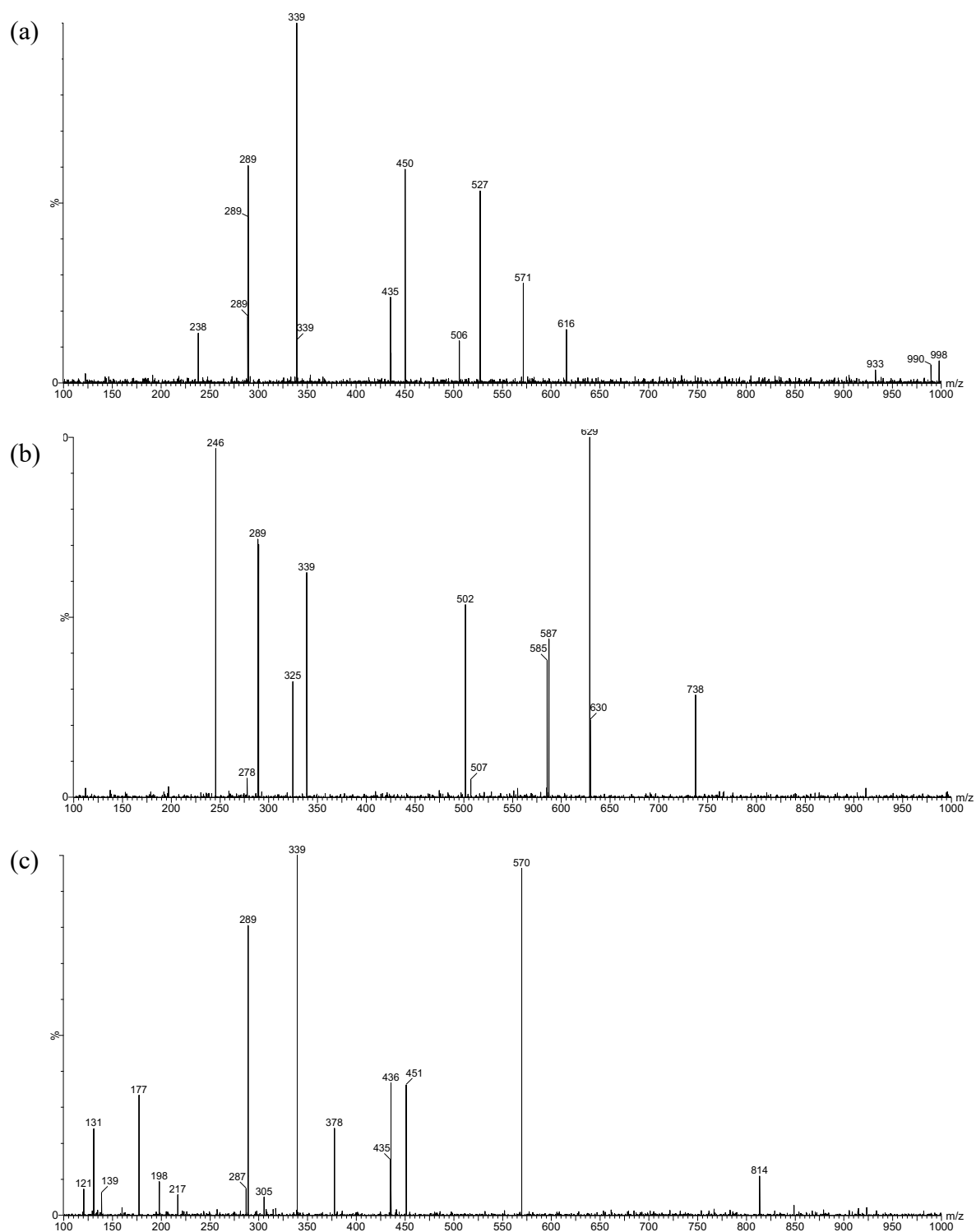
Para representar os íons produtos dos glicosídeo de proantocianidinas, apresentados na **figura 5.5**, empregamos uma nomenclatura previamente descrita, nos quais os íons contendo a aglicona são rotulados como $^{k,l}X$, onde k e l indicam as clivagens internas no anel glicosídeo (Domon e Costello, 1988; Rodrigues *et al.*, 2007). A fragmentação do íon desprotonado em m/z 739 $[M-H]^-$ produziu o íon fragmento em m/z 339 $[M-290-110-H]^-$, resultante da quebra da ligação interflavona, seguida pela perda sequencial de uma unidade de (epi)catequina (290 Da) e um catecol (110 Da) (**figura 5.5a**), formadas devido à fragmentação pela via quinona metídeo (QM). Por sua vez, a fragmentação do íon em m/z 739 $[M-H]^-$ também levou à formação do íon fragmento em m/z 587 $[M-152-H]^-$ resultante de uma fragmentação por mecanismo de retro-Diels-Alder (RDA) e perda do anel B (**figura 5.5b**). A

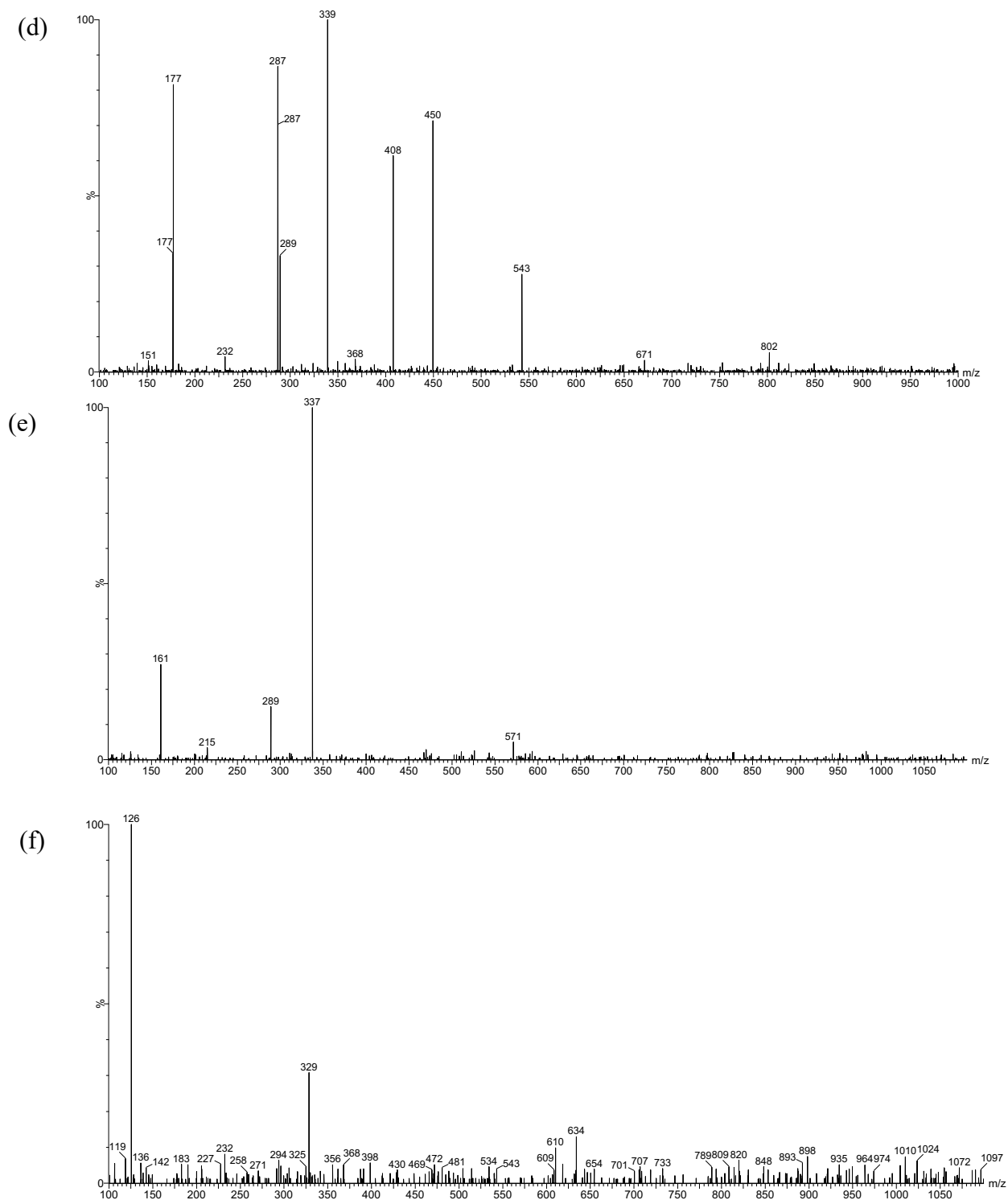
subsequente perda de água do íon em m/z 587 $[M-152-H]^-$ gera o íon fragmento em m/z 569 $[M-152-18-H]^-$ (não detectado), que, por sua vez, produz os íons em m/z 449 $[M-152-18-120]^-$ e m/z 435 $[M-152-18-134]^-$ (**figura 5.5a**).

O íon em m/z 619 indica a clivagem cruzada característica do anel de um resíduo de C-glicosídeo. O posicionamento do açúcar na unidade superior do dímero foi inferido a partir da clivagem da ligação interflavânica, resultando na formação do íon de quinona metídeo glicosilado em m/z 449. Além disso, o íon em m/z 451 $[M-288-H]^-$ é originário de uma fissão de anel heterocíclico com uma perda neutra do anel A glicosilado (**figura 5.5c**), compatível com a estrutura proposta de uma procianidina C-glicosilada do tipo B (Tala *et al.*, 2013). Além disso, a ausência de íons em m/z 577 $[M-162-H]^-$ indica que o íon precursor não é um resíduo de O-glicosídeo, tendo em vista que este íon seria observado em caso de quebra da ligação C-O de um O-heterosídeo (Es-Safi *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2007).

As proantocianidinas constituídas exclusivamente por unidades de (epi)catequina são denominadas procianidinas e o íon em m/z 739 $[M-H]^-$ é indicativo de uma procianidina dimérica do tipo B C-glicosilada, isto é, uma procianidina em que as duas unidades estão conectadas por uma ligação simples. Os dados de EM não permitem a diferenciação de estereoisômeros, tornando difícil definir a posição (4→6 ou 4→8) e a estereoquímica da ligação entre as unidades de (epi)catequina nos compostos descritos. As procianidinas com ligações 4→8 são favorecidas estereoquimicamente (Bruyne *et al.*, 1999) e, portanto, esta ligação foi adotada para representar a fragmentação na **figura 5.5**. Os espectros registrados para as fragmentações mencionadas estão demonstrados na **figura 5.4**.

Figura 5.4: Espectro de massas para os íons produto de 739 m/z [M-H]⁻ dos picos 1 (a, Tr = 1,69 min), 2 (b, Tr = 4,24min); 3 (c, tr = 4,33 min.) e 5 (d, Tr = 4,49 min) e e para os íons produto de m/z 1027 dos picos 6 (e, tr = 4,70) e 7 (f, Tr = 4,85 min), vide cromatograma da **figura 5.3**.





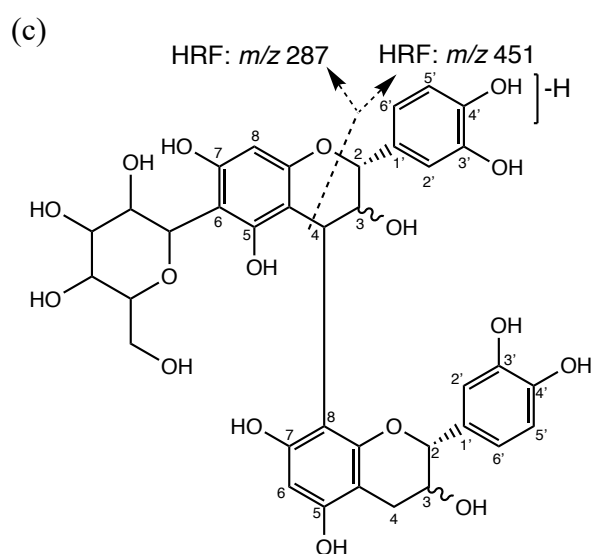
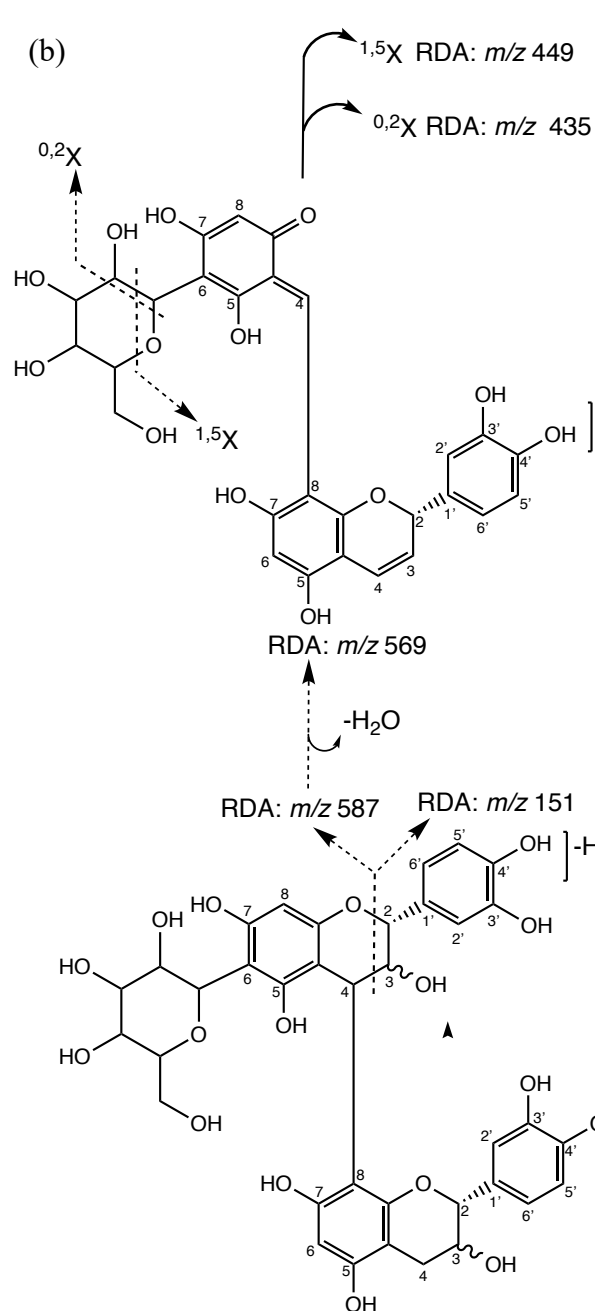
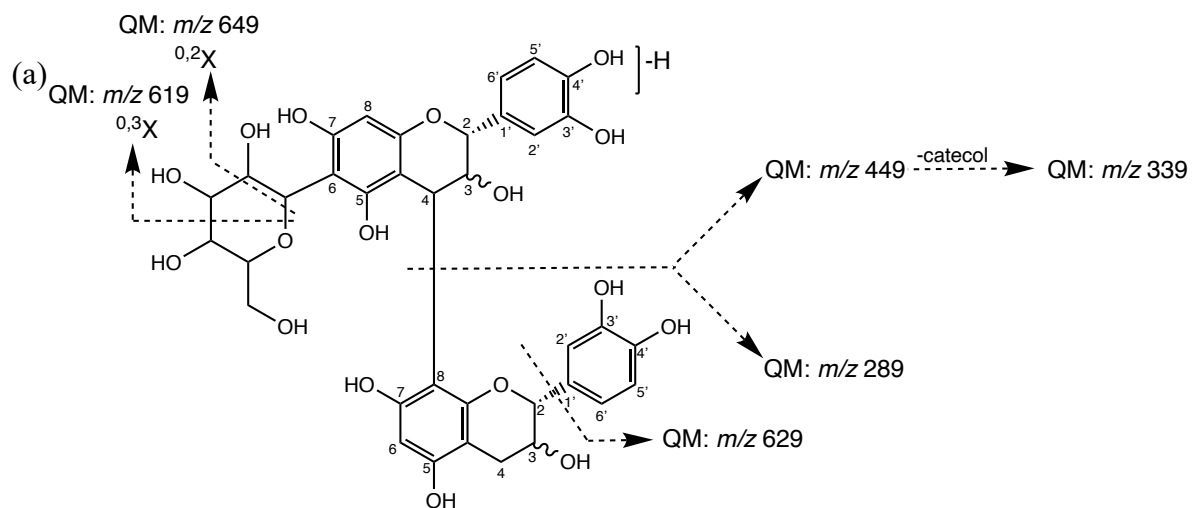
Uma análise semelhante foi realizada para os picos que geram o íon em m/z 1027 $[M-H]^-$, ou seja, o pico 6 (TR = 4,70 min) e 7 (TR = 4,85 min) (**figura 5.4e e f**, respectivamente). A fragmentação do íon desprotonado em m/z 1027 $[M-H]^-$ do pico 6 gerou o íon base em m/z 337 $[M-289-110-H]^-$. Este fragmento é provavelmente formado por um mecanismo semelhante ao descrito para a produção do íon em m/z

339 [M-H]⁻ a partir das proantocianidinas diméricas, com uma oxidação adicional de um grupo hidroxila. Por sua vez, a fragmentação do íon em m/z 1027 [M-H]⁻ do pico 7 proporcionou o íon base em m/z 126 [M-614-H]⁻, provavelmente resultante da fragmentação de uma unidade de (epi)catequina por um mecanismo de fragmentação de fissão de anel heterocíclico. Portanto, os compostos eluído como picos 6 e 7 são compatíveis com procianidinas triméricas C-glicosiladas do tipo B. A ocorrência de proantocianidina trimérica C-glicosilada com massa molecular de 1028 g/mol já foi descrita para o extrato da casca de *H. speciosa* (Rodrigues *et al.*, 2007).

Rodrigues e colaboradores (2007) descreveram a presença de séries homólogas de proantocianidinas com diferenças de 288 unidades de massa atômica. Os principais íons encontrados foram íons em m/z 289, 577, 865, 1153, 1441 e 1729, correspondentes, respectivamente, às moléculas desprotonadas de monômero, dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmetro de epi- e/ou catequina. Também foram encontradas séries homólogas, indicadas pelos íons em m/z 451, 739, 1027, 1315, 1603 e 1891, diferindo por 162 unidades de massa atômica, sugerindo a presença de hexosídeos de proantocianidinas.

Para confirmarmos a identificação proposta pela fragmentação em espectrômetro de massas, realizamos uma reação de degradação por tiólise em meio ácido que é descrita no **item 5.3**.

Figura 5.5. Proposta de vias de fragmentação para as procianidinas caracterizadas na fração rica em proantocianidinas (HsFr3) mostrando as clivagens via (a) quinona metídeo (QM), (b) retro-Diels-Alder (RDA) e (c) fissão do anel heterocíclico (HRF), observados no modo negativo de ionização, aqui representados para a procianidina com massa molecular de 740 Da. Os íons contendo a aglicona são denotados como ^{k,l}X, onde os sobrescritos k e l representam as clivagens internas no anel do resíduo de carboidrato.



5.3 Tiólise da fração enriquecida em proantocianidinas

Visando confirmar as atribuições estruturais realizadas para as procianidinas constituintes de HsFr3 à partir dos dados de fragmentação por EM, submetemos a fração rica em proantocianidinas obtida no trabalho anterior (TS2C3) e o extrato HsE à degradação química por tiólise. A fração TS2C3 foi utilizada na tiólise, ao invés de HsFr3, a nova fração obtida, pois esta foi utilizada nos ensaios biológicos aqui descritos, devido à sua menor complexidade e maior proporção de proantocianidinas.

A maioria dos taninos condensados ocorre como misturas complexas de homo- e/ou heteropolímeros nas plantas. Estes possuem diferentes proporções de unidades terminais ou extensoras de flavan-3-ol (Mueller-Harvey, 2006). Por esta razão, reações de degradação são usualmente utilizadas para a análise e caracterização de taninos em extratos ou frações enriquecidas. Dois tipos de reações de degradação são usualmente aplicados: a tiólise, com benzilmercaptano, e a fluroglucinólise, com fluroglucinol (Gea *et al.*, 2011). Neste trabalho optou-se por realizar a degradação das proantocianidinas por tiólise.

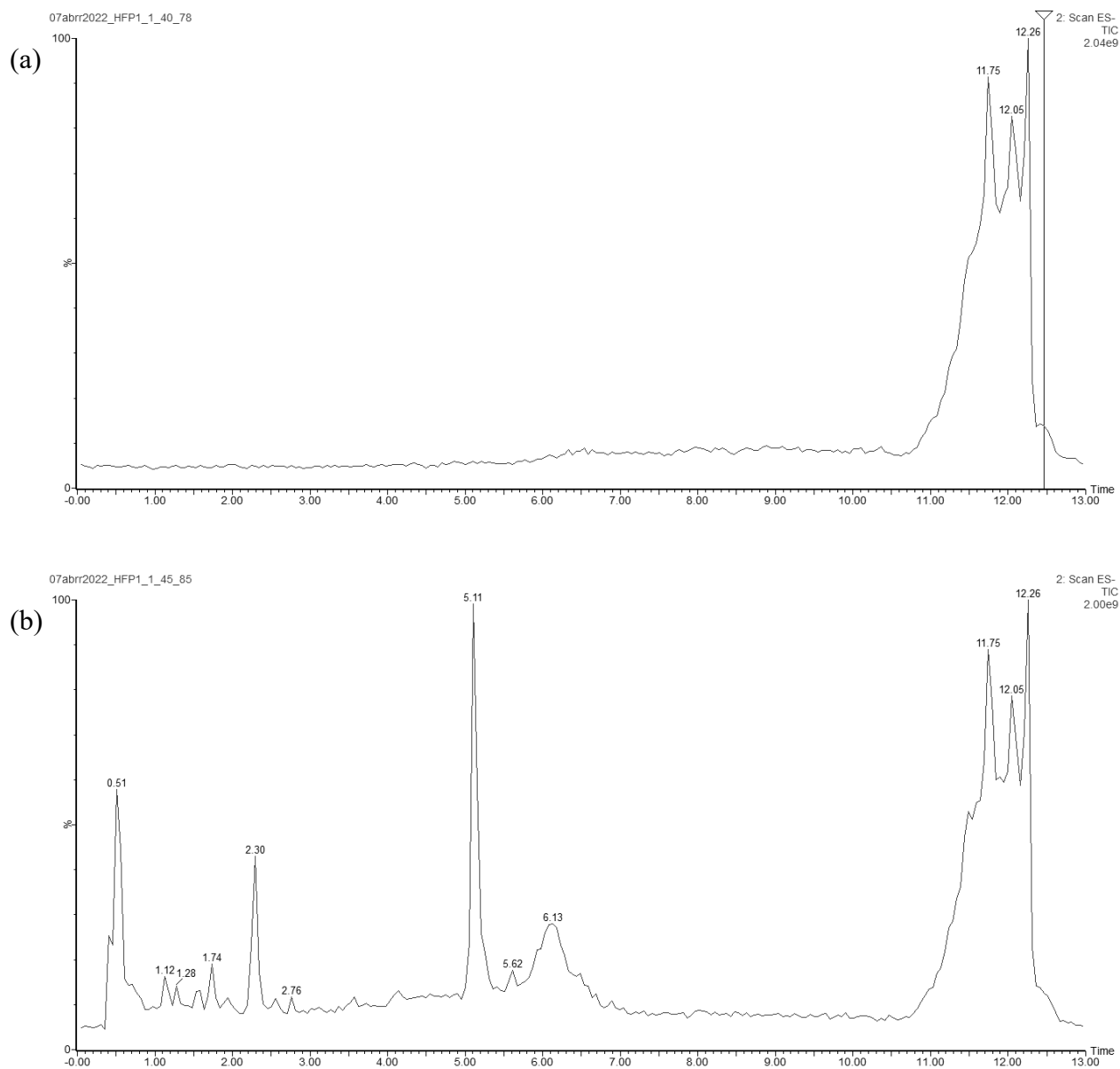
O procedimento foi realizado de acordo com o método descrito por Gea *et al.* (2011), com uma etapa crucial de otimização da temperatura de reação. Ao se realizar a tiólise de TS2C3 empregando as condições descritas no método referenciado não se observou a formação dos produtos da reação, como pode ser observado no cromatograma da **figura 5.6a**.

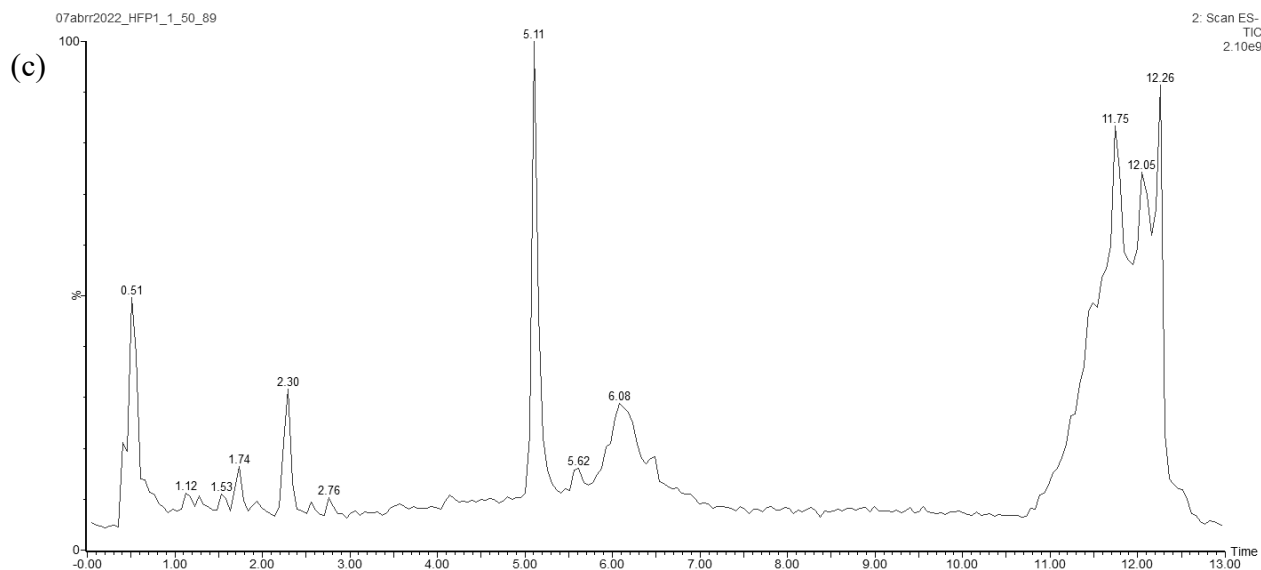
Sabe-se que a temperatura influencia na eficiência da reação. Temperaturas muito elevadas podem levar a quebras inespecíficas nas moléculas de proantocianidinas, enquanto temperaturas muito baixas levam à incompletude da tiólise (Gao *et al.*, 2018). Portanto, variou-se a temperatura da reação em +5 e +10 graus Célsius em relação às condições descritas na literatura. Desta feita, testou-se as temperaturas de 40 °C, 45 °C e 50 °C. O tempo de reação, o pH do meio reacional e a proporção de reagentes não foram modificados pois já havia sido observado a completude da reação com o aumento da temperatura.

Após avaliar as temperaturas, determinamos que 45 °C apresentou os resultados mais favoráveis, pois foi a menor temperatura necessária para a reação ocorrer e não levou à formação de produtos de degradação inespecíficos, tendo em vista que não foram observados íons não relacionados à tiólise de prociaidinas (**figura**

5.6 b e c). Posteriormente, os produtos da reação foram analisados por CLUE-DAD-EM.

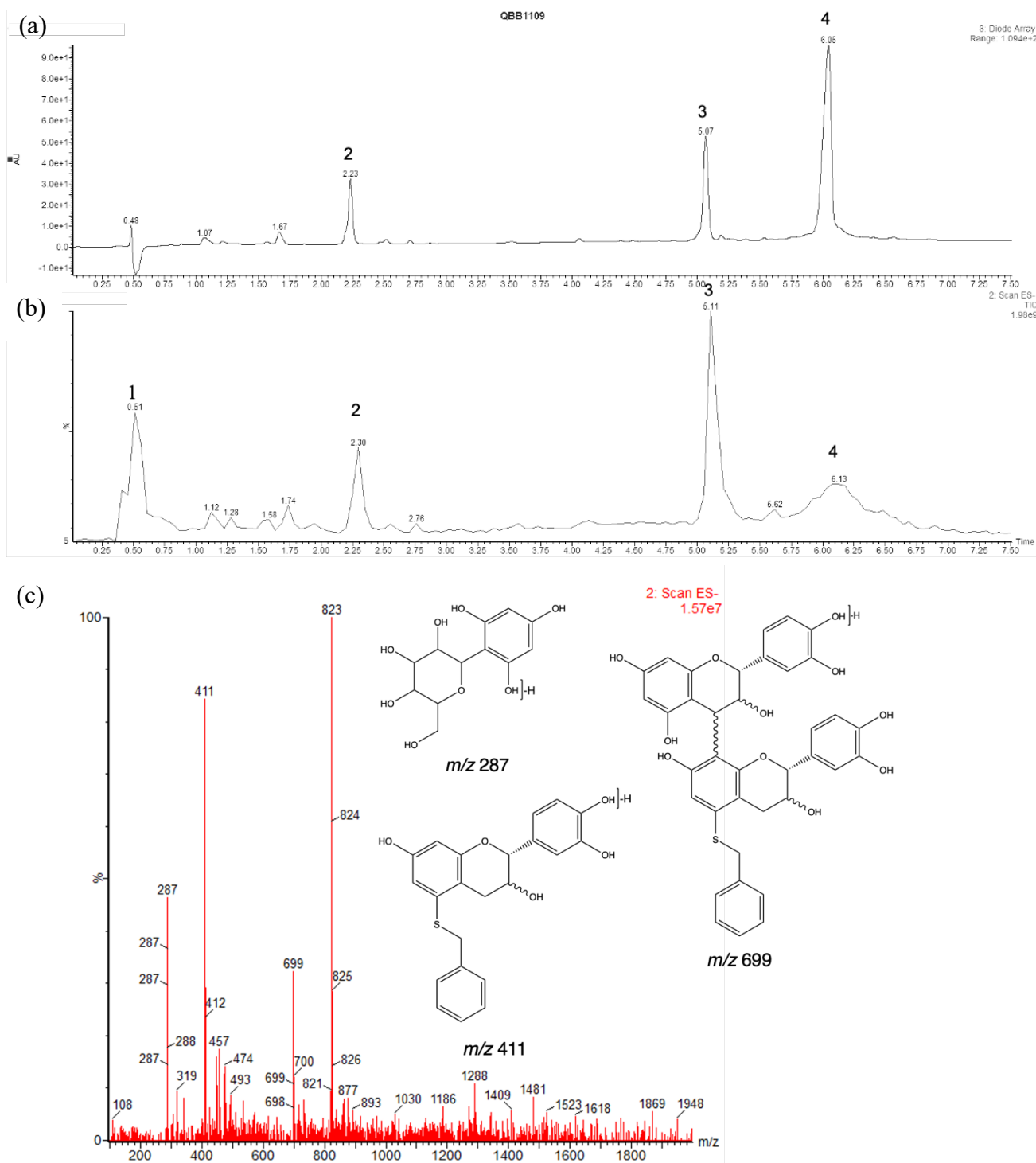
Figura 5.6 Cromatogramas obtidos por CLUE-DAD para os produtos da tiólise de TS2C3 em diferentes temperaturas **(a)** 40, **(b)** 45 e **(c)** 50 °C. Condições experimentais vide Parte Experimental, **item 4.8**.





Para fins de simplificação, será descrito detalhadamente a análise dos resultados de tiólise de TS2C3 e, posteriormente, será demonstrado a análise da tiólise do extrato. O cromatograma registrado para o produto da reação apresentou três picos principais (**figura 5.7a**) e perfil semelhante foi observado através da detecção por EM no modo de contagem total de ions (TIC) (**figura 5.7b**). O pico 1 (tr 0,51 min) é referente ao bornesitol e só é visível no cromatograma obtido por EM. A rutina foi identificada como o composto que elui como pico 2 (RT = 2,23 min), produzindo um pico base em m/z 609 $[M-H]^-$ e, portanto, confirmando que não reage com benzil mercaptano nas condições reacionais aplicadas. Por fim, o pico 4 (RT = 6,05 min) foi atribuído aos resíduos da reação, conclusão apoiada pela análise do branco da reação, apresentado em anexo (**figura 7.2**).

Figure 5.7. Análise por CLUE-DAD-ESI-EM dos produtos da degradação por tiólise de TS2C3. (a) Chromatograma registrado por DAD; (b) cromatograma de contagem total de íons (TIC) obtido por EM; (c) espectro de EM obtido no modo negativo para a ionização do pico 3, demonstrando as estruturas químicas dos principais íons observados. Os picos identificados em (a) e (b) foram: 1, bornesitol; 2, rutina; 3, produtos de tiólise; 4, resíduos de reação. Condições cromatográficas e espectrais vide Parte Experimental, itens 4.7 e 4.9, respectivamente.



A análise por EM do pico 3 revelou alguns fragmentos característicos resultantes da tiólise das proantocianidinas (**figura 5.7c**). Nesta reação, as unidades extensoras são liberadas como adutos de flavan-3-ol benzil mercaptano, consequentemente exibindo 123 unidades de massa adicionais. Por outro lado, as unidades terminais são liberadas como flavan-3-ol livres.

Conforme descrito por Engström *et al.* (2014), tanto procianidinas quanto prodelfinidinas produzem dois diferentes tipos de íons nas análises por espectrometria de massas, os quais podem ser determinados pela análise de produtos de reações, como a tiólise, dependendo se elas representam unidade extensoras ou terminais da molécula de proantocianidina correspondente. Para procianidinas, os íons característicos formados por clivagem pela via da quinona-metídeo possuem razão massa-carga de 287 (terminal) e 289 (extensora). Já para as prodelfinidinas, são esperados valores de m/z 303 para a unidade extensora e de 305 para a terminal.

Neste trabalho, o íon em m/z 287 $[M-452-H]^-$ foi atribuído à unidade extensora de procianidina, em vez do íon esperado em m/z 289 $[M-289-162-H]^-$. Uma explicação plausível é que o íon em m/z 287 é provavelmente formado por um mecanismo de fissão de anel heterocíclico, conforme descrito anteriormente (Rush *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2022). Por outro lado, o íon fragmento em m/z 411 $[M-162+123-H]^-$ foi atribuído ao aduto resultante da perda do resíduo de hexose do íon em m/z 739 $[M-H]^-$ e a adição de 123 Da da reação com o benzil mercaptano, conforme anteriormente atribuído a um benziltioéter de 3,4-(epi)catequina (Gu *et al.*, 2003). Da mesma forma, o íon fragmento em m/z 699 $[M-289-162+123-H]^-$ deriva da perda da unidade de hexose (162 Da) e da tiólise do íon em m/z 1027 $[M-H]^-$. O íon em m/z 823 provavelmente resulta da formação de *cluster* de dois íons fragmentos com massa de 412 Da.

A análise dos produtos de tiólise do extrato HsE foi realizada de maneira semelhante ao realizado para TS2C3. O cromatograma obtido está apresentado na **figura 5.8**.

Foi observado pico com $\lambda_{\max}$ em torno 279 nm compatível com proantocianidinas (pico 4). O pico 5 ($t_r = 6,05$ min) apresentou $\lambda_{\max}$ de, aproximadamente, 219 nm. Este pico, conforme discutido na tiólise de TS2C3, é referente aos resíduos de reação da tiólise.

Os resultados obtidos também revelaram a quebra da ligação glicosídica durante a tiólise, evidenciada pela análise do espectro de massas do pico 4 (**figuras**

5.7 e 5.8). Conforme pode ser visto na **figura 5.8**, foram observados fragmentos com m/z 287, 411, 699 e 823. O fragmento com m/z 287, conforme discutido anteriormente, é referente à unidade extensora da procianidina. Já os fragmentos com m/z 411 e 699 evidenciam que durante o processo de tiólise ocorreu a quebra da ligação glicosídica. Estes valores são obtidos ao se subtrair 162 Da das massas dos fragmentos teóricos das proantocianidinas com m/z 739 e m/z 1027, ou seja, indicam a perda de uma hexose. O fragmento com m/z 823 pode ser devido à formação de um *cluster* formado pela associação de dois fragmentos com massa de 412 Da $[2M-H]^-$.

A **figura 5.8** também apresenta os espectros de massas observados para os picos encontrados após a tiólise de HsE. Semelhantemente, os fragmentos encontrados após a tiólise do extrato HsE foram os mesmos observados durante a análise de TS2C3. A identificação dos fragmentos encontrados nos permite afirmar que se trata do mesmo tipo de proantocianidinas identificadas na análise da fração enriquecida. É importante informar que, em HsE, o pico 2 (tr de 1,67 min) é referente ao clorogenato de metila, apresentando m/z 367 $[M-H]^-$. Esta substância não foi encontrada nas análises do extrato por CLUE-EM realizadas, nem sua ocorrência foi descrita em extratos de *H. speciosa*. Entretanto, sua formação era esperada nas condições reacionais utilizadas. A esterificação do ácido clorogênico ocorre em altas concentrações de metanol, sob aquecimento, conforme representado na **figura 5.9**.

Em estudo anterior, foi identificada a presença de duas procianidinas isoméricas do tipo B em folhas de *H. speciosa*, e uma procianidina trimérica, utilizando CLUE acoplada à espectrometria de massa de alta resolução Orbitrap (Bastos *et al.*, 2017).

Os fragmentos em m/z 289 e m/z 573 são indicativos de que a tiólise da proantocianidina com pico em m/z 739 $[M-H]^-$ levou à formação de fragmentos que poderiam caracterizá-la como uma procianidina. Esta conclusão baseia-se no fato de que a quebra que produz um fragmento terminal em m/z 289 $[M-H]^-$ também origina um fragmento correspondente em m/z 573 $[M-H]^-$, quando se trata de uma procianidina (Engström *et al.*, 2014). Os picos dos íons correspondentes a estes fragmentos são mostrados na **figura 5.8**, juntamente com a proposta de estrutura química para cada um deles.

Figura 5.8. Análise por CLUE-DAD-ESI-EM dos produtos da degradação por tiólise de HsE. (a) Cromatograma registrado por DAD; (b) espectro de massas obtido no modo negativo para a ionização do pico 3, demonstrando as estruturas químicas dos principais íons observados. Os picos identificados em (a) foram: 2, ácido clorogênico; 3, rutina; 4, produtos de tiólise; 5, resíduos de reação. Condições cromatográficas e espectrais vide Parte Experimental, itens 4.7 e 4.9, respectivamente.

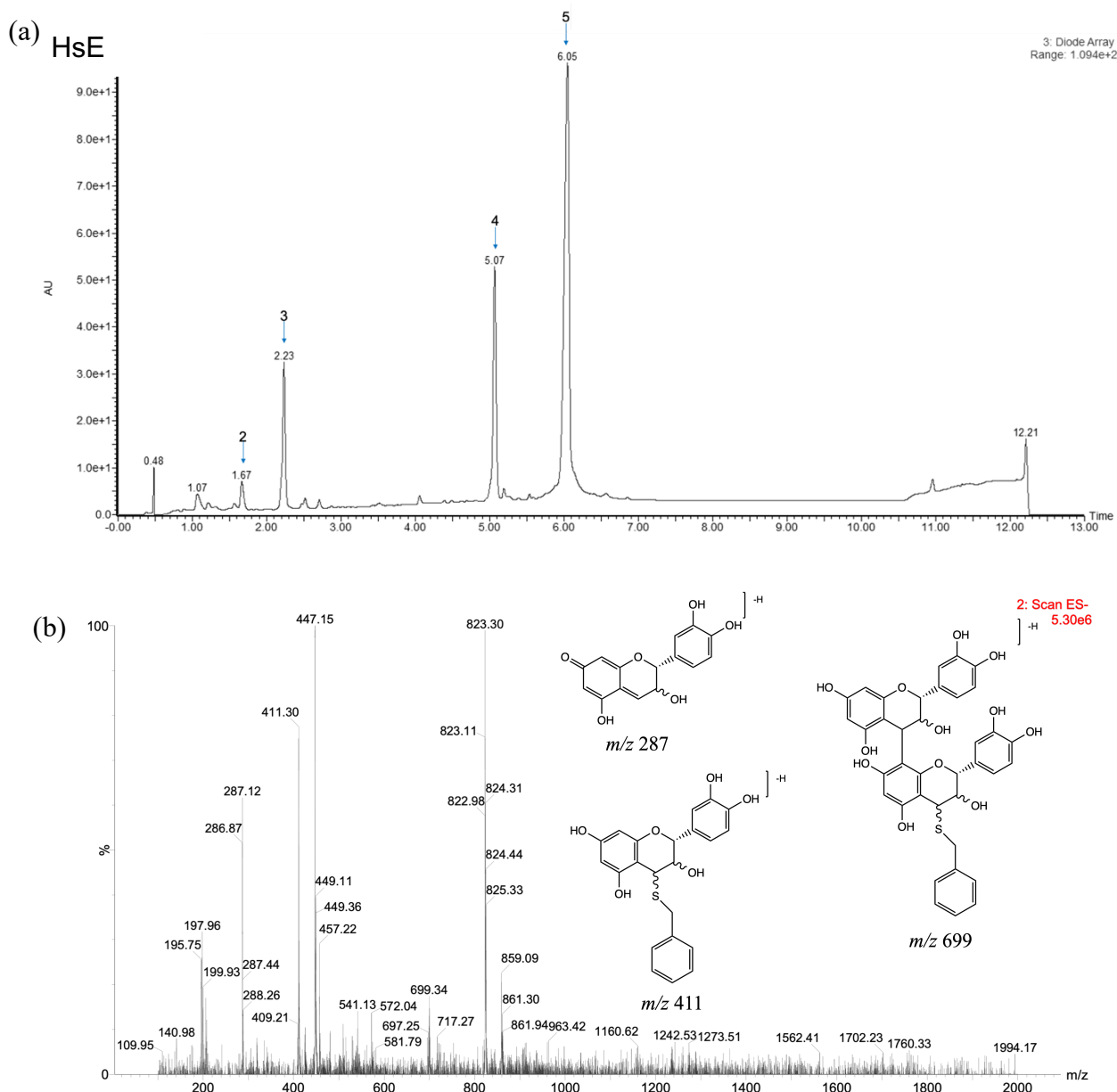
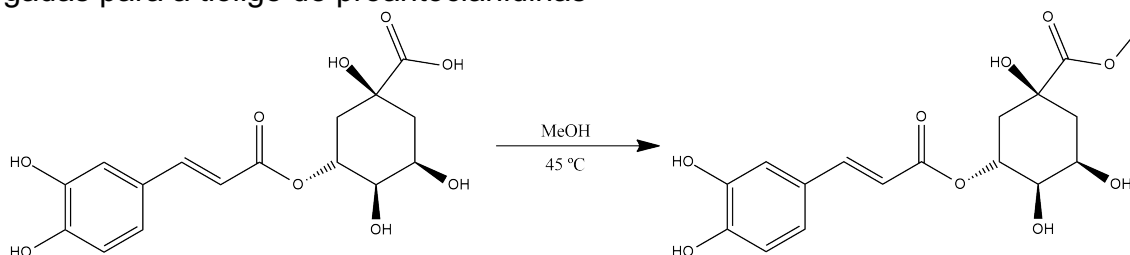


Figura 5.9: Reação de formação do clorogenato de metila nas condições reacionais empregadas para a tíolige de proantocianidinas



Os dados aqui apresentados contribuem significativamente para a compreensão da composição química desta espécie. Especificamente, relatamos, pela primeira vez, a presença de quatro isômeros de procianidina dimérica do tipo B C-glicosilada, além de dois isômeros de procianidina trimérica do tipo B C-glicosilada em uma única fração. Isto destaca a natureza complexa dos compostos polifenólicos presentes em *H. speciosa*, que podem contribuir para os diversos efeitos biológicos observados em vários extratos e frações.

Em seguida, será descrita a padronização de um método analítico para a quantificação dos compostos majoritários que foram identificados e discutidos até o momento (rutina, procianidina B2, bornesitol e ácido clorogênico), os quais podem estar relacionados às atividades biológicas observadas.

5.4 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de marcadores químicos em HsE e HsFr3

Um método de monitoramento de reações múltiplas (MRM) foi utilizado para desenvolver o método analítico para a quantificação por CLUE-EM de quatro marcadores químicos (bornesitol, procianidina B2, rutina e ácido clorogênico) em HsE e HsFr3. Estes marcadores foram definidos para a quantificação por serem os constituintes majoritários do extrato e da fração e por haver indicações na literatura de seus potenciais biológicos, sendo que estes marcadores podem estar associados aos efeitos biológicos aqui descritos. A proantocianidina B2, apesar de não estar presente nas matrizes analisadas, é um dímero de epicatequina e foi empregado como substância de referência para quantificar as procianidinas presentes em HsE e HsFr3.

5.4.1 Otimização dos parâmetros de MRM para o desenvolvimento de método analítico

Conforme descrito no **item 4.9.1.4**, realizou-se a infusão direta de padrões analíticos para a determinação de método de MRM para a análise e quantificação dos marcadores químicos (rutina, ácido clorogênico, bornesitol e procianidina B) em HsE. A determinação destes parâmetros teve como objetivo desenvolver um método analítico para a quantificação destes marcadores com elevada seletividade.

É importante destacar que os parâmetros do método de MRM para a análise das procianidinas do tipo B foram determinados com a utilização de uma procianidina B2 comercialmente disponível e que é quimicamente distinta das procianidinas caracterizadas em HsE e HsFr3 (**itens 5.2 e 5.3**). Como descrito, as procianidinas presentes nestas matrizes são do tipo B C-glicosiladas e não foi possível obtê-las para as análises descritas neste trabalho. A proantocinidina comercialmente disponível, quimicamente relacionada às caracterizadas em HsE, é a procianidina B2, um dímero de epicatequina não glicosilado. Desta forma, posteriormente, o método foi adaptado para a análise de HsFr3, modificando-se as transições de quantificação e confirmação.

Inicialmente, utilizou-se a ferramenta *intelli start*, do MassLynx (Waters®), para determinar as transições de quantificação e confirmação mais estáveis e os parâmetros ótimos de análise (energia de colisão, voltagem do cone e modo de ionização). Para facilitar a otimização, fixou-se o tune com os parâmetros previamente informados (**item 4.9.1.3**).

Os resultados da otimização estão resumidos na **tabela 5.2**. Os gráficos demonstrando a intensidade de sinal e a resposta captada pelo equipamento estão demonstrados em anexo (**figura 7.1**).

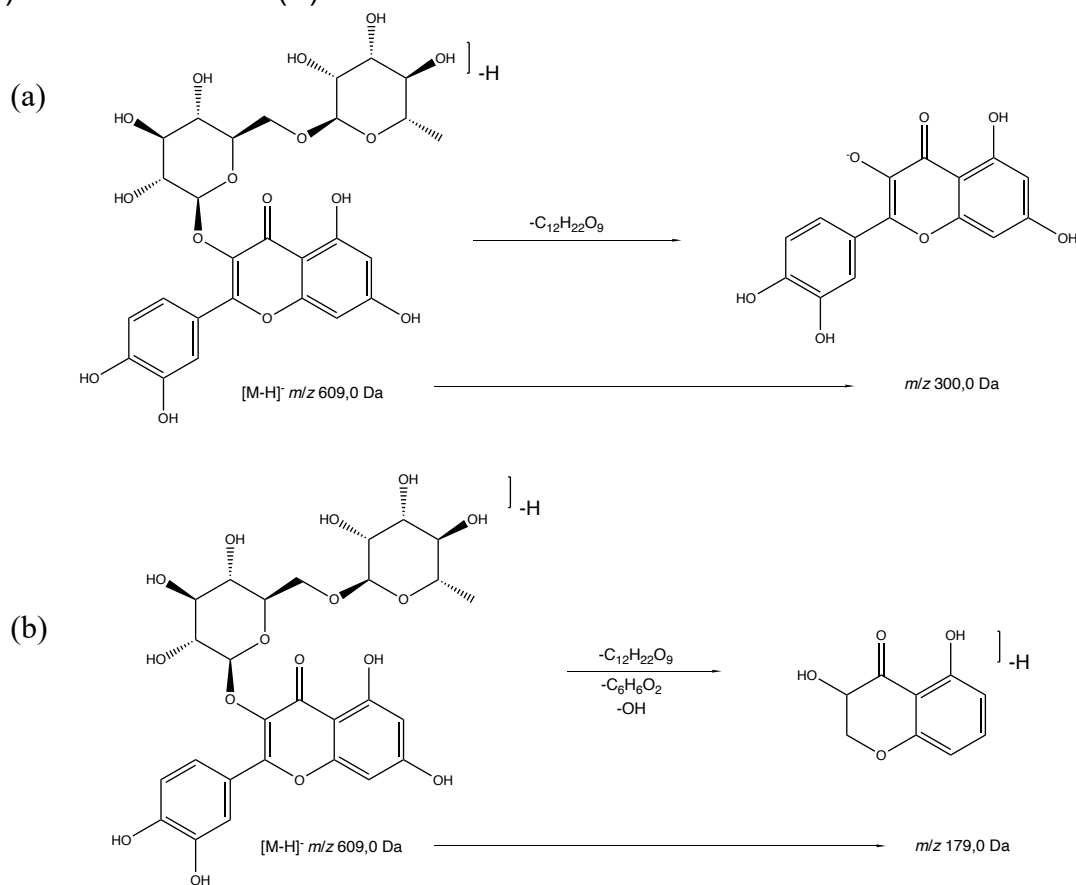
Conforme pode ser observado na **tabela 5.2**, cada um dos analitos, de acordo com suas especificidades, apresentou valores ótimos de voltagem do cone e de energia de colisão para a ionização dos compostos e para a obtenção dos diferentes íons filho. Uma importante observação sobre os dados dispostos na **tabela 5.2** é que a transição nomeada de “1” representa a transição de quantificação, aquela que apresentou-se como mais intensa e mais estável, enquanto a denominada de “2” representa aquela que será utilizada como transição de confirmação.

Tabela 5.2 Parâmetros espectrais estabelecidos para o método de monitoramento de reações múltiplas (MRM) para a quantificação dos marcadores químicos. As transições nomeadas de “1” representam a transição de quantificação e as denominadas de “2” representam a transição de confirmação de cada analito.

Composto	Massa molecular		Transição	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	Modo de ionização
Rutina	610,52	1	609,11 → 300,20	72	32	ESI-
		2	609,11 → 178,87	72	32	ESI-
Ácido clorogênico	354,31	1	353,02 → 190,92	30	18	ESI-
		2	353,02 → 84,88	30	32	ESI-
Bornesitol	194,18	1	194,89 → 108,92	20	14	ESI+
		2	194,89 → 80,92	20	20	ESI+
Proantocianidina B2	578,50	1	577,09 → 288,97	48	24	ESI-
		2	577,09 → 424,99	48	16	ESI-

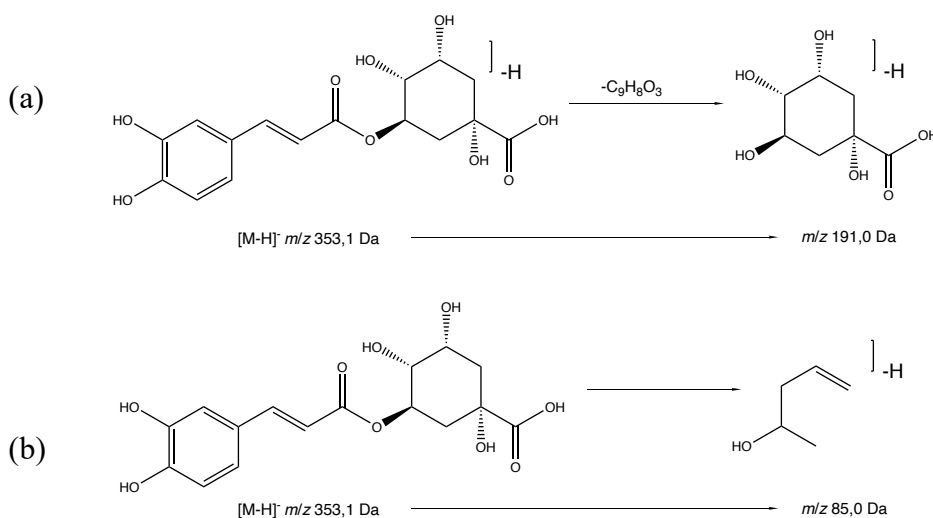
Analisando cada um dos resultados, observou-se que a transição de quantificação para a rutina foi a gerada a partir do íon molecular m/z 609 $[M-H]^-$, levando à perda de um grupo rutinose $[M-309-H]^-$ (m/z 609 → 300). Uma proposta de formação dos fragmentos analisados está demonstrada na **figura 5.10**. Esta perda de açúcares pela rutina já é bem descrita na literatura (Xie *et al.*, 2011).

Figura 5.10: Propostas de fragmentação da rutina para as transições m/z 609 $\rightarrow$ 300 (A) e m/z 609 $\rightarrow$ 179 (B).



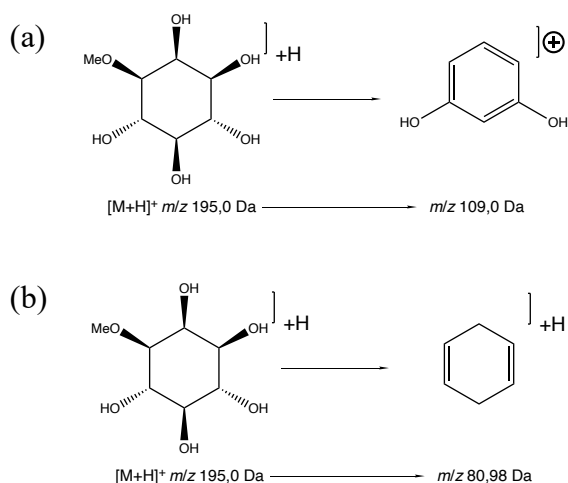
Para o ácido clorogênico, Xie *et al.* (2011) relataram a transição de quantificação partindo do íon em m/z 353 $[M-H]^-$ e obtendo o íon produto em m/z 191 $[M-H-162]^-$, correspondente à perda de uma unidade de cafeoíla (m/z 353 $\rightarrow$ 191) (**fig 5.11**), correspondendo à mesma transição aqui relatada. A transição de confirmação (m/z 353,02 $\rightarrow$ 84,88) não havia sido anteriormente descrita na literatura.

Figura 5.11: Propostas de fragmentação do ácido clorogênico para as transições m/z 353 $\rightarrow$ 191 (A) e m/z 353 $\rightarrow$ 85 (B).



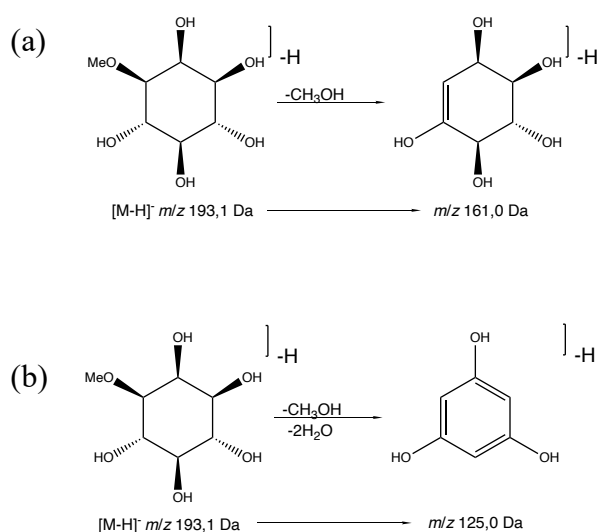
Quanto à análise dos resultados para o bornesitol, obtivemos resultados distintos daqueles descritos na literatura. Em um trabalho anterior do nosso grupo, Gomes *et al.* (2018) desenvolveram um método de MRM para a quantificação do bornesitol. Os autores otimizaram as transições de quantificação em m/z 193 $\rightarrow$ 161 [M-CH₃OH-H]⁻ e de confirmação em m/z 193 $\rightarrow$ 175 [M-CH₃OH-H₂O-H]⁻, no modo de ionização negativo (ESI⁻). No presente trabalho, estabelecemos para o bornesitol a transição de quantificação em m/z 195 $\rightarrow$ 109 e a de confirmação em m/z 195 $\rightarrow$ 81, no modo de ionização positivo (ESI⁺) (**fig 5.12**). Esta transição já foi previamente descrita para a fragmentação do inositol (Hsu *et al.*, 2003).

Figura 5.12: Propostas de fragmentação do bornesitol para as transições m/z 195 $\rightarrow$ 109 (A) e m/z 195 $\rightarrow$ 81 (B).



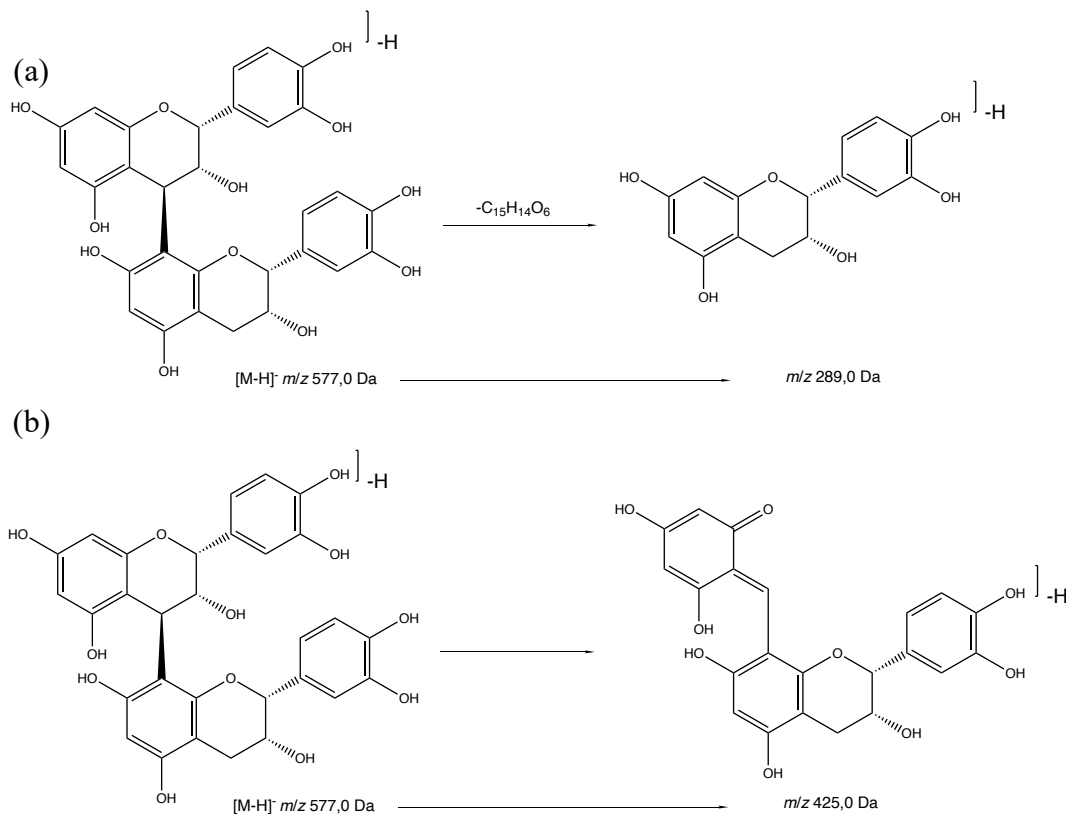
Esta diferença nas transições observadas pode ser devida a termos utilizados energias de colisão e ionização distintas e por termos ampliado a faixa de detecção. Gomes *et al.* (2018) empregaram detecção de íons acima de m/z 100 e, no trabalho atual, realizamos as análises com valores de m/z a partir de 70.

Figura 5.13: Propostas de fragmentação do bornesitol para as transições m/z 195 $\rightarrow$ 161 (A) e m/z 195 $\rightarrow$ 175 (B), proposto por Gomes *et al.*, 2018.



Os nossos resultados para a transição de quantificação da proantocianidina B2 foram bastante semelhantes aos descritos na literatura. Observamos a transição partindo do íon molecular em m/z 577 [M-H]⁺ para o íon produto em m/z 289 [M-288-H]⁺, com a perda de uma unidade de epicatequina (m/z 577 $\rightarrow$ 289), semelhante ao descrito previamente (**figura 5.14**) (Zywicki *et al.*, 2002; Prasain *et al.*, 2009; Vihaskas *et al.*, 2015).

Figura 5.14: Propostas de fragmentação da procianidina B2 para as transições m/z 577 $\rightarrow$ 289 (A) e m/z 577 $\rightarrow$ 425 (B).



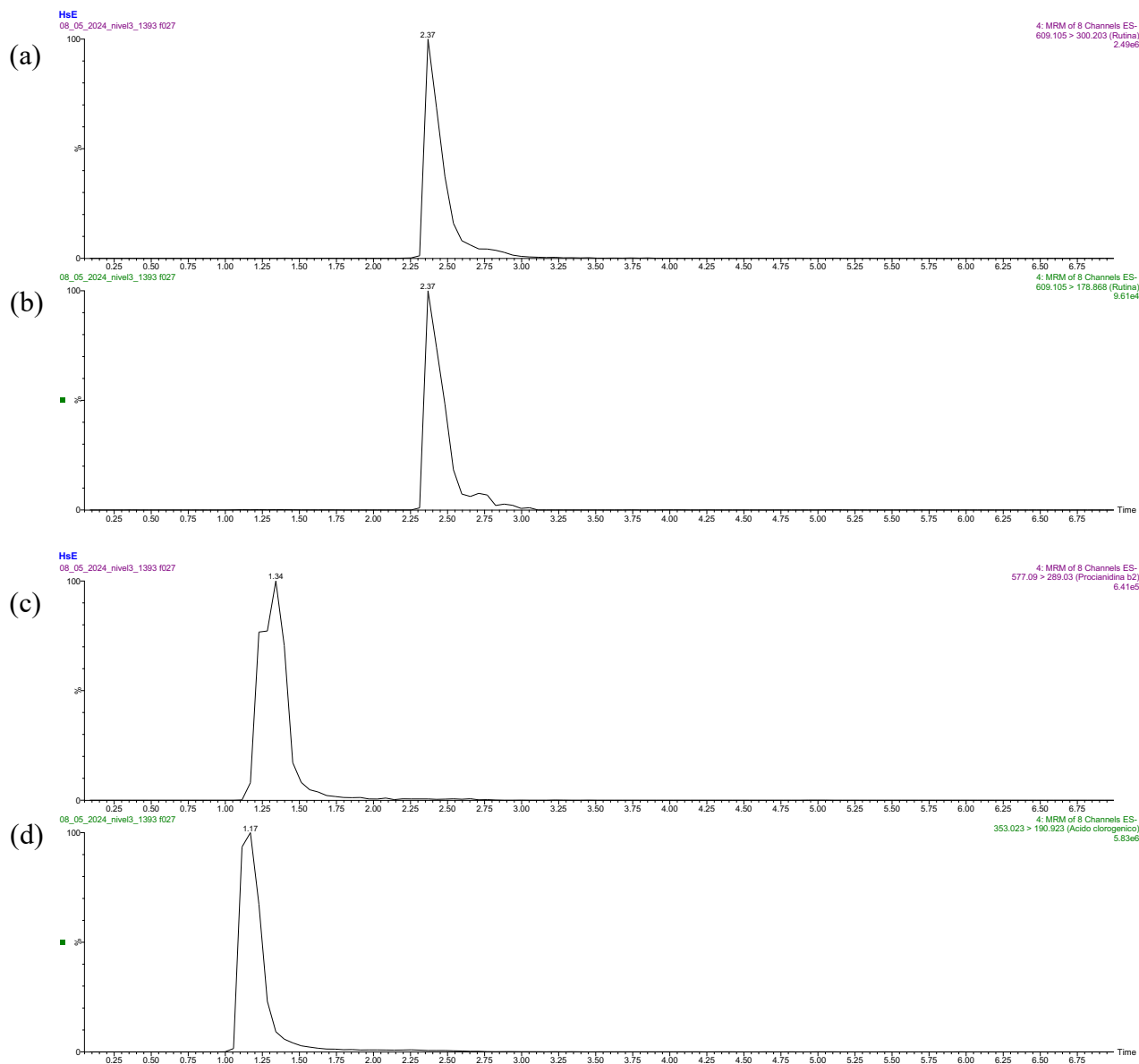
5.4.2 Validação do método analítico para quantificação de marcadores químicos em HsE e HsFr3

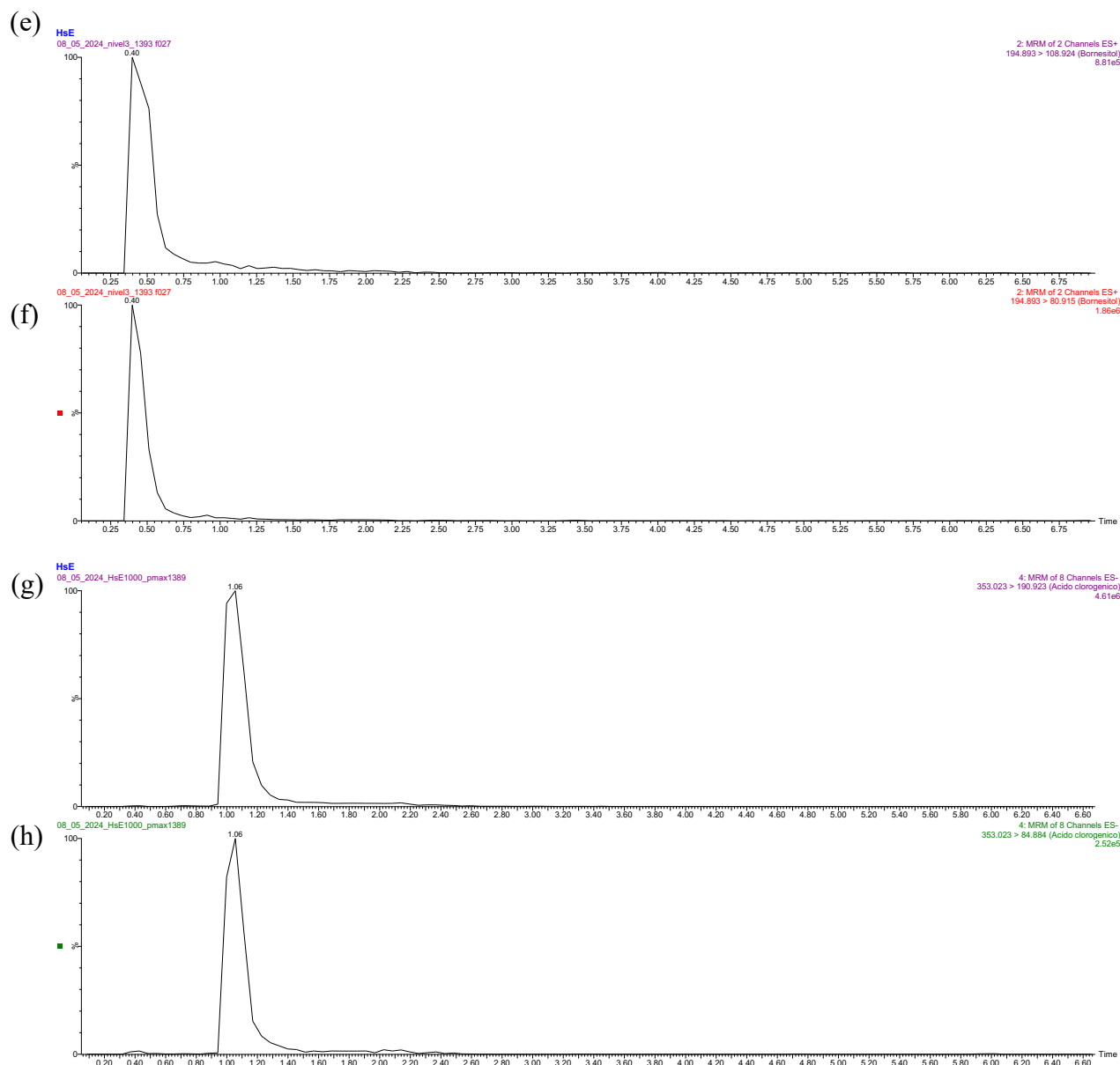
O método de MRM otimizado (**item 5.4.1**) foi empregado para desenvolver o método analítico para a quantificação de quatro marcadores químicos (bornesitol, procianidina B2, rutina e ácido clorogênico) em HsE e HsFr3

5.4.2.1 Seletividade

A seletividade de um método analítico pode ser determinada por meio da sua capacidade em identificar o analito na presença de outros componentes da amostra analisada (Brasil, 2017). Os resultados obtidos demonstraram que o método é seletivo, uma vez que não foram detectados picos interferentes que produzissem íon com a mesma razão massa/carga dos íons monitorados (**fig 5.15**).

Figura 5.15: Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-EM/EM no modo MRM para as SQR rotina (a e b), procianidina B2 (c e d), bornesitol (e e f) e ácido clorogênico (g e h), nas transições de quantificação e confirmação, respectivamente





5.4.2.2 Linearidade

A confirmação da resposta linear foi definida pela construção de três curvas analíticas, em três dias consecutivos, para cada um dos analitos avaliados.

As curvas analíticas obtidas demonstram a relação linear entre as concentrações de rutina, bornesitol, procianidina B2 e ácido clorogênico ($\mu\text{g/mL}$) e as áreas dos picos correspondentes para as transições de quantificação (rutina m/z 609 $\rightarrow$ 300; ácido clorogênico m/z 353 $\rightarrow$ 191 Da; bornesitol m/z 195 $\rightarrow$ 109; e procianidina B2 m/z 577 $\rightarrow$ 289). As curvas obtidas nos três dias consecutivos de análise não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos analitos ($p > 0,05$). Desta forma, os dados destas curvas foram reunidos para a construção das

curvas médias (**figura 5.16**). O método analítico se demonstrou linear dentro das faixas analisadas.

Os coeficientes de determinação (r^2) atendem o estabelecido na legislação brasileira (Brasil, 2017), com valores superiores a 0,99. As curvas analíticas obtidas, as equações lineares correspondentes e os demais dados da regressão linear são apresentados na **figura 5.16**. A homoscedasticidade dos dados obtidos e a dispersão dos resíduos estão representados na **figura 5.17**.

Figura 5.16: Curvas analíticas médias construídas para a quantificação de rutina (a), bornesitol (b), procianidina B2 (c) e ácido clorogênico (d), obtidas por UPLC-ESI-MS/MS, no modo MRM.

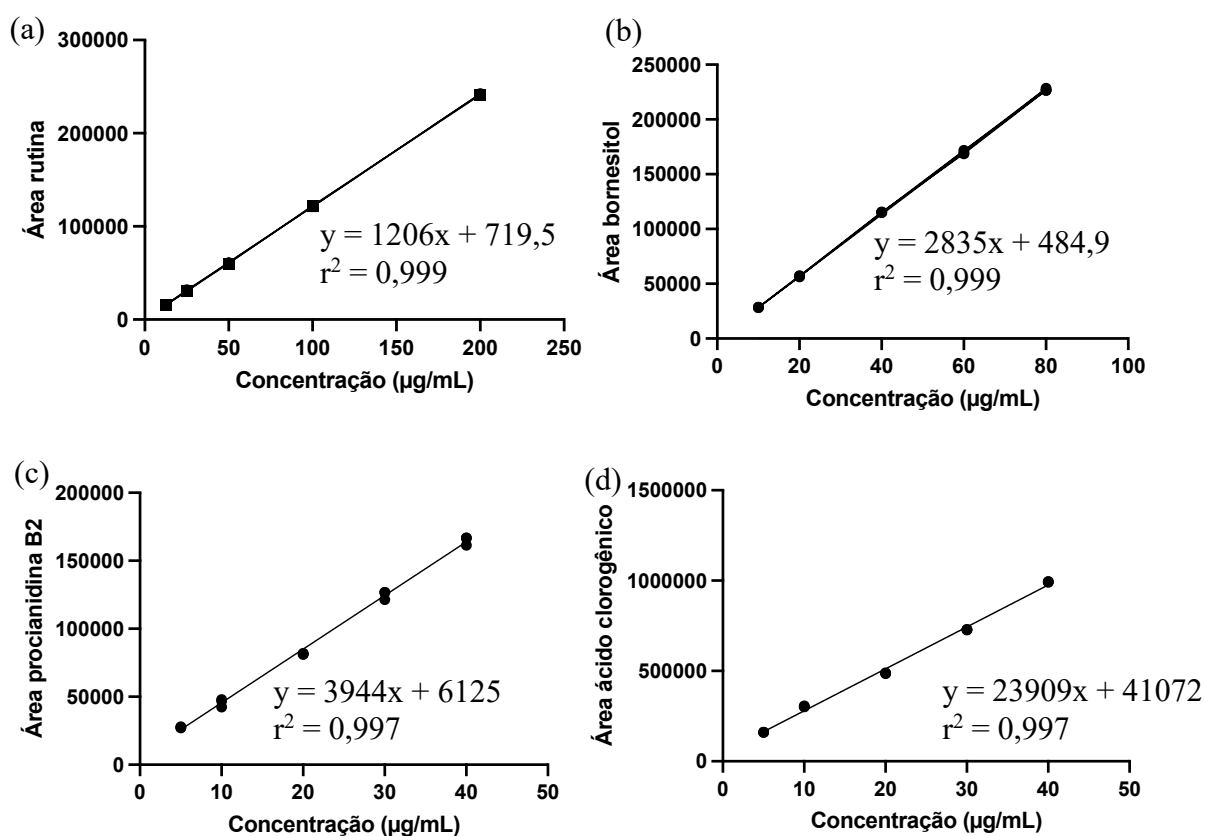
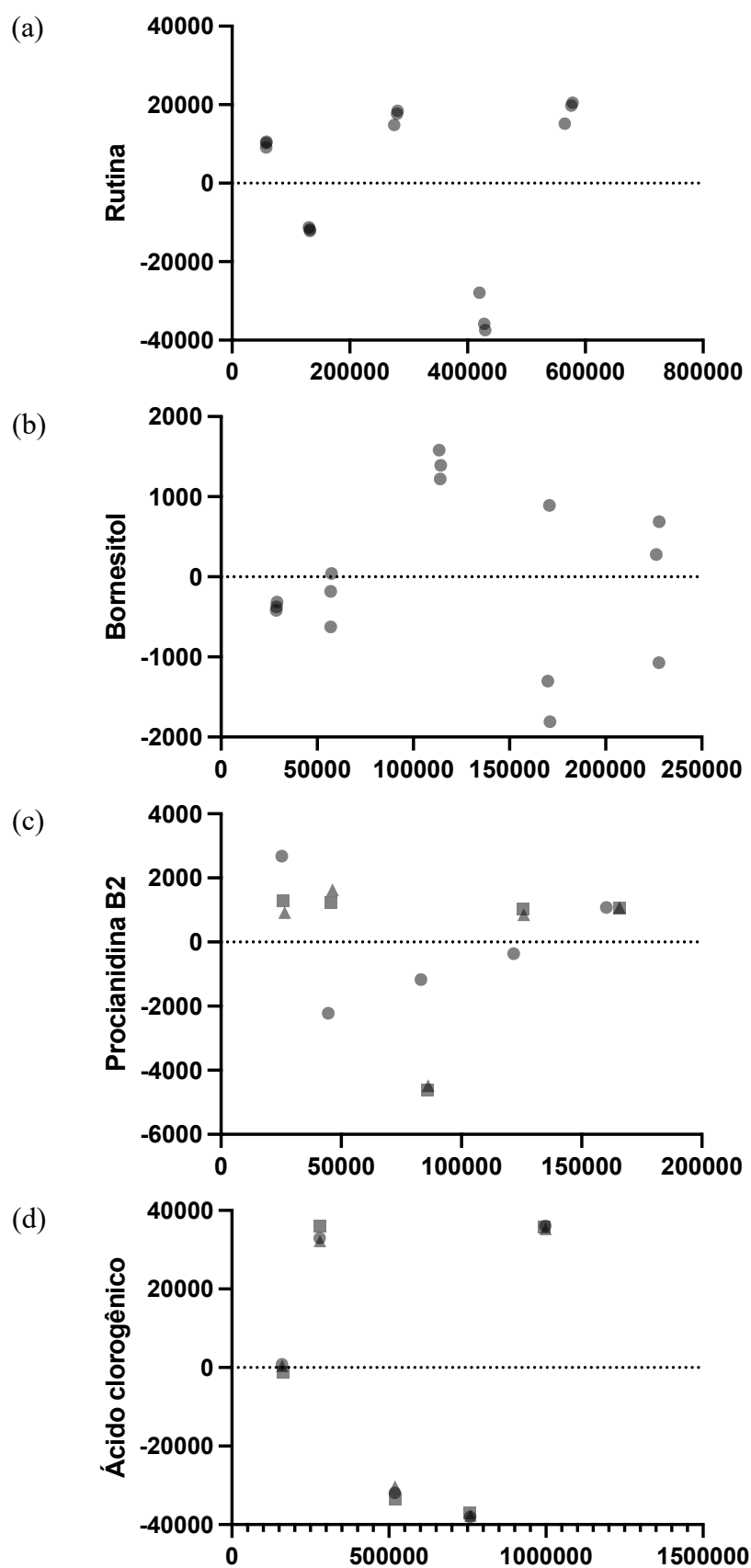


Figura 5.17: Dispersão dos resíduos obtidos nas curvas analíticas médias de rutina (a), bornesitol (b), procianidina B2 (c) e ácido clorogênico (d)



5.4.2.3 Limite de quantificação e detecção

Os limites de quantificação para o bornesitol, rutina, procianidina B2 e ácido clorogênico foram, respectivamente, 3,5 µg/mL, 3,3 µg/mL, 0,9 µg/mL e 0,3 µg/mL.

Já os limites de detecção para o bornesitol, rutina, procianidina B2 e ácido clorogênico foram, respectivamente, 1,2 µg/mL, 1,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 0,1 µg/mL.

5.4.2.4 Precisão

Segundo o Guia de Validação de Métodos Analíticos do Ministério da Agricultura e Pecuária do Brasil (MAPA), a “precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas” (Brasil, 2011), devendo ser analisada em diferentes períodos de tempo, correspondendo aos valores avaliados no mesmo dia (intradia) e em diferentes dias (interdias). Os resultados obtidos indicam valores de DPR menores do que 5% para a precisão intradia (**tabela 5.3**) e interdias (**tabela 5.4**), demonstrando que o método analítico desenvolvido apresenta precisão adequada. Atualmente, não são estabelecidos valores de aceitabilidade da precisão pela ANVISA, ficando a critério do analista, conforme a RDC 166/2017. Desta forma, neste trabalho, adotou-se o percentual de 5% de aceitabilidade, conforme era descrito pela ICH (1996).

Tabela 5.3: Dados da precisão intradia do método para quantificação do bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidina B2 por CLUE-ESI-EM/EM no modo MRM. Vide Parte Experimental, **item 4.9.4.6**.

Amostra	Concentração (µg/mL)			
	Bornesitol (40 µg/mL)	Ácido Clorogênico (20 µg/mL)	Rutina (50 µg/mL)	Procianidina B2 (20 µg/mL)
1	40,6	20,3	49,8	20,8
2	40,4	20,3	50,7	20,5
3	40,5	20,4	50,7	20,7
4	40,3	20,4	50,9	20,6
5	40,3	20,1	50,7	20,5
6	40,2	20,1	50,6	20,7
Média	40,4	20,3	50,6	20,6
DPR (%)	0,4	0,8	0,8	0,5

Tabela 5.4: Dados da precisão interdias do método para quantificação do (a) bornesitol, (b) ácido clorogênico, (c) rutina e (d) procianidina B2 por CLUE-ESI-EM/EM no modo MRM. Vide Parte Experimental, **item 4.9.4.6**.

Amostra	Concentração (µg/mL)			
	Bornesitol (40 µg/mL)	Ácido clorogênico (20 µg/mL)	Rutina (50 µg/mL)	Procianidina B2 (20 µg/mL)
1	40,6	20,3	49,8	20,8
2	40,4	20,3	50,7	20,5
3	40,5	20,4	50,7	20,7
4	40,3	20,4	50,9	20,6
5	40,3	20,1	50,7	20,5
6	40,2	20,1	50,6	20,7
7	40,5	20,4	49,7	20,7
8	40,7	20,2	51,5	20,7
9	40,7	20,4	49,8	20,6
10	40,6	20	50,7	20,6
11	40,5	20,1	50,8	20,5
12	40,5	20,4	50,8	20,7
Média	40,5	20,3	50,6	20,6
DPR (%)	0,4	0,8	1,1	0,4

5.4.2.5 Exatidão

A exatidão de um método demonstra o grau de concordância entre os resultados obtidos no método e o valor considerado aceito como verdadeiro. Neste trabalho, a exatidão foi avaliada através do ensaio de recuperação em amostra fortificada. O ensaio foi realizado em três níveis de concentração para cada marcador. Conforme pode ser observado na **tabela 5.5**, apenas os resultados para a rutina (**tabela 5.5c**) demonstraram valor de DPR inferior a 5% para todas as concentrações analisadas, valor que é recomendado pela literatura (ICH, 1996). Para o bornesitol (**tabela 5.5a**), ácido clorogênico (**tabela 5.5b**) e procianidina B2 (**tabela 5.5d**), o DPR foi maior do que 5% na menor concentração testada para cada analito. Este resultado demonstra um percentual de desvio elevado quando estes analitos são avaliados próximo ao limite inferior da curva de calibração.

Tabela 5.5: Exatidão do método analítico para quantificação de bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidina B2 por CLUE-ESI-EM/EM no modo MRM, determinada a partir da recuperação dos analitos em amostra fortificada.

(a)

Bornesitol

Concentração (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
10	11,1	111,4	114,7	6,3
10	11,0	109,7		
10	12,3	123,0		
40	40,1	100,3	100,8	0,4
40	40,4	101,0		
40	40,4	100,9		
80	78,1	97,6	100,7	2,7
80	81,5	101,9		
80	82,1	102,6		

(b) **Ácido Clorogênico**

Concentração (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
5	5,0	100,7	107,4	5,6
5	5,5	109,2		
5	5,6	112,3		
20	20,3	101,3	100,7	0,5
20	20,0	100,2		
20	20,2	100,8		
40	40,1	100,2	100,7	0,5
40	40,2	100,6		
40	40,5	101,2		

(c) **Rutina**

Concentração (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
12,5	14,0	111,9	118,3	4,8
12,5	15,0	120,2		
12,5	15,4	122,9		
50	49,6	99,2	100,3	0,9
50	50,2	100,5		
50	50,5	101,0		

100	100,1	100,1		
100	100,4	100,4	100,8	0,9
100	101,9	101,9		

(d) **Procianidina B2**

Concentração µg/mL	Concentração obtida µg/mL	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
5	6,6	131,5		
5	6,0	119,9	124,3	5,1
5	6,1	121,5		
20	19,9	99,3		
20	19,9	99,3	99,3	0,1
20	19,9	99,4		
40	40,9	102,2		
40	40,4	101,0	101,1	1,1
40	40,0	100,0		

5.4.2.6 Robustez

A robustez do método analítico é uma forma rápida de medir a capacidade do método padronizado em resistir a variações nas condições analíticas ou dos equipamentos para a análise, evidenciando quais fatores influenciam a resposta do método de forma significativa (Brasil, 2017).

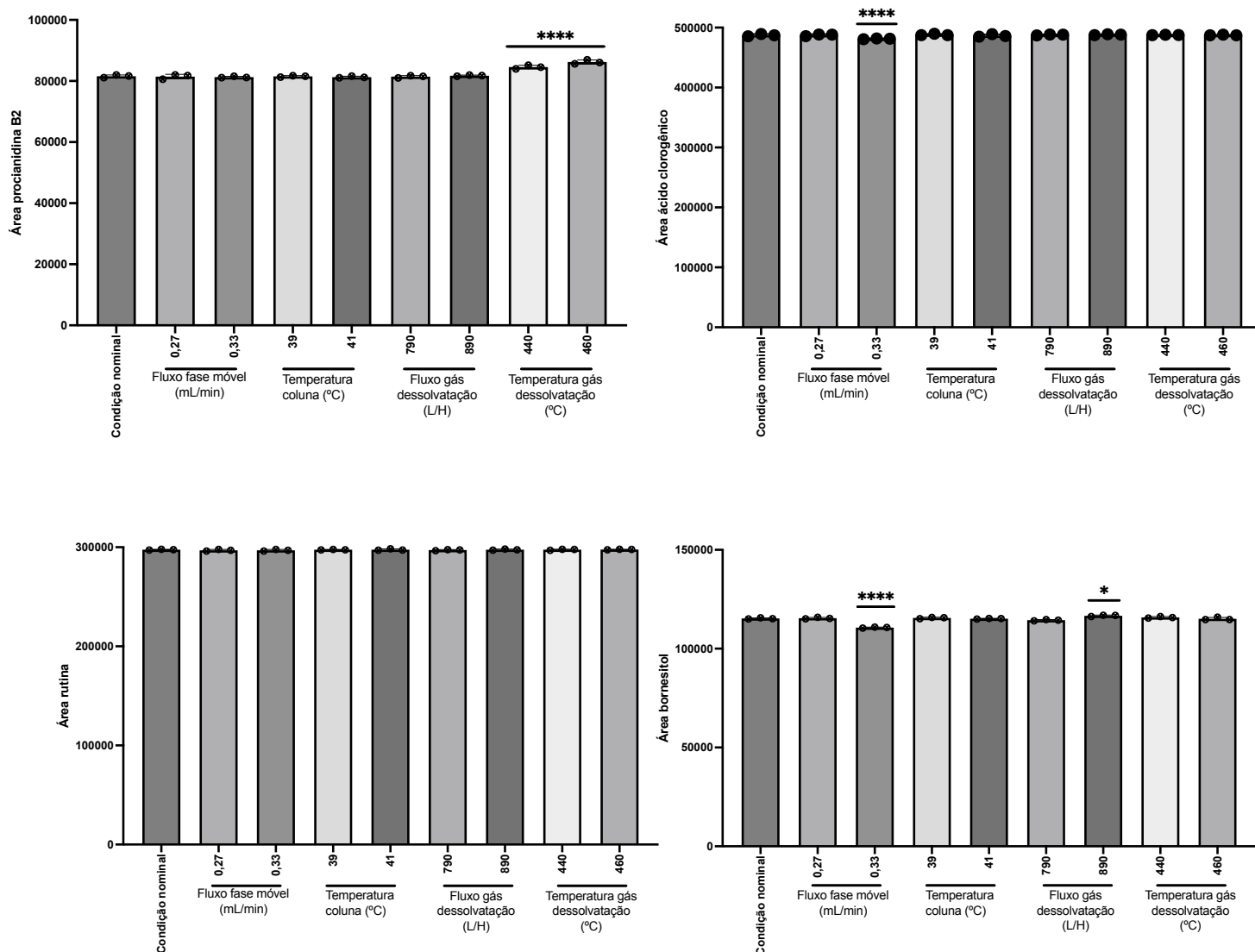
A robutez foi avaliada após a quantificação dos analitos (bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidina B2) na condição nominal e sob alterações deliberadas no fluxo da fase móvel (0,27 e 0,33 mL/min), temperatura da coluna (39 e 41 °C), fluxo do gás de dessolvatação (790 e 890 L/h) e temperatura do gás de dessolvatação (440 e 460 °C). Os resultados do estudo de robustez para o método de quantificação dos analitos avaliados estão representados na **figura 5.18**.

Com a finalidade de observar quais parâmetros influenciam no método analítico, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância por ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey. Foi observada diferença estatisticamente significativa para algumas das condições variadas, em relação à condição nominal. Para o bornesitol, observou-se que o aumento do fluxo (0,33 mL/min; $p < 0,0001$) e o aumento do fluxo do gás de dessolvatação (890 L/h; $p < 0,05$) levaram a diferenças estatisticamente significativas. O mesmo foi observado para o ácido clorogênico em relação ao fluxo da fase móvel (0,33 mL/min; $p < 0,0001$), e para a procianidina B2 em

relação à temperatura do gás de dessolvatação, sendo que o aumento (460 °C; $p < 0,0001$) ou a redução da temperatura (440 °C; $p < 0,0001$) levaram a diferença estatística, quando comparado à condição nominal.

Os resultados obtidos da validação do método analítico para quantificação de bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidina B2 por CLUE-ESI-EM/EM, no modo MRM, foram satisfatórios, mas que o método necessita de atenção quanto a mudanças nas condições padronizadas.

Figura 5.18: Avaliação da robustez do método analítico para quantificação de bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidina B2 por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM. Os resultados representam a média $\pm$ DP de três experimentos. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$, em relação à condição nominal.



5.5 Quantificação dos teores dos marcadores em HsE e HsFr3

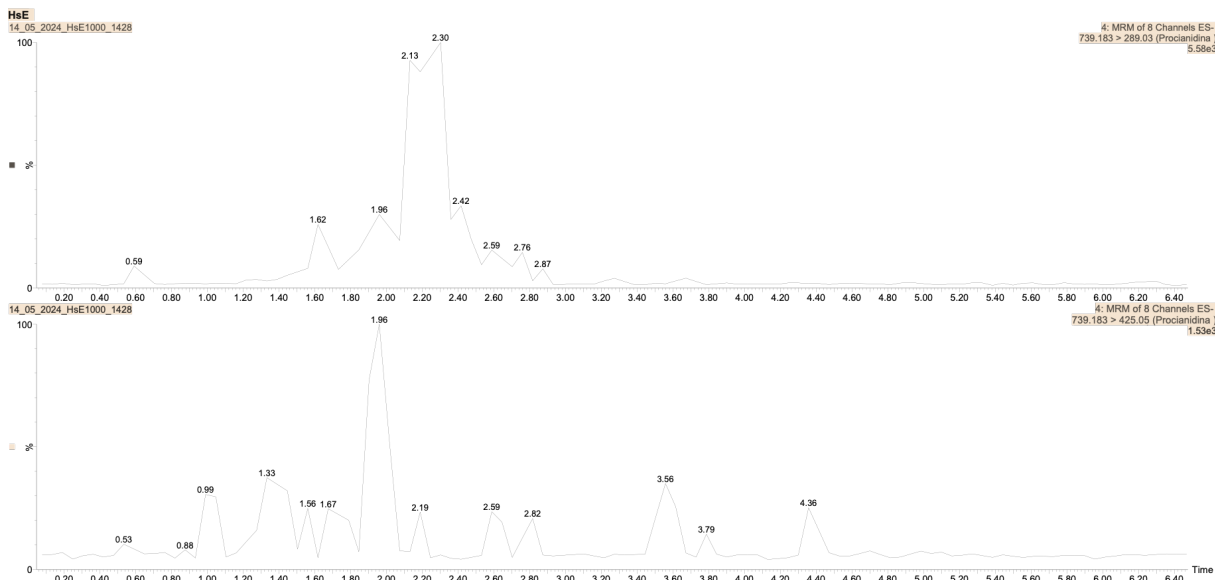
Após a validação do método analítico, as curvas analíticas validadas foram empregadas na quantificação de bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidinas totais expressas como proantocianidina B2 em HsE e HsFr3.

É importante destacar que a quantificação de procianidina do tipo B C-glicosilada no extrato e na fração foi feita de maneira indireta a partir da procianidina B2. Esta estratégia foi utilizada devido a indisponibilidade de SQR comercialmente disponível das procianidinas presentes no extrato e na fração, caracterizadas nos itens **5.2 e 5.3**. Para tanto, empregou-se inicialmente a fração enriquecida em procianidinas do tipo B C-glicosiladas (HsFr3), previamente padronizada com base no total de proantocinidinas determinado por espectrofotometria no UV-Vis (Carneiro Junior, 2020), como padrão para determinar os parâmetros de MRM e para a conferência da adequabilidade da curva analítica desenvolvida com o padrão comercialmente disponível para a quantificação de proantocinidinas presentes em HsE e HsFr3. Para a conferência de adequabilidade da curva analítica, HsFr3 foi utilizada em três diferentes concentrações, que seriam correspondentes ao ponto mais baixo (5 µg/mL), ao ponto médio (20 µg/mL) e ao ponto mais alto da curva (40 µg/mL) da curva analítica desenvolvida com o padrão de procianidina comercialmente disponível.

Esta análise da adequabilidade do método analítico por meio da utilização de uma fração enriquecida em proantocianidinas foi realizada de acordo com o previamente descrito por Engström *et al.* (2014).

Como se trata de uma fração enriquecida, não foi possível realizar infusão direta no espectrômetro de massas para a preservação do equipamento. Deste modo, as transições foram propostas de acordo com o estudo de fragmentação relatado nos itens **5.2 e 5.3**. Deste modo, utilizou-se como transição de quantificação a transição m/z 739 → 289 e de confirmação a transição m/z 739 → 425, conforme demonstrado no cromatograma da **figura 5.19**. Desta forma, foram quantificados os 4 picos cromatográficos relacionados às proantocianidinas diméricas (ver **figura 5.3b**: picos 1 (Tr = 1,69 min), 2 (Tr = 4,19min); 3 (Tr = 4,29min) e 5 (c, Tr = 4,49 min)) e para os íons produto de m/z 1027 do pico 5 (d, Tr = 4,85 min), mas não foi possível quantificar o percentual de procianidinas triméricas, uma vez que não foi possível obter o perfil de fragmentação destas.

Figura 5.19: Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-EM/EM no modo MRM para as modificações realizadas na análise das procianidinas do tipo B C-glicosiladas caracterizadas no HsE, conforme descrito no **item 5.3 e 5.4**.

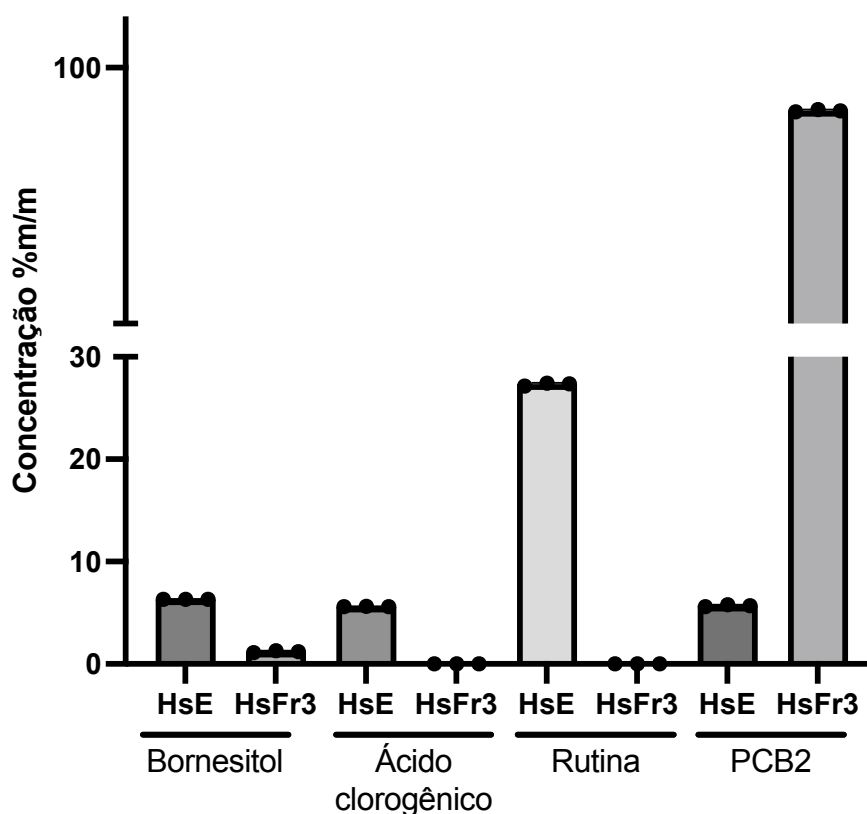


Em HsE, observou-se que as concentrações (média $\pm$ d.p. % massa/massa) de bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidina B2 foram, respectivamente, $6,3 \pm 0,2\%$, $5,6 \pm 0,7\%$, $27,2 \pm 0,2\%$ e $5,8 \pm 0,1$. Já em HsFr3, rutina e ácido clorogênico não foram detectados, indicando que esses analitos se encontram abaixo dos limites de detecção e quantificação do método desenvolvido, enquanto a concentração de bornesitol foi de $1,2 \pm 0,1\%$ m/m e de a procianidinas do tipo B C-glicosiladas foi de $95,8 \pm 0,1\%$ m/m. Um gráfico comparativo dos teores quantificados é apresentado na **figura 5.20**.

Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, no qual o bornesitol foi quantificado por HPLC-DAD, após derivatização com cloreto de *p*-toluenossulfonila, demonstrou que o percentual de bornesitol em folhas secas de *H. speciosa* variou de 5,8 a 8,8% m/m, dependendo da origem das folhas (Pereira *et al.*, 2012), neste estudo foram preparados extratos de folhas coletadas em diferentes acessos. No presente trabalho relatamos um método mais simples de quantificação. A quantificação de bornesitol por meio de método MRM foi relatada previamente por nosso grupo de pesquisa (Gomes *et al.*, 2018), mas aqui apresentamos um método novo para quantificação, empregando transições distintas daquelas anteriormente descritas.

Cabe destacar, também, que, pela primeira, descrevemos a quantificação simultânea de quatro marcadores químicos em extrato de folhas de *H. speciosa*.

Figura 5.20: Teores dos marcadores químicos bornesitol, ácido clorogênico, rutina e procianidina B C-glicosilada no extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HsE) e na fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) derivada deste. PCB2 = procianidinas diméricas do tipo B C-glicosiladas. Em HsFr3, o ácido clorogênico e a rutina foram representados iguais a zero (abaixo do limite de detecção). Valores plotados como média $\pm$ desvio-padrão da média.



Tendo sido realizada a caracterização química dos constituintes de HsE e HsFr3 (itens 5.2 e 5.3), bem como quantificados os teores de quatro marcadores químicos nessas matrizes, avançamos na avaliação da potencial atividade biológica, descrita na sequência (item 5.6).

5.6 Avaliação *in vitro* do potencial efeito neuroprotetor de HsE, HsFr3 e bornesitol

O potencial efeito neuroprotetor de HsE, HsFr3 e do bornesitol foi inicialmente avaliado *in vitro*, visando investigar o efeito sobre a excreção de citocinas pró-inflamatórias e sobre o estresse oxidativo.

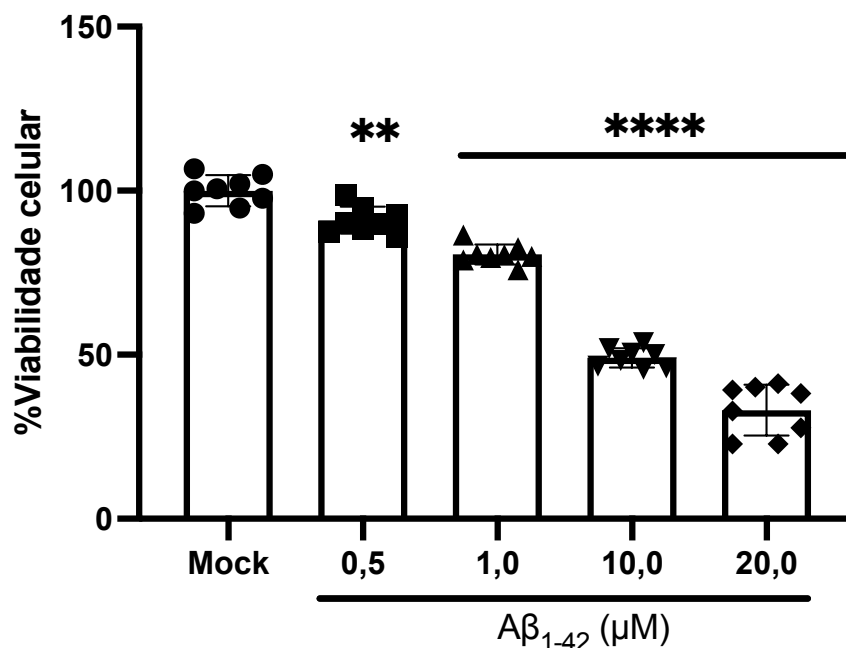
5.6.1 Avaliação do efeito de HsE, HsFr3 e bornesitol sobre a toxicidade induzida por A β ₁₋₄₂ em células SH-SY5Y pelo ensaio do MTT

Para investigar a potencial atividade neuroprotetora do extrato de folhas de *H. speciosa* e substâncias isoladas deste, realizou-se a padronização do ensaio *in vitro*, com células SH-SY5Y. Para tal, as células foram expostas a diferentes concentrações de A β ₁₋₄₂ para determinar a concentração a ser utilizada nos ensaios. Após 24 horas, realizou-se ensaio de viabilidade celular para determinar a concentração de A β ₁₋₄₂ que não promovesse morte celular completa, mas em percentual ainda possível de ser revertido com os tratamentos. Os experimentos foram realizados com base em ensaio descrito por Castillo *et al.* (2020), com modificações.

Conforme pode ser visto na **figura 5.21**, a A β ₁₋₄₂ apresentou citotoxicidade dependente da concentração. A fim de avaliar a atividade neuroprotetora das amostras, revertendo o dano causado pela A β ₁₋₄₂, não é desejável utilizar um estímulo que cause percentual de morte celular acima de 50%, pois dificilmente este seria revertido com qualquer tratamento. Por outro lado, também não deve ser empregada uma concentração de A β ₁₋₄₂ capaz de causar um percentual muito pequeno de morte celular, pois este poderia reverter-se espontaneamente (Krishtal *et al.*, 2019). Neste intuito, foram avaliadas concentrações de A β ₁₋₄₂ de 0,5 a 20 μ M. Conforme demonstrado na **figura 5.21**, todas as concentrações testadas reduziram significativamente a viabilidade celular quando comparadas ao branco, não estimulado com o peptídeo.

Em trabalho realizado por Castillo *et al.* (2020), foi avaliada a capacidade da combinação de galantamina (alcaloide isolado de plantas da família Amaryllidaceae, utilizado no tratamento de sintomas da DA) e genisteína (isoflavona extraída de soja e de outras plantas, com estrutura semelhante à de hormônios estrogênicos) de reverter a genotoxicidade e morte celular induzida por A β ₁₋₄₂. Neste estudo, as células SH-SY5Y foram estimuladas com 10 μ M de A β ₁₋₄₂. Ao analisar os resultados apresentados pelos autores, constata-se que a estimulação das células com 10 μ M de A β ₁₋₄₂ levou a uma redução da viabilidade em torno de 45% (a viabilidade ficou em torno de 55%), o que permitiu avaliar se houve reversão do dano induzido pelo peptídeo no modelo testado.

Figura 5.21 Viabilidade de células SH-SY5Y estimuladas com diferentes concentrações de peptídeo β -amiloide 1-42. Resultados mostrados como média $\pm$ desvio padrão relativo da porcentagem de viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. **p <0,01; **** p <0,0001, em 3 replicas biológicas com 3 replicatas cada (n = 9).



Chonpathompikunlert *et al.* (2011) empregaram uma concentração de 20 μ M de A β_{1-42} em ensaio em células SH-SY5Y para avaliar o potencial neuroprotetor do tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil), uma substância mimética da superóxido dismutase. Os valores de viabilidade celular relatados pelos autores após a exposição à A β_{1-42} nas concentrações de 20 μ M (30%) e de 10 μ M (~50%) são semelhantes àqueles observados no presente trabalho.

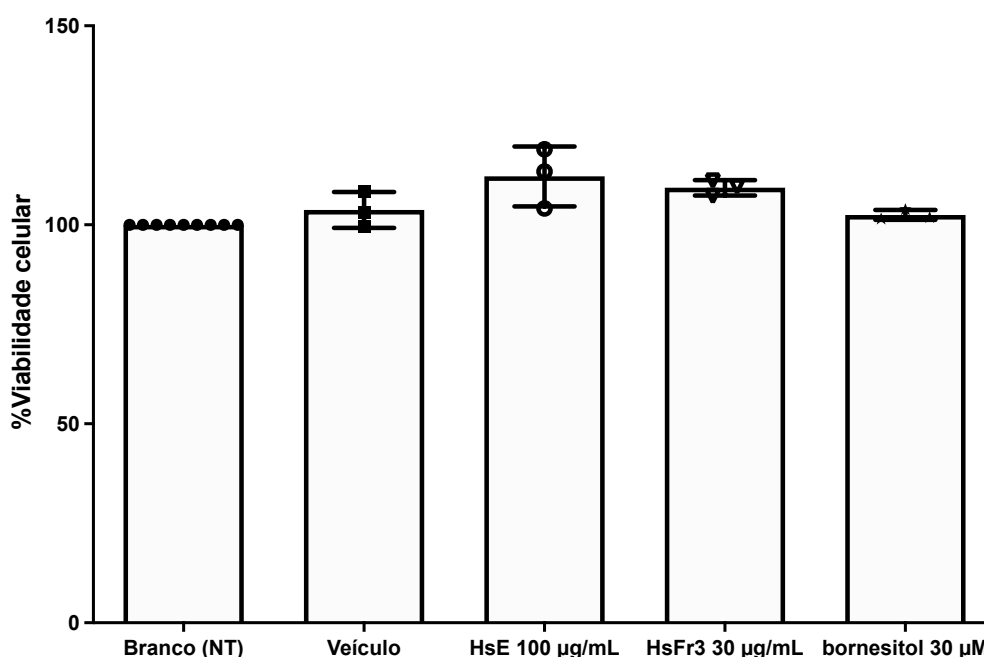
Zhang *et al.* (2017) demonstraram que a esquisandrina B (um dos compostos ativos de *Schisandra chinensis* Baill) foi capaz de reverter a morte celular, as mudanças morfológicas e a metilação de DNA induzidas por A β_{1-42} na concentração de 10 μ M, em células SH-SY5Y. Os autores relataram uma redução da viabilidade em torno de 50% após estímulo com 10 μ M de A β_{1-42} , valor semelhante ao aqui obtido.

Desta forma, encontramos subsídios na literatura para confirmar que a concentração de 10 μ M de A β_{1-42} gera dano celular considerável e que seria possível reverter-lo com tratamentos eficazes. Assim, com base nos dados apresentados na **figura 5.21**, selecionou-se a concentração de A β_{1-42} de 10 μ M, concentração esta que levou a uma redução da viabilidade celular em torno de 50%, para avaliar o possível efeito neuroprotetor do extrato acetônico de *H. speciosa* (HsE), da fração enriquecida

em proantocianidinas (HsFr3) e do bornesitol em modelo de dano celular induzido por $A\beta_{1-42}$.

Previamente aos ensaios, avaliou-se a viabilidade das células SH-SY5Y tratadas com as amostras a serem ensaiadas (extrato, fração enriquecida em proantocianidinas e bornesitol). Como representado na **figura 5.22**, nenhuma das amostras analisadas foi citotóxica para a linhagem celular, após 48 horas de exposição. O ensaio foi realizado com três descongelamentos distintos de células, com 8 réplicas em cada descongelamento ($n = 24$).

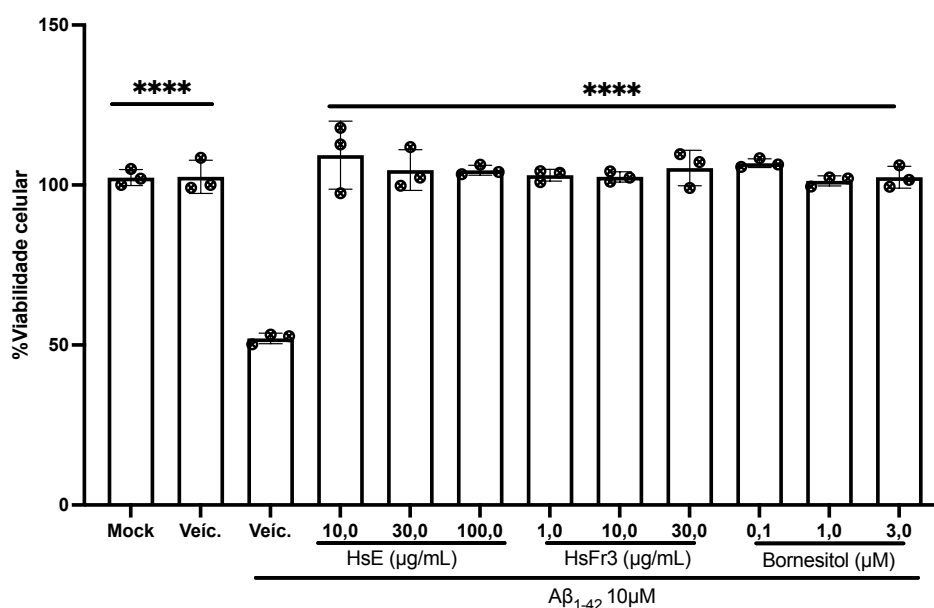
Figura 5.22 Efeito do extrato em acetona/água (7:3) (HsE) de folhas de *H. speciosa*, da fração derivada rica em proantocianidinas (HsFr3) e do bornesitol sobre a viabilidade das células SH-SY5Y. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey's. Os dados representam a média $\pm$ DP da porcentagem de viabilidade celular, representado como média de cada replicata ($n = 24$). Veículo = meio contendo 0,1% de DMSO; bornesitol na concentração de 30 μ M; extrato hidroacetônico 70% de folhas de *H. speciosa* (HsE) na concentração de 100 μ g/mL e fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) na concentração de 30 μ g/mL.



Conforme demonstrado no gráfico da **figura 5.23**, houve reversão, estatisticamente significativa da perda de viabilidade celular induzida pela $A\beta_{1-42}$ (cuja viabilidade celular do grupo estimulado e não tratado foi de $52,5 \pm 1,6\%$) em todas as concentrações das amostras testadas. No entanto, não é possível estabelecer uma relação concentração resposta para nenhuma das amostras avaliadas, pois,

provavelmente, já se alcançou o máximo de resposta na menor concentração avaliada. Pode-se observar que houve reversão da morte celular nas concentrações de 10 µg/mL ($102,9 \pm 1,6\%$) e 30 µg/mL ($105,3 \pm 5,5\%$) de HsFr3, sendo que os percentuais de viabilidade celular e seus respectivos desvios-padrão encontram-se entre parênteses, demonstrando que já se alcançou o efeito máximo na concentração de 10 µg/mL. Destarte, os nossos resultados demonstraram uma reversão da morte celular induzida pela A β_{1-42} .

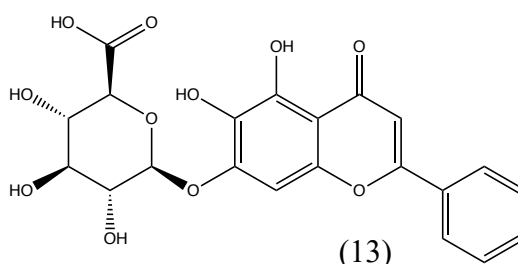
Figura 5.23 Efeito do extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HsE), da fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) e do bornesitol sobre a citotoxicidade induzida por A β_{1-42} em células SH-SY5Y. As barras representam a média de 3 experimentos $\pm$ desvio padrão da média. A dispersão representa a média de 3 experimentos (n total = 12). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. ****p>0,0001, comparado com o grupo A β



No intuito de comparar os resultados aqui apresentados com os dados relatados da literatura, Castillo *et al.* (2018) demonstraram a capacidade do extrato etanólico de folhas de *Caliphurria subedentata* em reverter a redução da viabilidade celular induzida pela exposição de células SH-SY5Y a A β_{1-42} , por 24 horas. Os autores observaram maior efeito nas concentrações de 6,25 e 12,5 µg/mL, após 24 horas de tratamento. O extrato de *C. subedentata* é conhecido por ser rico em alcaloides, como a galantamina. Assim como observado nos estudos de Castillo *et al.* (2018), HsE, HsFr3 e o bornesitol foram capazes de reverter a perda de viabilidade induzida pela

A β_{1-42} , retornando a 100% de viabilidade. Um ponto vantajoso a ser declarado sobre as amostras aqui testadas é a observação de que, ao contrário do obtido no trabalho de Castillo *et al.* (2018), elas não apresentaram toxicidade em concentrações superiores às de 30 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo uma maior segurança dos derivados de *H. speciosa*.

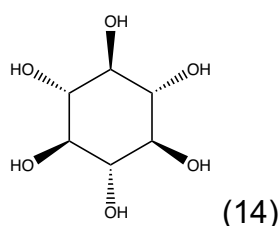
No intuito de continuar a discussão deste trabalho, destaca-se um estudo realizado por Yin *et al.* (2011), no qual células SH-SY5Y foram tratadas por 2 horas com concentrações de 0,1 a 10 μM de baicalina (**13**) e então estimuladas com 2,5 μM de A β_{1-42} . Os autores relataram a proteção da toxicidade induzida pelo peptídeo amiloide, com restauro de 100% da viabilidade nas células tratadas com o flavonoide nas concentrações de 1 e 10 μM , enquanto o grupo estimulado com A β_{1-42} e não tratado apresentou redução de 40% da viabilidade celular. Conforme pode ser observado em nossos resultados (**figura 5.23**), o bornesitol reverteu o dano causado pelo A β_{1-42} em concentrações inferiores às descritas para a baicalina.



A relevância do efeito biológico do bornesitol em células SH-SY5Y estimuladas com a A β_{1-42} fica evidente ao compararmos com os resultados descritos para a galantamina. Os autores testaram concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 μM de galantamina em células SH-SY5Y estimuladas com A β_{1-42} , sendo observado recuperação da viabilidade celular apenas na concentração mais alta (Castillo *et al.*, 2016). A galantamina é um fármaco utilizado na terapêutica da DA e se mostrou ativo em concentrações muito superiores ao bornesitol, que reverteu a citotoxicidade induzida pela A β_{1-42} em concentrações de até 0,1 μM .

Embora ainda não existam estudos que demonstrem o potencial neuroprotetor do bornesitol, outros ciclitois estão sendo avaliados. Ensaio clínico de fase 2 com o D-pinitol (NIC5-15) não demonstrou o potencial deste composto em aliviar os sintomas da DA, embora artigos de revisão apontem estudos que sugerem que este poderia agir como um modulador seletivo da γ -secretase (Derkaczew *et al.*, 2023; Srivastava;

Dubey, 2020). Neste ensaio clínico (NCT00470418), o D-pinitol foi administrado nas doses de 1500, 3000 3500 mg/dia, a 10 pacientes, por via oral, durante 6 meses com acompanhamento clínico a cada semana, não tendo sido observadas melhoras cognitivas nos testes clínicos, acompanhados através do mini exame do estado mental (MMSE), da escala de avaliação cognitiva da doença de Alzheimer (ADAS-Cog) e do estudo cooperativo da doença de Alzheimer – escala de atividade de vida diária (ADCS-ADL). Também não foi observada redução de A β 42 ou A β 40 plasmática (Mohamed Yusof e Mohd Fauzi, 2024). Este resultado pode ser devido ao baixo número de participantes do estudo. Dados da literatura indicam o potencial neuroprotetor de outro ciclitol, o *silo*-inositol. Uma revisão de literatura apresenta estudos que apontam que o *silo*-inositol (**14**) é capaz de estabilizar A β ₁₋₄₂, neutralizar trímeros de A β , favorecer a produção A β de baixa massa molecular *in vivo* e inibir a agregação de α -sinucleína na doença de Parkinson (López-Gamero *et al.*, 2020). Deste modo, os resultados que obtivemos para o bornesitol apontam para a grande potencialidade deste ciclitol para o tratamento da DA.



É importante ressaltar que, até onde sabemos, é a primeira vez que se descreve o potencial de extrato de *H. speciosa* e derivados deste em reverter dano induzido por A β ₁₋₄₂ em células SH-SY5Y. Em trabalho anterior, demonstramos que HsE é capaz de reverter o déficit cognitivo induzido por A β ₁₋₄₂ em modelo murino de DA (Carneiro Junior, 2020). Os resultados aqui relatados reforçam o potencial neuroprotetor de HsE e ampliam o entendimento das atividades que podem estar envolvidas nos efeitos observados anteriormente.

Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a DA. Dentre estes diversos fatores estão aqueles relacionados ao metabolismo de proteínas, à inflamação e aos processos de sobrevivência celular. Estes diversos fatores possuem em comum a geração de estresse oxidativo que pode funcionar como uma ponte que conecta as diferentes hipóteses e

mecanismos da DA. Deste modo, o estresse oxidativo desempenha um papel crítico na neurodegeneração e pode ser considerado um fator crucial na patogênese da DA (Bai *et al.*, 2022). Portanto, a seguir investigamos o efeito de HsE, HsFr3 e do bornesitol quanto à prevenção do estresse oxidativo, em modelo que mimetiza estresse oxidativo a nível sistêmico, utilizando células THP-1 e em modelo central, utilizando células SH-SY5Y.

5.6.2 Efeito de HsE, HsFr3 e do bornesitol sobre o estresse oxidativo em células THP-1

Com o objetivo de investigar o papel das proantocianidinas e de outros constituintes de *H. speciosa* na redução do estresse oxidativo, testou-se a atividade de HsE, HsFr3 e bornesitol em células THP-1 estimuladas com LPS. O ensaio foi realizado seguindo protocolo previamente descrito por Aranda *et al.* (2013), com algumas modificações. Para tanto, inicialmente foram avaliadas modificações no tempo de exposição ao LPS, no tempo de pré-tratamento da amostra, no tipo de placa de cultura utilizada e na concentração de DCFH-DA e no tempo de exposição. Os ensaios de otimização das condições foram realizados com a quercetina como controle positivo. Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento por 4 horas, seguido de exposição durante 6 horas ao LPS, na concentração de 100 ng/mL e marcação com 20 μ M de DCFH-DA, por 30 minutos, levou a resultados altamente reprodutíveis para o ensaio realizado em microplacas de 96 poços (**Figura 5.24**).

Após a otimização das condições do ensaio, testou-se a viabilidade das células THP-1 expostas aos analitos avaliados neste trabalho. Esta etapa teve como objetivo garantir que as amostras não são tóxicas para as células, nas concentrações utilizadas nos ensaios. Como pode ser visto na **figura 5.25**, nenhuma das amostras testadas reduziu a viabilidade celular, possibilitando a continuidade dos ensaios discutidos a seguir.

Figura 5.24: Otimização de parâmetros no ensaio de estresse oxidativo em células THP-1 estimuladas com LPS. (a) Tempo de exposição ao LPS (10 μ g/mL); (b) padronização da concentração de DCFH-DA (para 30 minutos de exposição); (c) tempo de pré-tratamento. Em todas as análises as concentrações de LPS e quercetina foram mantidas em 10 μ g/mL e 10 μ M, respectivamente. A otimização do tempo de exposição ao DCFH-DA e do tipo de placa de cultivo celular não são apresentadas. Diferenças significativas com o mock (células não estimuladas com LPS; a e b) e às células estimuladas com LPS (c) com os diferentes grupos experimentais foram

avaliadas utilizando-se ANOVA de uma via seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukey's. $**p<0,01$, $***p<0,001$ e $****p<0,0001$. Mock = células não estimuladas.

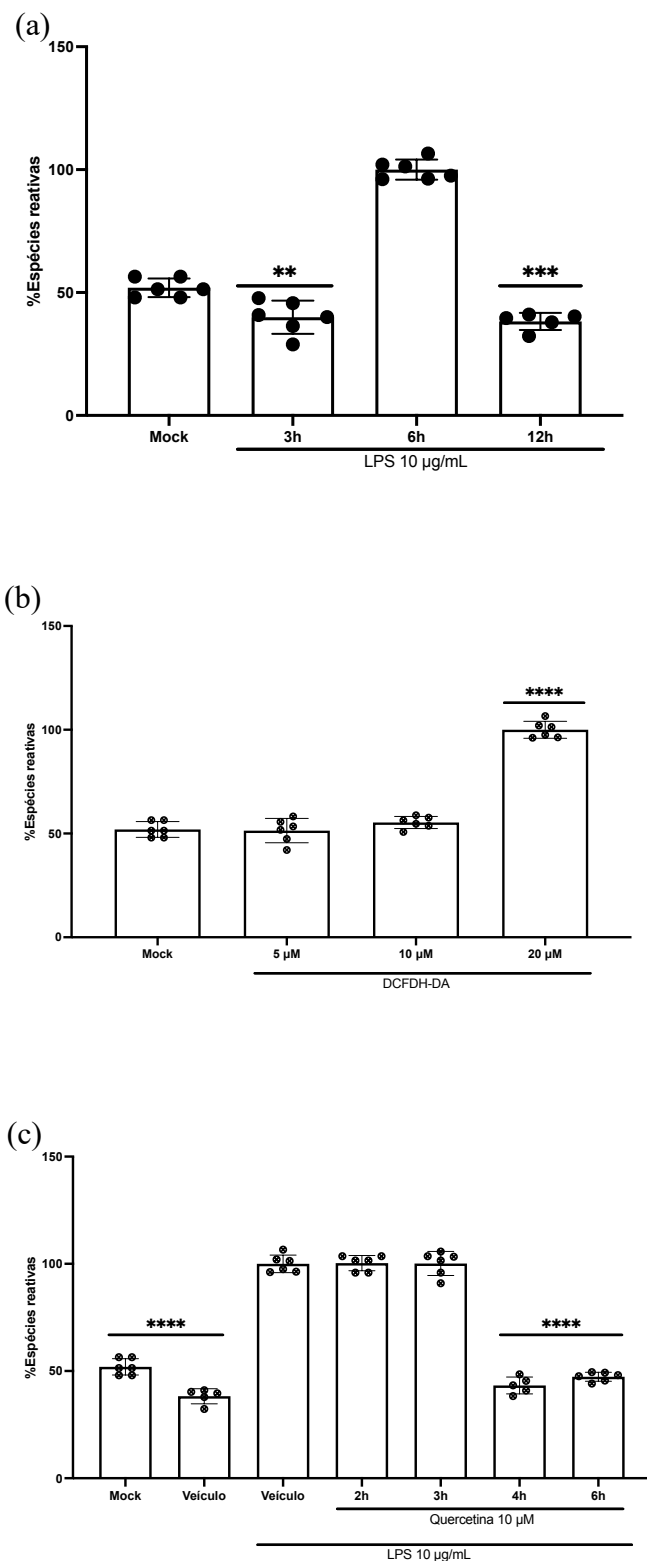
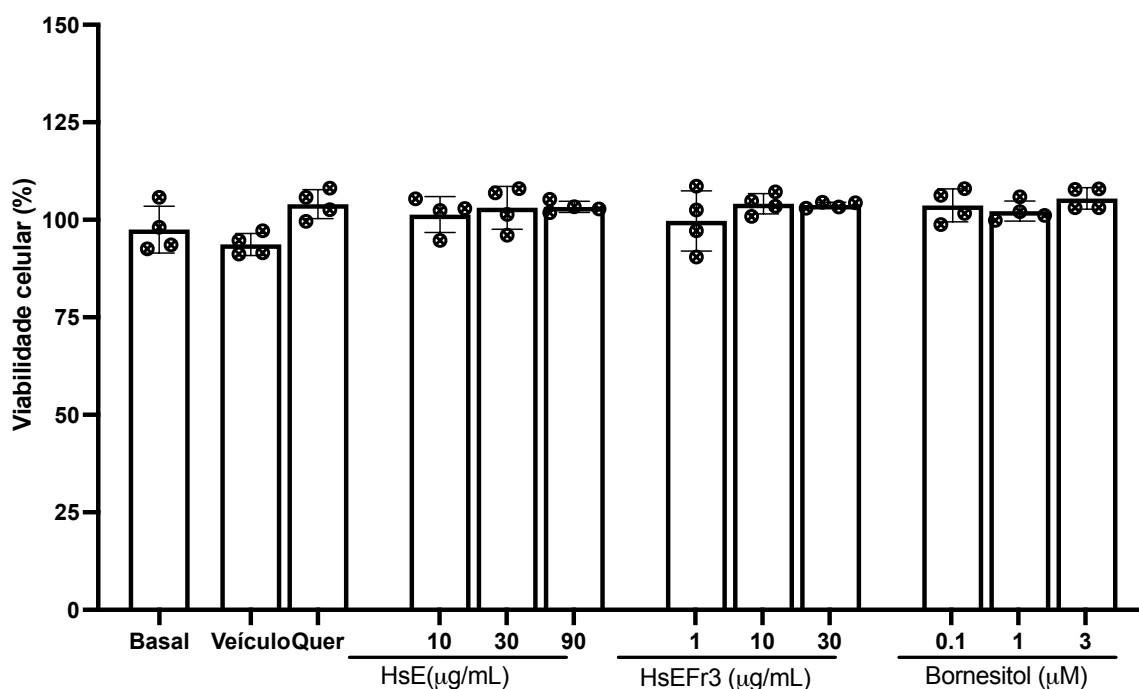
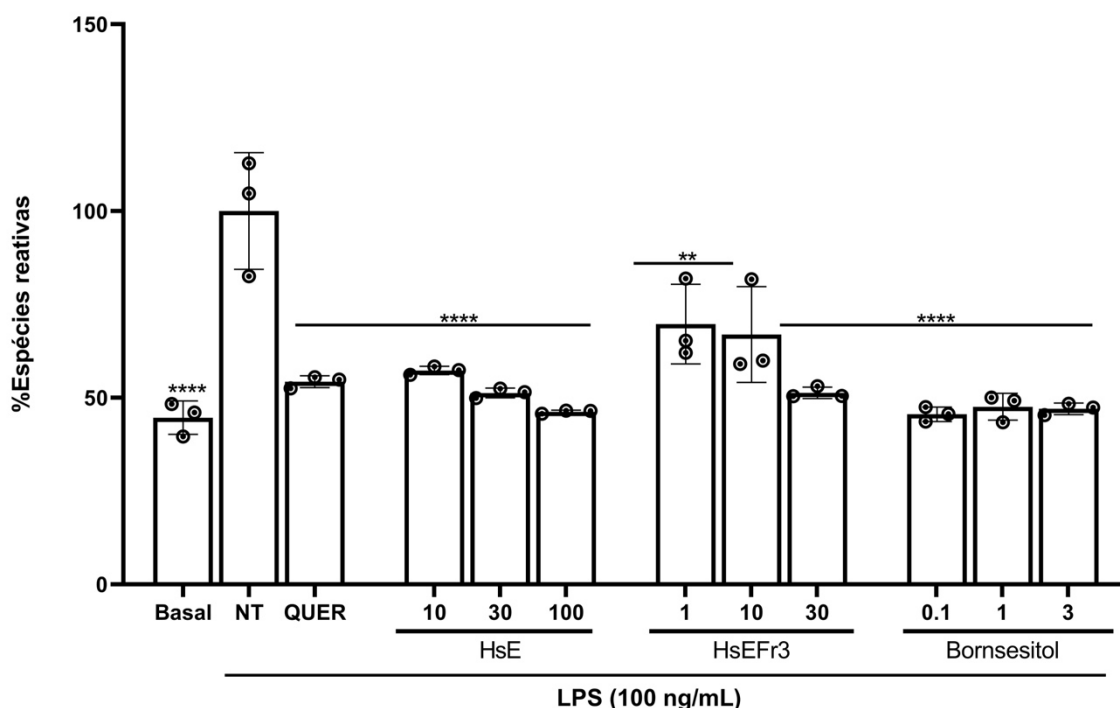


Figura 5.25: Efeito do extrato de acetona/água (7:3) (HsE) de folhas de *H. speciosa*, sua fração derivada rica em proantocianidinas (HsFr3) e bornesitol na viabilidade celular de células THP-1, testadas em diferentes concentrações (HsE a 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$; HsFr3 a 1, 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$; bornesitol a 0,1, 1 e 3 μM). Os dados representam a média $\pm$ DP ($n = 9$ de 3 conjuntos separados de experimentos com 3 repetições cada). A análise estatística foi realizada em relação às células do grupo basal e todos os grupos de tratamento utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey's. Basal = células não estimuladas, Quer = quercetina (10 μM ; controle positivo).



Tendo em vista que as amostras não reduziram a viabilidade celular, avaliou-se o efeito dessas sobre o estresse oxidativo induzido por LPS. Os resultados representados na **figura 5.26** revelam uma diminuição notável na emissão de fluorescência da sonda DCFH-DA nos grupos tratados com os analitos, resultante da redução de espécies geradas pelo estresse oxidativo induzido por LPS em células THP-1. As taxas de redução atingiram $50,7 \pm 0,3\%$ e $54,0 \pm 1,7\%$, para HsE e bornesitol, respectivamente, nas menores concentrações testadas, e $48,7 \pm 1,5\%$, HsFr3 na maior concentração testada, quando comparadas às células não tratadas. Para a quercetina (10 μM), empregada como controle positivo no ensaio, observamos uma redução de $46,0 \pm 1,6\%$. Cabe destacar que o bornesitol induziu uma resposta comparável ao extrato e à fração rica em proantocianidinas, quando testado em concentrações significativamente mais baixas, sugerindo uma contribuição substancial para o efeito global do extrato.

Figura. 5.26: Efeito do extrato de acetona/água (7:3) de folhas de *H. speciosa* (HsE), sua fração derivada rica em proantocianidinas (HsFr3) e bornesitol na produção de espécies reativas, em células THP-1, induzidas por LPS, testadas em diferentes concentrações (HsE a 10, 30 e 100 µg/mL; HsFr3 a 1, 10 e 30 µg/mL; bornesitol a 0,1, 1 e 3 µM). Os dados representam a média ± DP (n = 9 de 3 conjuntos separados de experimentos com 3 repetições cada). Diferenças significativas entre células estimuladas por LPS e todos os grupos de tratamento utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey's; **p < 0,01 e ****p < 0,0001. Basal = células não estimuladas, Quer = quercetina (10 µM; controle positivo) e NT = células não tratadas.



Proantocianidinas são compostos polifenólicos que apresentam potentes efeitos inibitórios sobre o estresse oxidativo celular (Yang *et al.*, 2018). No entanto, a contribuição das procianidinas da fração HsFr3 para o impacto global do extrato parece ser menos significativa em comparação com a do bornesitol. Nossos resultados demonstraram que o efeito do bornesitol na prevenção do estresse oxidativo não foi estatisticamente diferente dos resultados observados para a quercetina, testada a 10 µM.

A revisão da literatura realizada não indicou estudos anteriores demonstrando o potencial antiestresse oxidativo de extratos de *H. speciosa* em modelos *in vitro* com células THP-1. Porém, ao compararmos os nossos resultados com dados da literatura, como o estudo realizado por Penido *et al.* (2017), observa-se que o extrato etanólico

de casca de *H. speciosa* foi o que apresentou melhor resultado nos ensaios de DPPH, ácido linoleico/ β -caroteno e ABTS.

Ensaio químicos podem ser úteis em triagem de amostras com potencial atividade antioxidante, mas são limitados em distinguir compostos antioxidantes de outros agentes redutores, estando sujeitos a interferências de muitos artefatos (Murphy *et al.*, 2022). Além disso, compostos com atividade antioxidante, como os flavonoides, podem agir por diferentes mecanismos, podendo ser preventivo, de quebra de cadeia e indireto (Hassanpour; Doroudi, 2023). Isto evidencia a importância e a contribuição dos resultados aqui descritos.

Estudos com espécies da família Apocynacea em modelos celulares demonstram a capacidade de plantas desta família em reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio. Em um trabalho realizado por Dunkhunthod *et al.* (2021), o extrato etanólico de *Gymnema inodorum* demonstrou a capacidade de reduzir ROS induzido por LPS em células RAW264.7, em concentrações acima de 100 $\mu\text{g/mL}$ (com máximo de redução de 35% na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$). Enquanto isso, nossos resultados demonstram a potencialidade de HsE e HsFr3 na redução de ROS, uma vez que foi possível observar uma redução estatisticamente significativa em concentrações menores que 30 $\mu\text{g/mL}$ (com percentuais de $46 \pm 1,3\%$ e $30 \pm 5,2\%$ de redução de ROS, para células tratadas com HsE 10 $\mu\text{g/mL}$ e com HsEFr3 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Notavelmente, alguns ciclitóis derivados do mio-inositol (D-pinitol, D-*quiro*-inositol, L-*quiro*-inositol e L-quebraquitol) foram descritos como capazes de regular a produção de espécies reativas, em ensaio da capacidade de redução cúprica (CUPRAC) e de DPPH. Nestes ensaios, o maior percentual de redução de radicais livres foi observado para o D-pinitol, com redução de 19%. Embora os resultados relatados revelaram uma baixa atividade antioxidante, quando em mistura com a glutathione, observou-se um aumento da atividade antioxidante (redução de 87% para a mistura de glutathione com D-pinitol), quando comparado com os ensaios realizados individualmente com cada composto. Individualmente, a glutathione apresentou percentual de 31% de redução dos radicais livres (Płonka *et al.*, 2021). Estes ensaios apresentam as limitações discutidas anteriormente para a investigação de atividade antioxidante por ensaios químicos, mas são interessantes de serem observados por sugerirem um possível sinergismo de ciclitóis com outras substâncias, que poderia contribuir para a atividade antioxidante destes.

A redução observada do estresse oxidativo induzida pelo bornesitol em células THP-1 estimuladas por LPS representa um avanço no conhecimento da ação antioxidante de ciclitois em relação aos dados descritos na literatura para compostos desta classe. Nossos resultados demonstram que a ação do bornesitol não está necessariamente relacionada com a neutralização direta dos radicais formados. O sinergismo com outros compostos e as ações preventivas fazem dos ciclitois potencialmente benéficos para a neuroproteção, mitigando assim os efeitos prejudiciais associados à DA.

Embora as procianidinas presentes em HsFr3 pareçam ser menos potentes que o bornesitol na redução do estresse oxidativo em células THP-1, elas contribuem para a atividade geral do extrato. Nesta direção, Chen *et al.* (2018) demonstraram que uma procianidina obtida comercialmente (os autores não informam qual procianidina foi utilizada), avaliada na concentração de 10 μ M, foi capaz de reduzir em torno de 55% a produção de ROS em células THP-1 estimuladas com LPS. Apesar de não ser possível comparar a potência, é possível observar que os resultados aqui obtidos vão em acordo com a literatura. Ainda, nos ensaios conduzidos por Chen *et al.* (2018), os autores demonstraram que esta redução de ROS pode estar associada ao bloqueio da ativação de NF- κ B.

Neste mesmo sentido, um estudo conduzido por Terra *et al.* (2011) demonstrou que uma fração de um extrato de sementes de uva enriquecida em procianidinas diméricas do tipo B1 e triméricas do tipo C1 foi capaz de reduzir em 60% a produção de ROS por células THP-1 estimuladas com LPS (100 ng/mL) em co-incubação, por 24h, com 40 μ g/mL da fração enriquecida. Aqui descrevemos uma redução semelhante, em concentrações menores, reforçando a potencial contribuição de procianidinas na prevenção do estresse oxidativo.

Semelhantemente, Pap *et al.* (2021) demonstraram que extratos aquosos de folhas de *Hippophae rhamnoides*, de casca de *Pinus sylvestris* e de casca de *Picea abies*, enriquecidos em proantocianidinas, foram capazes de reduzir, em 50%, a produção de ROS por células THP-1 estimuladas com LPS, nas concentrações de 57,1; 157,3 e 41,6 μ g/mL, respectivamente. Embora os autores tenham obtido resultados positivos na redução de ROS, eles relatam que os extratos testados não foram capazes de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Em comparação com os resultados relatados no presente trabalho, podemos afirmar que HsE e HsFR3 apresentam maior potencial para manejo de doenças com perfil inflamatório e com

relevante processo de estresse oxidativo envolvidos em sua fisiopatologia, como ocorre na hipertensão, diabetes e em doenças neurodegenerativas, como a DA.

Conforme descrito anteriormente (**item 3.1.4**), fatores que levam ao aumento da permeabilidade de LPS pela barreira hematoencefálica aumentam o risco de desenvolvimento de DA por levarem à neuroinflamação, morte neuronal e aumento de radicais livres no encéfalo. Desta forma, demonstrar a capacidade dos derivados de *H. speciosa* em reduzir o aumento do estresse oxidativo é um importante indicativo da potencialidade de ação destes derivados em multialvos, o que poderia ser benéfico no tratamento da DA. Tendo em vista a possível correlação entre a inflamação sistêmica induzida por LPS e o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Tarawneh e Penhos, 2022), candidatos a fármacos para o tratamento da DA com capacidade de reduzir fatores associados à inflamação sistêmica são potencialmente úteis para propostas terapêuticas multialvo. Deste modo, a seguir, avaliamos o efeito de HsE, HsFr3 e do bornesitol sobre mediadores pró-inflamatórios.

5.6.3 Atividade de HsE, HsFr3 e bornesitol sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios *in vitro*

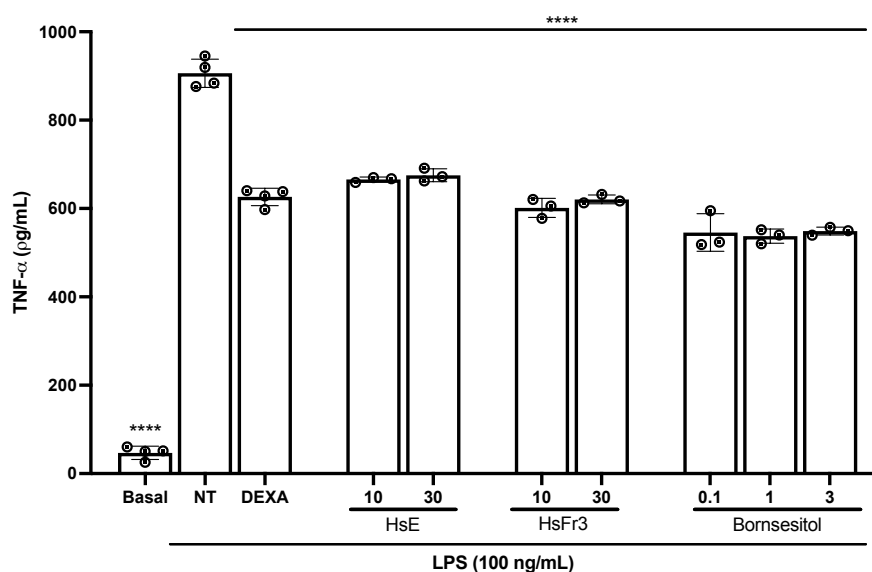
Tendo em vista diversos achados experimentais que indicam um papel importante da inflamação sistêmica na patogênese da doença de Alzheimer (Mou *et al.*, 2022), na sequência do trabalho avaliamos o efeito do extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HsE), da fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) e do bornesitol sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias em culturas de células THP-1 estimuladas por LPS.

A inflamação sistêmica é considerada um fator relevante na gênese e progressão da doença de Alzheimer e evidências sugerem que seu papel seja anterior ao da deposição de peptídeo amiloide (Xie *et al.*, 2022). Desta forma, tendo em vista os resultados obtidos no estudo com o modelo *in vitro* de toxicidade induzida por A β ₁₋₄₂ em células SH-SY5Y e nos testes comportamentais realizados anteriormente escolheu-se o modelo de estimulação de células THP-1 para avaliar o potencial das amostras aqui estudadas na reversão da redução de mediadores pró-inflamatórios. Este é um modelo rápido e de grande valia para a análise do potencial anti-inflamatório.

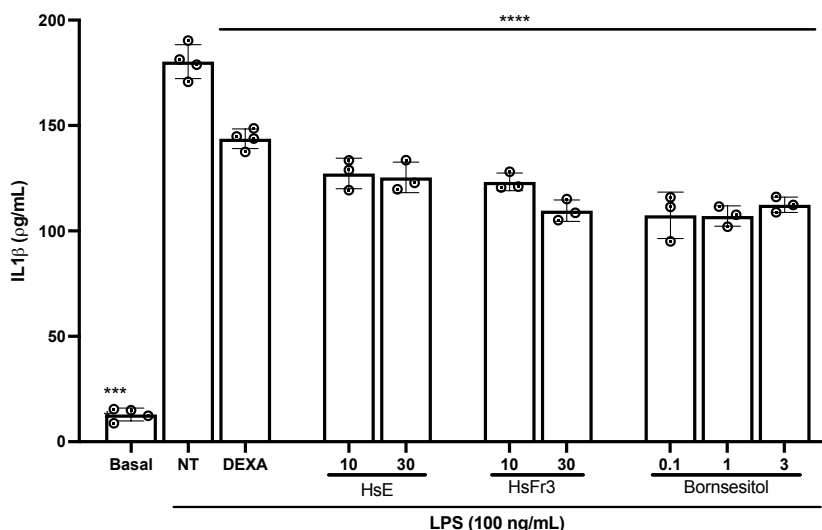
Na sequência, o extrato hidroacetônico (10 e 30 µg/mL), a fração enriquecida (10 e 30 µg/mL) e o bornesitol (0,1, 1,0 e 3,0 µM) foram avaliados em culturas de células THP-1 previamente estimuladas por LPS (**figura 5.27**). Obteve-se redução da liberação de TNF de $26,6 \pm 0,6\%$, $33,7 \pm 1,1\%$ e $40,8 \pm 0,9\%$, para HsE, HsFr3 e bornesitol, respectivamente, nas maiores concentrações testadas. Para IL-1 β foram observadas reduções de $30,3 \pm 4,0\%$, $39,4 \pm 2,0\%$ e $38,3 \pm 2,2\%$ para HsE, HsFr3 e bornesitol, respectivamente, nas maiores concentrações testadas.

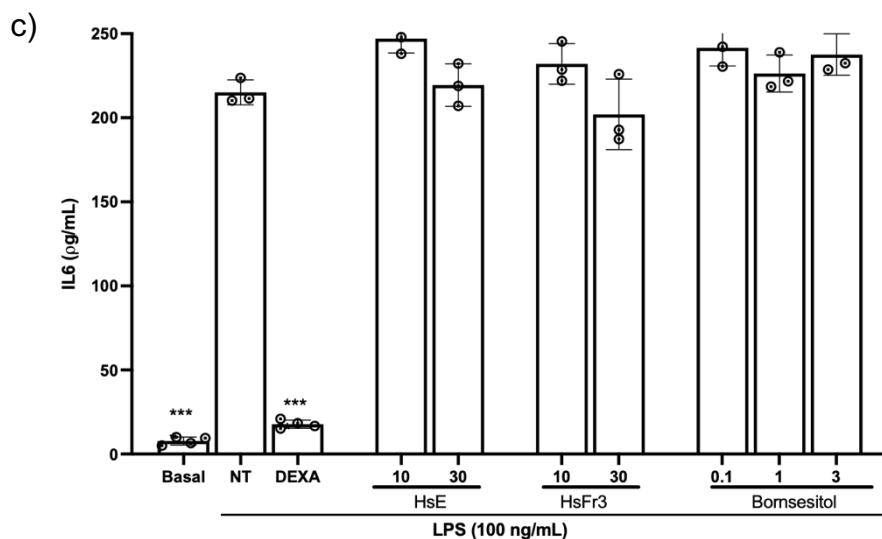
Figura 5.27 Atividade do extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HsE), fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) e bornesitol sobre **(a)** a liberação de TNF; **(b)** IL-1 β e **(c)** IL-6 em células THP-1 estimuladas com LPS. As barras representam a média de quatro experimentos $\pm$ desvio padrão da média (DP), com $n = 12$. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. **** $p > 0,0001$, comparado com o grupo NT. Basal = células não tratadas e não estimuladas; NT = células estimuladas e tratadas com veículo; Dexta = dexametasona 10 µM.

a)



b)





Todas as amostras ensaiadas inibiram a liberação de TNF (**figura 5.27a**) e IL-1 β (**figura 5.27b**), não sendo possível observar diferenças estatísticas entre as concentrações testadas. Desta forma, aparentemente, as potências máximas inibitórias da liberação dessas citocinas foram alcançadas nas menores concentrações ensaiadas. Já para IL-6 (**figura 5.27c**), apenas o extrato reduziu a liberação desta citocina ($49,8 \pm 2,0\%$) na maior concentração avaliada.

Os resultados aqui apresentados demonstram a potencialidade do extrato de *H. speciosa* em reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que são importantes na geração de resposta inflamatória, mas que também estão relacionadas à exacerbação desta resposta, o que leva a efeitos danosos ao organismo.

Em um trabalho realizado por Nordin *et al.* (2021), os autores estimularam células THP-1 com 20 ng/mL de LPS e avaliaram o potencial de um extrato etanólico e um extrato aquoso de *Clinacanthus nutans* em reduzir a liberação de TNF, IL-1 β e IL-6. Os autores relataram que tanto o extrato etanólico quanto o aquoso foram capazes de reduzir a liberação de TNF em todas as concentrações testadas (25, 50 e 100 μ g/mL). No entanto, apenas o extrato etanólico reduziu a liberação de IL-1 β e IL-6, quando avaliado nas concentrações de 25 e 100 μ g/mL. Embora o extrato aquoso tenha reduzido a liberação de IL-1 β , na concentração de 25 μ g/mL, observou-se que este extrato levou a um aumento da liberação de IL-6, nas concentrações de 50 e 100 μ g/mL. Este resultado sugere um efeito pró-inflamatório do extrato nas maiores concentrações. Tal efeito não foi observado nos resultados obtidos no presente trabalho.

Geller *et al.* (2015) avaliaram a capacidade do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* e seus constituintes, como o bornesitol e rutina, em reduzir a liberação de TNF em células THP-1 estimuladas com 100 ng/mL de LPS. Os autores relatam que o extrato (10 µg/mL), o bornesitol (10 µM e 50 µM) e a rutina (10 µM e 50 µM) foram capazes de reduzir a liberação de TNF. Aqui relatamos uma redução da liberação de TNF em concentrações ainda menores para o bornesitol (1 µM), ressaltando, porém, que o trabalho de Geller *et al.* (2015) foi realizado com células THP-1 não diferenciadas em macrófagos. É importante ressaltar que é a primeira vez que se relata o potencial anti-inflamatório e a capacidade de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias de uma fração enriquecida em proantocianidinas de folhas de *H. speciosa*.

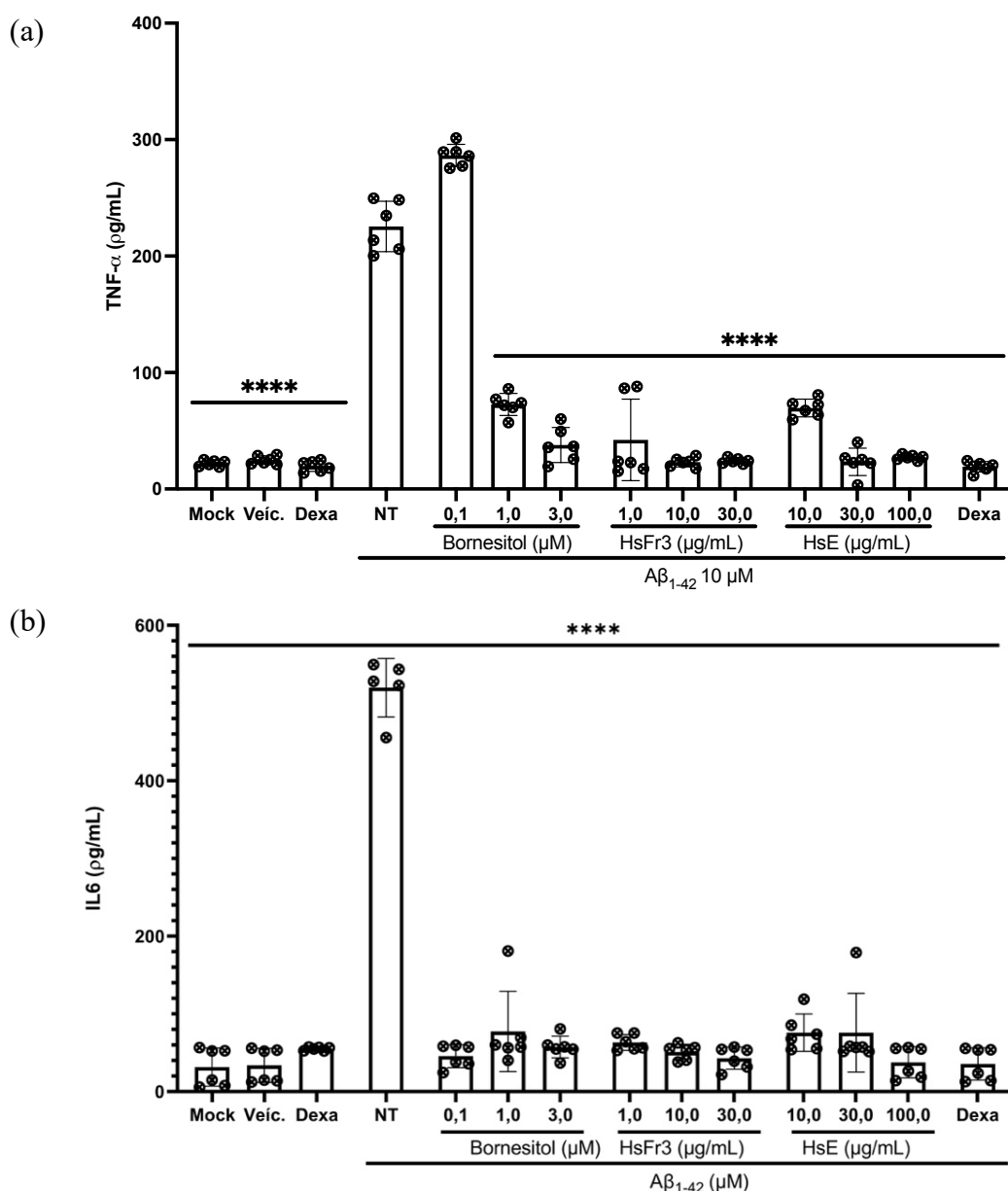
Conforme discutido anteriormente, há uma evidente contribuição da inflamação sistêmica no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Deste modo, os resultados obtidos sobre a redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias em células THP-1 nos permitem conjecturar que estas ações também poderiam ocorrer a nível central. A fim de avaliar esta hipótese, na sequência do trabalho avaliamos o efeito das amostras sobre a excreção de citocinas pró-inflamatórias em células SH-SY5Y estimuladas com A β ₁₋₄₂.

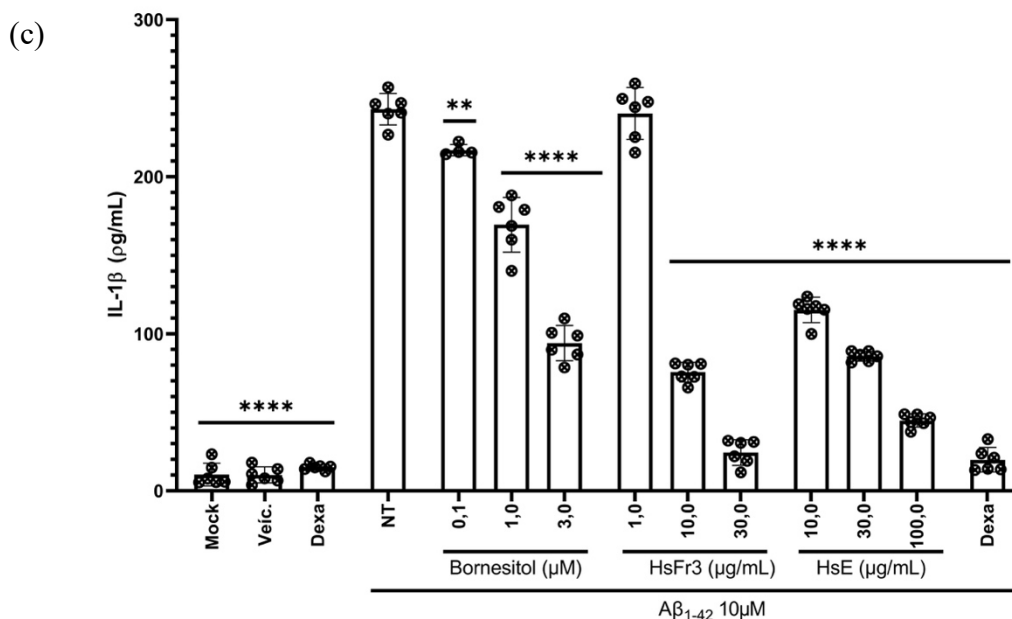
Os resultados apresentados na **figura 5.28** evidenciam redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias. O estímulo das células SH-SY5Y com A β ₁₋₄₂ levou ao aumento da liberação de TNF (**figura 5.28a**), o qual foi revertido pelo tratamento com HsE, HsFr3 ou bornesitol (com percentuais de redução de $87,9 \pm 1,2\%$, $89,2 \pm 1,5\%$ e $83,2 \pm 7,1\%$, respectivamente, nas maiores concentrações avaliadas). Apenas a menor concentração de bornesitol testada (0,1 µM) não foi capaz de reduzir a liberação de TNF, demonstrando que a concentração ativa está acima deste valor.

Já na **figura 5.28b** é possível observar que houve um aumento expressivo, estatisticamente significativo, de IL-6, o qual foi revertido pelo tratamento com HsE, HsFr3 ou bornesitol em todas as concentrações testadas (com percentuais de redução de $92,7 \pm 3,8\%$, $91,7 \pm 2,8\%$ e $88,9 \pm 2,7\%$, respectivamente, nas maiores concentrações). Por sua vez, na **figura 5.28c** observa-se um aumento estatisticamente significativo de IL-1 β induzido pela exposição das células ao A β ₁₋₄₂. Nossos resultados demonstram que HsE e bornesitol foram capazes de reverter este aumento em todas as concentrações testadas, com percentuais de redução de $81,6 \pm 1,6\%$ e $61,3 \pm 4,5\%$ para HsE e bornesitol, respectivamente, nas maiores

concentrações). No entanto, HsFr3 só demonstrou a capacidade de reduzir o aumento de IL-1 β nas duas maiores concentrações testadas (10 e 30 μ g/mL; redução de 89,9 $\pm$ 3,3%, na maior concentração). Observou-se um efeito concentração-dependente na redução da liberação de IL-1 β para todas as amostras analisadas.

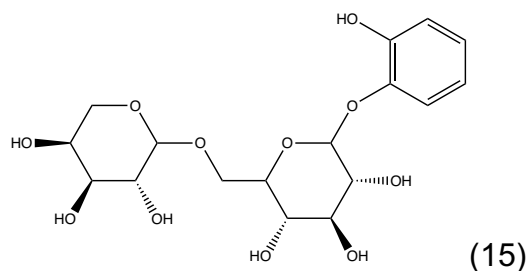
Figura 5.28: Atividade do extrato hidroacetônico de folhas de *H. Speciosa* (HsE), fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) e bornesitol sobre **(a)** a liberação de TNF, **(b)** IL-1 β e **(c)** IL-6 em células SH-SY5Y estimuladas com A β ₁₋₄₂. As barras representam a média de três experimentos com três replicatas cada $\pm$ desvio padrão da média (DP), com n = 12. As médias foram analisadas por Anova de uma via seguida de pós-teste de Tukey. ****p>0,0001, comparado com o grupo NT. NT = células estimuladas e tratadas com veículo; Dexa = dexametasona 10 μ M, Veíc. = veículo (meio DMEM F12 + 0,1% DMSO).





Ma *et al.*, 2016 relataram a atividade do extrato aquoso de *Acer saccharum* sobre a liberação de IL-6 e TNF, com percentuais de redução de 20% e 87%, respectivamente, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, em células SH-SY5Y estimuladas com $\text{A}\beta_{1-42}$. Este resultado foi associado à composição rica em polifenóis do extrato. Nossos resultados demonstraram uma maior potência de HsE na redução de IL-6 e TNF, além de também demonstrar a redução de IL-1 β . Esta atividade pode ser associada ao enriquecimento do extrato em compostos polifenólicos, as proantocianidinas, além da contribuição considerável do bornesitol, que podem ser observados quando analisamos os resultados obtidos nos ensaios de citocinas pró-inflamatórias realizadas com HsFr3 e com o bornesitol.

Em um estudo de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias em células SH-SY5Y estimuladas com $\text{A}\beta_{35-25}$ e tratadas com xilocosideo (**15**), um composto fenólico glicosilado isolado de *Itoa orientalis*, foi observado que este composto, na concentração de 20 μM , reduziu a liberação de TNF e IL-1 β , em cerca de 60% para cada citocina avaliada (Yu *et al.*, 2012). Nossos resultados demonstram uma redução de cerca de 75% e 85% na liberação de TNF e IL-1 β , respectivamente. Os resultados encontrados para este composto fenólico sugerem uma potência semelhante entre o xilocosideo e a fração enriquecida em proantocianidinas.



De posse destes resultados, nos é evidente a potencialidade de HsE, HsFr3 e do bornesitol em reverter fatores que podem estar associados ao desenvolvimento de distúrbios sistêmicos e doenças neurodegenerativas. No entanto, ainda é necessário descrever se esta contribuição pode, também, estar relacionada à redução do estresse oxidativo a nível central. Nossos achados quanto à redução de ROS em células SH-SY5Y está discutido na sequência.

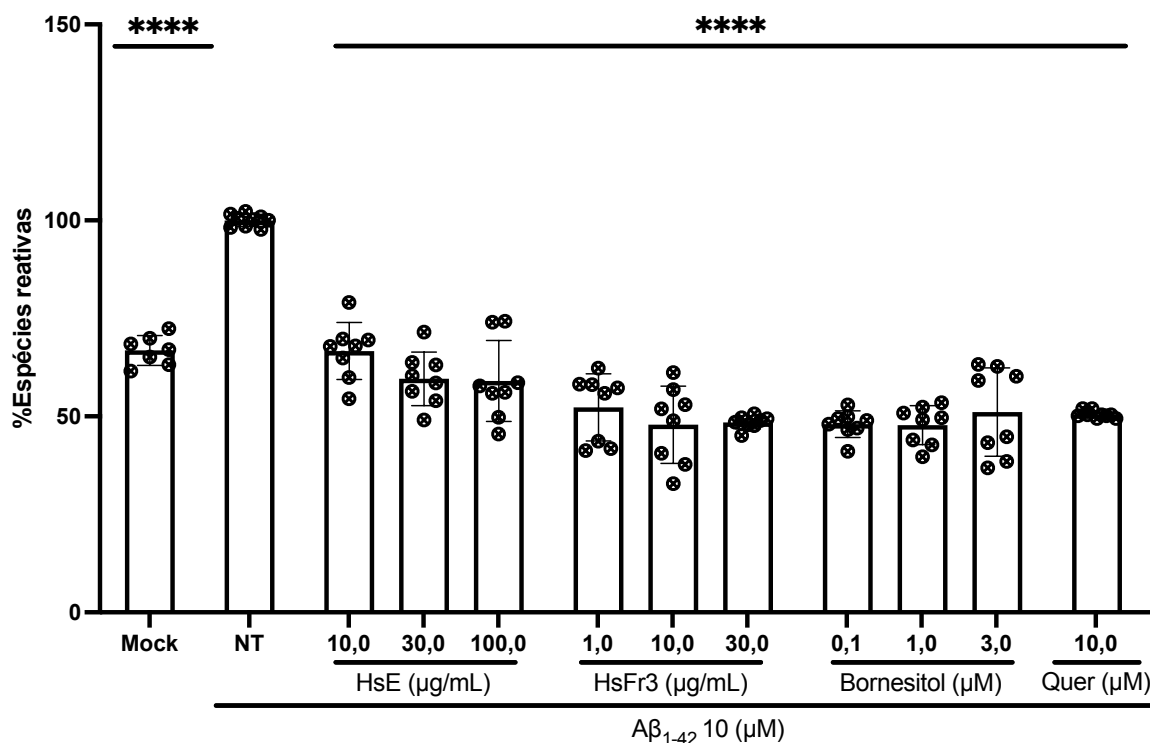
5.6.4 Efeito de HsE, HsEFr3 e bornesitol sobre o estresse oxidativo em células SH-SY5Y

Após demonstrarmos a capacidade das amostras em reduzir o estresse oxidativo gerado por LPS em células de monócitos humanos (THP-1; **item 5.6.2**), assim como de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células THP-1 e SH-SY5Y (**item 5.6.3**), procedemos com a investigação do efeito de HsE, HsFr3 e do bornesitol frente ao estresse oxidativo induzido por $A\beta_{1-42}$ em células SH-SY5Y, uma linhagem neuronal.

Conforme demonstrado na **figura 5.29**, após pré-tratamento com veículo, por 3 horas, e exposição à $A\beta_{1-42}$ por 16 horas, foi observado que a $A\beta_{1-42}$ induziu aumento do estresse oxidativo estatisticamente significativo, quando comparado às células não estimuladas. Também foi possível observar redução estatisticamente significativa, em comparação ao grupo $A\beta_{1-42}$, quando as células estimuladas foram pré-tratadas com HsE, HsFr3 ou bornesitol.

Figura 5.29: Efeito do extrato em acetona/água (7:3) (HsE) de folhas de *H. speciosa*, da fração derivada rica em proantocianidinas (HsFr3) e do bornesitol na produção de espécies reativas de oxigênio em células SH-SY5Y induzidas por $A\beta_{1-42}$, testadas em diferentes concentrações (HsE a 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$; HsFr3 a 1, 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$; bornesitol a 0,1, 1 e 3 μM). Os dados representam a média $\pm$ DP ($n = 9$, correspondentes a 3 replicatas biológicas e 3 réplicas experimentais). Diferenças estatisticamente significativas entre células estimuladas por $A\beta_{1-42}$ e todos os grupos

de tratamento foram demonstradas por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey's; **** $p < 0,0001$. Mock = células não estimuladas, Quer = quercetina (10 μ M; controle positivo) e NT = célula não tratada.



Extrato de plantas de outras famílias foram descritas na literatura como capazes de reverter ou impedir o dano celular causado pela beta amiloide, principalmente relacionados à morte celular e ao estresse oxidativo. Extrato de folhas de *Ginkgo biloba* foi capaz de reverter o estresse oxidativo causado por $A\beta_{1-42}$ (100 μ g/mL, correspondente a 20 μ M do peptídeo), na concentração de 100 μ g/mL, retornando aos valores basais de estresse oxidativo. Neste mesmo estudo, o tratamento com a quercetina (5 μ M) ou o ginkgolídeo B (20 μ M) não foi capaz de reverter o estresse oxidativo induzido pelo peptídeo amiloide (Shi *et al.*, 2009). Os nossos resultados demonstram a capacidade do HsE, HsFR3 e do bornesitol em reverter a liberação de ROS causada pelo $A\beta_{1-42}$, não havendo diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo não estimulado (mock). Além disso, o bornesitol exibiu resultado considerável de redução do estresse oxidativo causada pelo $A\beta_{1-42}$.

Em um estudo realizado por (Yu *et al.*, 2022), onde células SH-SY5Y foram pré-tratadas com resveratrol (40 μ M) e curcumina (20 μ M), por 12h, e estimuladas com $A\beta_{1-42}$ (5 μ M, por 24h), foi observado que tanto o resveratrol quanto a curcumina reduziram a produção de ROS em torno de 30%. Comparativamente, nossos resultados demonstram uma maior potência do bornesitol em reduzir a produção de

ROS pelas células SH-SY5Y estimuladas com A β ₁₋₄₂, principalmente ao se considerar que o estímulo que utilizamos foi mais intenso, maior concentração de A β ₁₋₄₂, pelo mesmo período de tempo. Isto demonstra a potencialidade do bornesitol em reduzir estímulos relacionados ao desenvolvimento e avanço da neurodegeneração.

Kenchappa *et al.* (2023) demonstraram que o extrato metanólico de *Olea dioica* reduziu em torno de 25% a produção de ROS induzida por A β ₁₋₄₀ (10 μ M) em células SH-SY5Y, na concentração de 15 μ g/mL. Este efeito foi associado aos constituintes polifenólicos do extrato.

O aumento do estresse oxidativo no cérebro de pacientes com DA é correntemente associado a várias manifestações patológicas relacionadas ao desequilíbrio da homeostase de metais de transição no cérebro e aumento da quelação destes com a A β (Ganguly *et al.*, 2017), ativação e hiperexpressão de oxidases (Ganguly *et al.*, 2021), bem como disfunção mitocondrial (Dhapola *et al.*, 2022). A redução do estresse oxidativo gerado pela A β ₁₋₄₂ é um indicativo das possíveis contribuições de derivados de *H. speciosa* para o tratamento / prevenção da DA.

Até onde temos conhecimento, esta é a primeira vez que se descreve o potencial anti-neurodegeneração de derivados de *H. speciosa*, demonstrando resultados promissores em ensaios *in vitro* de dano causado por beta amiloide em células de neuroblastoma humano. Deste modo, avançaremos os nossos estudos descrevendo os efeitos observados em modelo *in vivo* de dano patológico induzido por A β ₁₋₄₂, como se vê na sequência deste trabalho.

5.6.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória de HsE em modelo murino de dano patológico induzido por A β ₁₋₄₂

Em trabalho anterior (Carneiro Junior, 2020), demonstramos o efeito de HsE em promover melhora cognitiva em camundongos submetidos à cirurgia estereotáxica para a injeção intrahipocampal de A β ₁₋₄₂. Este efeito pode estar associado à redução de processos inflamatórios no SNC. Deste modo, no presente trabalho avaliamos o efeito do tratamento com HsE sobre a concentração de citocinas pro-inflamatórias presentes em hipocampus de animais submetidos à cirurgia estereotáxica para a injeção intrahipocampal de A β ₁₋₄₂. O hipocampo foi escolhido como amostra por ser uma região cerebral responsável pela aquisição de memórias e aprendizados e por estar intimamente relacionado à sintomatologia da DA (Lang *et al.*, 2024).

O extrato foi administrado por via oral a camundongos C57 BL/6, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg/dia, durante sete dias. Ao fim, determinou-se a concentração de citocinas pró-inflamatórias em hipocampus isolados a fresco dos animais.

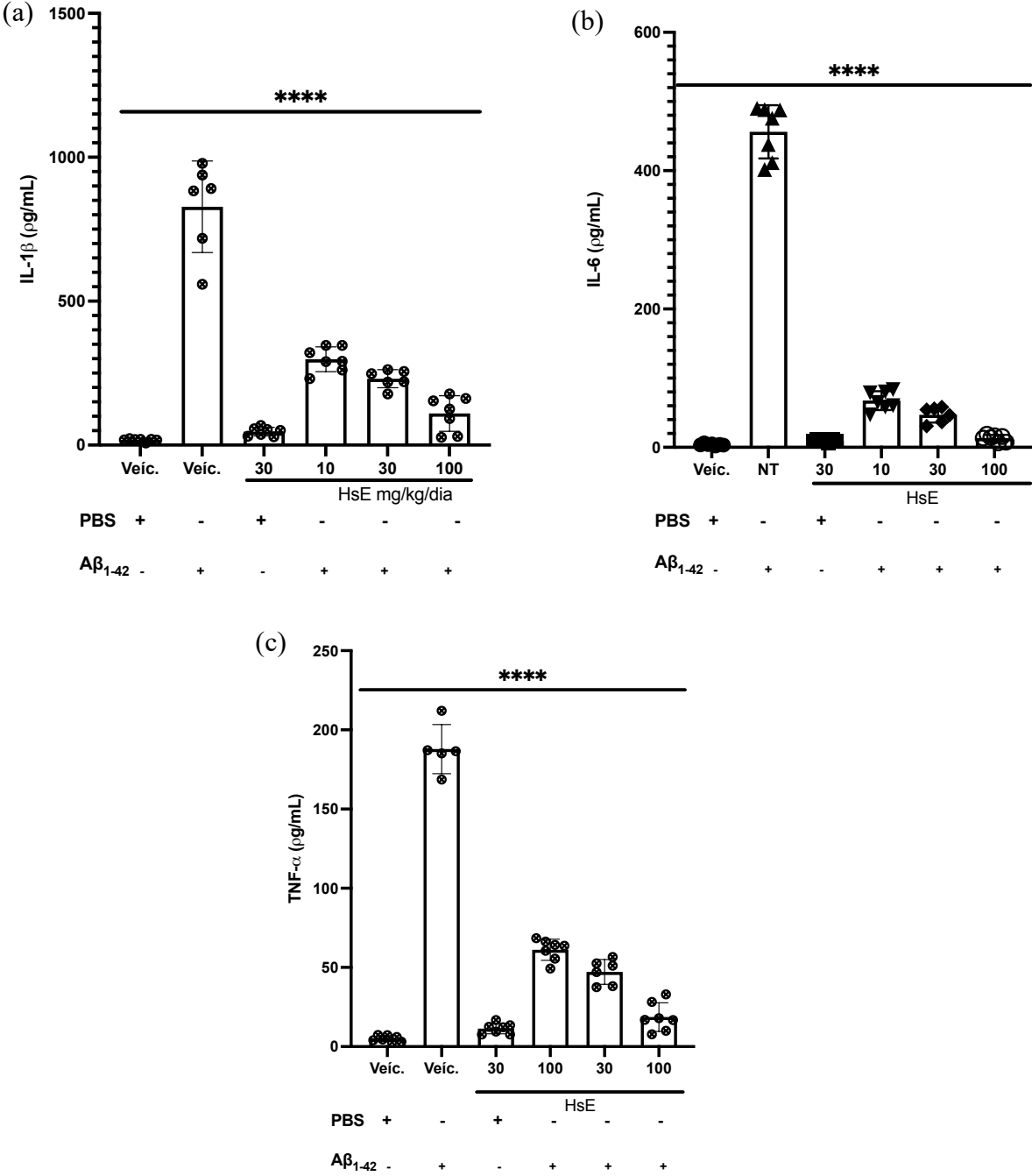
O extrato reduziu as concentrações de IL-1 β (**figura 5.30a**), IL-6 (**figura 5.30b**) e TNF (**figura 5.30c**) em todas as doses testadas, apresentando uma resposta dose-dependente para todas as citocinas avaliadas. É importante ressaltar que a redução dos mediadores pró-inflamatórios foi observada, até mesmo, nas menores doses avaliadas (**figura 5.30**) e que o extrato administrado no grupo PBS não induziu aumento de citocinas pró-inflamatórias.

Em trabalho anterior do nosso grupo (Carneiro Junior, 2020), demonstramos a capacidade do extrato HsE, em reverter o déficit cognitivo induzido pela injeção intra-hipocampal de A β ₁₋₄₂. Os valores percentuais, entre parênteses, representam o percentual de reconhecimento do objeto, na tarefa de reconhecimento de objetos (TRO), e do ambiente, no medo condicionado ao contexto. HsE foi capaz de reverter o déficit cognitivo induzido pelo peptídeo nas doses de 30 mg/kg ($68,6 \pm 14,2\%$, $n = 8$) e 100 mg/kg ($78,4 \pm 7,0\%$, $n = 9$), (A β ₁₋₄₂: $50,1 \pm 7,2\%$, $n = 10$) e PBS + veículo: $73,3 \pm 8,5\%$, $n = 9$) na tarefa de reconhecimento de objetos (TRO). No teste de medo condicionado ao contexto também se observou significativa redução da perda cognitiva dos animais após tratamento com HsE (A β ₁₋₄₂: $14,4 \pm 8,4\%$, $n = 10$; PBS + veículo: $45,7 \pm 3,5\%$, $n = 9$; 30 mg/kg de HsE: $46,5 \pm 6,8\%$, $n = 9$; e 100 mg/kg de HsE: $47,4 \pm 4,3\%$, $n = 9$).

Na doença de Alzheimer, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF, IL-6, IL-8, e IFN- γ estão relacionadas à progressão da DA (Calsolaro e Edison, 2016; Ogunmokun *et al.*, 2021). Adicionalmente, um estudo realizado por Leko *et al.* (2020) demonstrou que pacientes com determinados genótipos tendem a apresentar um favorecimento no desenvolvimento e progressão da DA. Os autores avaliaram a interferência de determinados polimorfismos em genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF) e pró-resolutiva (IL-10) no desenvolvimento e avanço da DA. O estudo demonstrou que polimorfismos em nucleotídeos únicos já resultam em diferenças na progressão da doença. Genótipos que favorecem a transcrição e levam ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β : 1473C/G ; IL-1 α : 889C/T ; IL-6: 174C/G e TNF: 308A/G) e que reduzem a produção de citocinas pró-resolutivas (IL-10: 1082G/A) podem tornar alguns pacientes mais vulneráveis ao desenvolvimento da neuroinflamação e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da

DA. Este estudo foi realizado com 115 pacientes com DA, 53 com demência leve e 11 pacientes saudáveis, onde os polimorfismos acima citados foram mais frequentes naqueles com a DA.

Figura 5.30 Efeito do extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HsE) sobre os níveis de (a) IL-1 β ; (b) IL-6 e (c) TNF em modelo murino de DA induzida pela injeção intra-hipocampal de A β ₁₋₄₂. As barras representam a média de 8 replicas $\pm$ desvio padrão da média. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferoni. ****p<0,0001



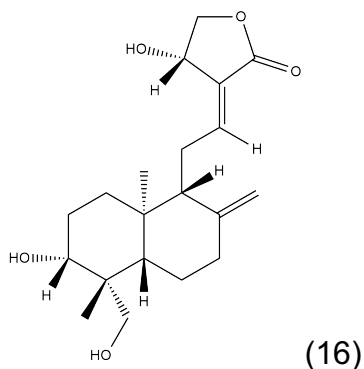
Nossos resultados demonstraram que o tratamento dos camundongos submetidos à cirurgia estereotáxica, para a injeção intra-hipocampal de peptídeo amiloide, com HsE foi capaz de reduzir a produção de todas as citocinas avaliadas, quando comparados com os animais que foram estimulados com $A\beta_{1-42}$ e tratados apenas com veículo (carboximetilcelulose a 0,5% em água). Este resultado foi observado desde a menor dose administrada (**figura 5.30**).

Ao buscarmos estudos na literatura sobre o efeito de extratos de plantas na redução de citocinas pró-inflamatórias em hipocampus murino, em modelos de DA, encontramos um estudo conduzido com uma preparação herbal composta por 11 diferentes plantas, conhecida como chotosan (Chen *et al.*, 2016). Os autores utilizaram o mesmo modelo murino que aqui relatamos, portanto, foram injetados 400 pmol de $A\beta_{1-42}$ intrahipocampalmente. Neste estudo, os autores relataram redução da concentração de IL-1 β no hipocampo dos animais após tratamento com chotosan na dose de 375 mg/kg/dia, *per os*, durante 3 semanas, bem como de TNF quando foi administrada a dose de chotosan de 75 mg/kg/dia, durante 3 semanas. Neste estudo, a concentração efetiva foi bem mais elevada do que a que aqui relatamos. Desta forma, HsE se apresenta mais potente.

Yang *et al.* (2021) revisaram o potencial do resveratrol (um composto polifenólico da classe dos estilbenos) no tratamento da doença de Alzheimer. O resveratrol previne a ativação microglial mediada por LPS, bem como a liberação de mediadores pró-inflamatórios (TNF, NO e IL-1 β) em culturas de neurônios corticais primários de ratos. A potencial atividade neuroprotetora também foi demonstrada pela redução dos teores de IL-1 β e IL-6 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar, em modelo simultâneo de diabetes mellitus do tipo 2 e DA (administração intraperitoneal de estreptozotocina e hipocampal de $A\beta$). Após administração de resveratrol (25 mg/kg/dia, por 5 semanas), os autores relataram melhorias na função cognitiva, de forma semelhante ao observado para HsE. Cabe ressaltar que no presente trabalho observou-se redução da liberação de citocinas após tratamento com dose menor de HsE (10 mg/kg/dia) do que a empregada por Yang e colaboradores. Também descrevemos reversão do déficit cognitivo após tratamento com HsE (30 mg/kg/dia) em dose próxima à descrita por Yang e colaboradores para um produto isolado (25 mg/kg/dia). Deve-se considerar, ainda, que nosso período de tratamento dos animais foi inferior (1 semana) ao descrito por Yang e colaboradores (5 semanas).

Evidências experimentais revistas por Ogunmokun *et al.* (2021) indicam que o aumento nos níveis de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF, IFN- γ , fatores estimuladores de colônia de macrófagos (MCSFs) e receptores de IFN- α e IL-8 no sangue e no líquido cefalorraquidiano está associado ao desenvolvimento de DA em pacientes. Desta forma, ressalta-se a importância dos resultados aqui apresentados, visto que eles demonstram a potencialidade de HsE no manejo da DA. É importante, também, avaliar produtos isolados deste extrato para identificar os principais constituintes responsáveis pelo efeito do extrato.

Um estudo de revisão de Abedi *et al.* (2021) relata que o efeito neuroprotetor de andrografolídeo (**16**), um diterpeno extraído de *Andrographis paniculata*, está associado à redução da agregação de beta amiloide e à supressão da resposta neuroinflamatória e da disfunção sináptica, revertendo a produção de citocinas pró-inflamatórias mediadas por micróglia, bem como a redução de proteínas sinápticas associadas à DA.



Conforme descrito nos dados da literatura supracitados, a neuroinflamação é um fator importante para o desenvolvimento e progressão da DA. Tendo em vista que as lesões celulares e teciduais observadas na DA têm a neuroinflamação como um importante processo de avanço e desenvolvimento destes danos, marcado pela elevada produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e considerável aumento de células da glia ativadas, o uso direcionado de anticorpos monoclonais foi recentemente aventado como estratégia para a redução da produção dessas citocinas, visando o tratamento da DA (Brod, 2022). Segundo o autor, a neuroinflamação com ativação celular no SNC e a expressão excessiva de citocinas imunes predispõe ao maior risco de DA. A micróglia, as células mieloides perivasculares e os macrófagos ativados produzem IL-1 β e IL-6 em níveis mais

elevados em pacientes com DA. Agentes anti-inflamatórios, capazes de reduzir danos mediados por células/citocinas, fornecem uma estratégia terapêutica racional. Desta forma, o desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos capazes de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias constitui uma estratégia promissora para o tratamento ou prevenção da DA.

Dados da literatura demonstram que a rutina (100 mg/kg/dia) foi capaz de reduzir a produção de IL-1 β e IL-6 (com redução em torno de 50% para ambas) e de reverter o déficit cognitivo observado em camundongos transgênicos APP^{swe}/PS1^{dE9}, tratados por seis semanas, sugerindo uma possível inibição da ativação de células da glia. Resultado semelhante foi relatado para o tratamento de camundongos APP/PS1 com o ácido clorogênico (100 mg/kg/dia, por oito semanas) (Shi *et al.*, 2023) e para uma fração enriquecida em proantocianidinas de cascas de semente de lotus (100 mg/kg, por cinco meses) (Wang *et al.*, 2023). Estes achados da literatura demonstram o efeito de alguns dos constituintes majoritários de HsE (rutina e ácido clorogênico) em reduzir a neuroinflamação, o que condiz com os resultados que apresentamos neste trabalho. Estes estudos nos permitem inferir quais compostos são importantes para a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, ainda não existem estudos relatando o efeito neuroprotetor do bornesitol, que aqui descrevemos pela primeira vez.

Células da glia e macrófagos movem-se para a região onde há dano celular no SNC. Este aumento da expressão e mudança da morfologia de micróglia é conhecida como microgliose, sendo um fator crucial na neuroinflamação e no avanço da neurodegeneração (Merighi *et al.*, 2022). Desta forma, na sequência do trabalho, avaliamos o efeito de HsE e do bornesitol sobre a microgliose induzida pela A β ₁₋₄₂.

5.6.6 Efeito de HsE e do bornesitol sobre a microgliose induzida por A β ₁₋₄₂ em modelo murino

Dentre as repostas imunológicas do SNC a insultos patogênicos, a microgliose é uma das mais intensas. A inflamação mediada por micróglia é capaz de agravar o dano cerebral e é associada a diversas doenças neurodegenerativas. Uma das principais características da microgliose é o aumento do número de micróglia ativadas. A ativação de micróglia é um processo crítico na neuroinflamação e está intimamente relacionado à cascata neuropatológica que leva ao desenvolvimento de demência (Toledano-Díaz *et al.*, 2022).

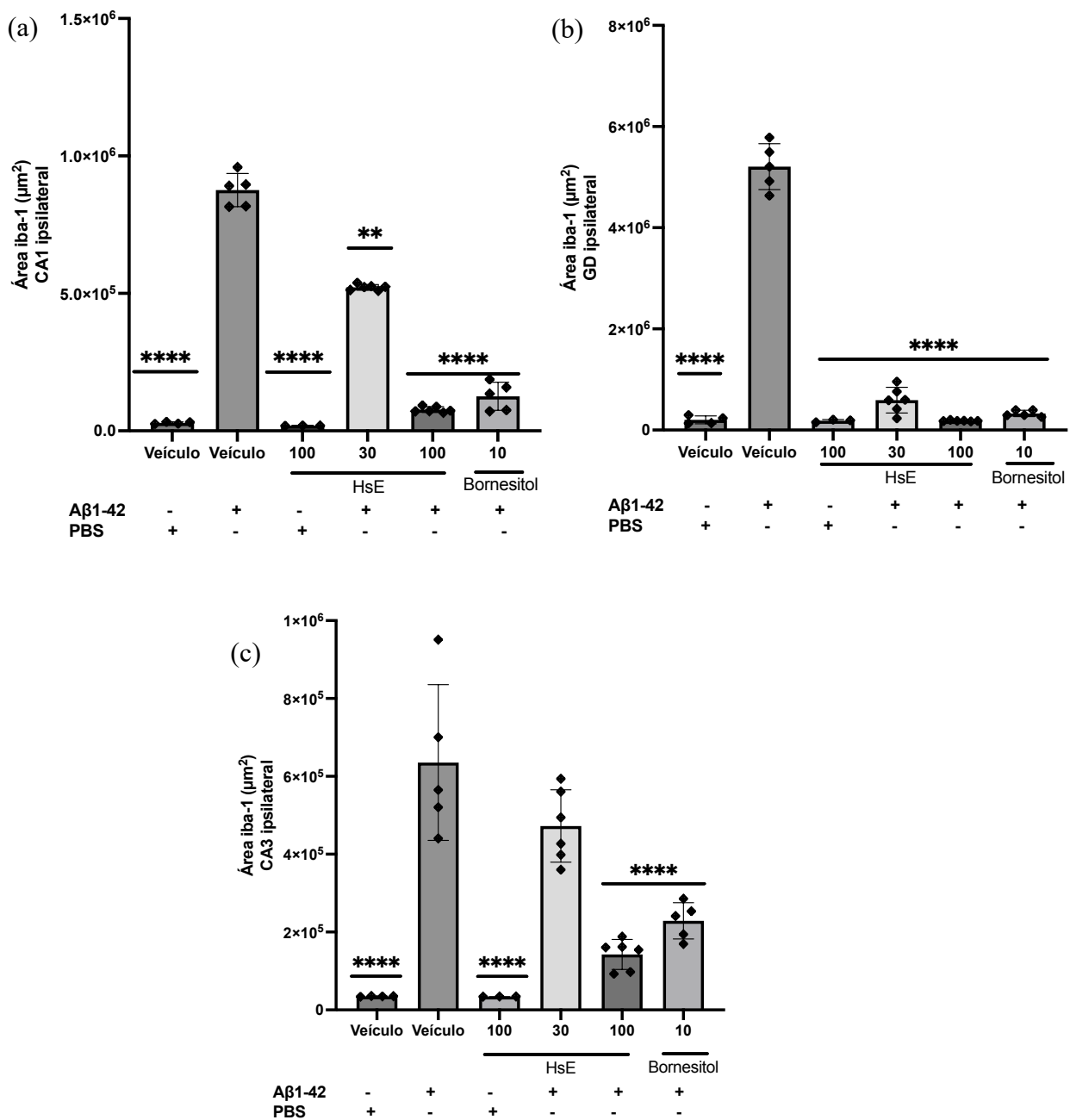
Como descrito na **seção 4.15**, a microgliose hipocampal foi avaliada por imunomarcacão de Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1* - molécula adaptadora de ligacão ao cálcio ionizado 1), sendo que Iba-1 está presente em toda micróglia e funciona como um marcador de células Iba-1⁺, e foram utilizados os cortes de hipocampo de 30 µm de espessura dos animais submetidos à cirurgia esterotáxica e à perfusão intracardíaca. Foi possível observar alteracão da área marcada em CA1 (*cornus ammonis 1*) e no GD (giro dentado) para todos os tratamentos realizados. Em CA3 (*cornus ammonis 3*), não foi possível observar alteracão da área marcada para HsE na dose de 30 mg/kg, sendo a alteracão observada na dose de 100 mg/Kg (**figura 5.31**). Imagens representativas das imunomarcacões são fornecidas na **figura 5.32**

Ao se analisar os gráficos das áreas marcadas, houve reduçã da microgliose em todas as regiões dos cortes de hipocampo analisadas para o extrato, na dose de 100 mg/kg, e para o bornesitol, na dose de 10 mg/kg.

Os resultados para a marcaçã de microgliose estã consistentes com o que foi observado ao se analisar a reduçã da liberaçã de citocinas pró-inflamatórias em hipocampos recolhidos a fresco, demonstrados na **figura 5.31**. Similarmente, em um estudo com extrato hidroetanólico de folhas e galhos de *Ficus erecta*, Sohn et al. (2021), demonstraram a capacidade do extrato em reduzir os níveis de células Iba-1⁺, acompanhado da reduçã de IL-1β e TNF, em camundongos submetidos à injeçã intracerebroventricular de Aβ₁₋₄₂ e tratados com 150 mg/kg do extrato, por via oral. O resultado obtido por Sohn e colaboradores foi associado à presença de compostos polifenólicos, com destaque para a rutina, canferol-3-O-rutenosídeo e para o ácido clorogênico. Similarmente, um estudo conduzido por Deng *et al.* (2019) demonstrou a capacidade de Cu-Zhi-Yi-Hao, uma formulaçã tradicional chinesa composta por diversas plantas, em reduzir a ativaçã de micróglia, evidenciado pela reduçã de células Iba-1⁺, e a expressã de TNF em ratos submetidos à injeçã intrahipocampal de Aβ₂₅₋₃₅, nas doses de 400 e 800 mg/kg.

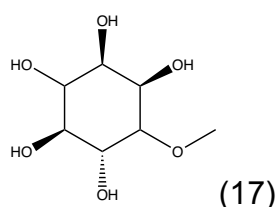
Comparados aos estudos acima relatados, nossos resultados demonstraram uma maior potência em reduzir a ativaçã de micróglia e, consequentemente, a liberaçã de citocinas pró-inflamatórias. Assim, nossos resultados demonstram a potencialidade de HsE e do bornesitol em reduzir a microgliose e, consequentemente, agir no combate à neuroinflamaçã.

Figura 5.31 Efeito de HsE e bornesitol sobre a ativação de células Iba-1⁺ em fatias de hipocampo de camundongos C57Bl/6 submetidos à estereotaxia para a injeção de A β ₁₋₄₂ intrahipocampal. Imagens representativas da imunomarcagem no CA1 (a), GD (b) e CA3 (c) dos grupos PBS + veículo, PBS + HsE 100, A β ₁₋₄₂ + veículo, A β ₁₋₄₂ + HsE 30, A β ₁₋₄₂ + HsE 100 e A β ₁₋₄₂ + bornesitol 10. Gráficos apresentando a dispersão e a análise estatística do resultado quantitativo de Iba-1 em CA1 (a), GD (b) e CA3 (c), nos grupos experimentais. Dados apresentados em relação à área de imunomarcagem. **p<0,01 e ****p<0,001, comparado com o grupo estimulado e não tratado. Dados analisado por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni.



Os achados imunohistoquímicos, aqui apresentados, reforçam os resultados das análises imunológicas da liberação de citocinas pró-inflamatórias, realizados por ELISA. Como descrito na revisão bibliográfica, a inflamação é um dos fatores envolvidos no surgimento e avanço da DA, sendo de grande importância o seu controle para reverter os danos causados pela doença e impedir o seu avanço. Com o avanço da DA, células da glia, como as micróglia, perdem a capacidade de fagocitar a β -amiloide, mas continuam capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 β e IFN- γ , as quais exacerbam o processo inflamatório (Cai *et al.*, 2022; Merighi *et al.*, 2022).

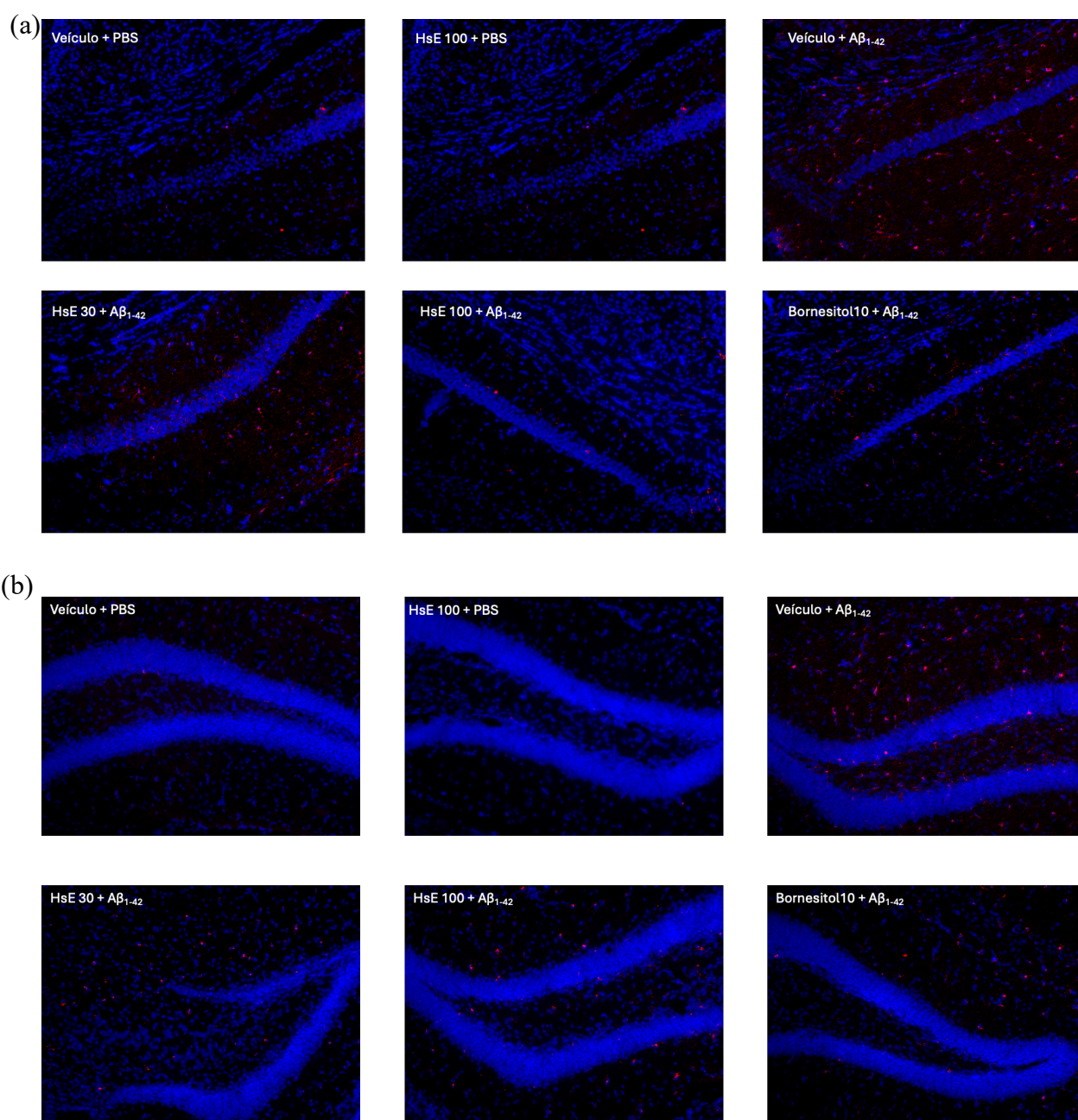
Em um trabalho conduzido por Khan *et al.* (2024), o D-pinitol (**17**) demonstrou a capacidade de reduzir a concentração de TNF e de IL-6 nas concentrações de 50 e 100 mg/kg/dia (*per os*), em modelo murino de dano cognitivo induzido por isoproterenol (15 mg/kg/dia, subcutâneo), em 20 dias de experimento. Este resultado evidencia o potencial de ciclitois em atuarem em processos neuroinflamatórios. Assim, são condizentes com os resultados que apresentamos no presente trabalho quanto à redução de citocinas pró-inflamatórias e da microgliose em hipocampus murinos. Estes resultados permitem avançar no entendimento da ação de ciclitois sobre a neuroinflamação.



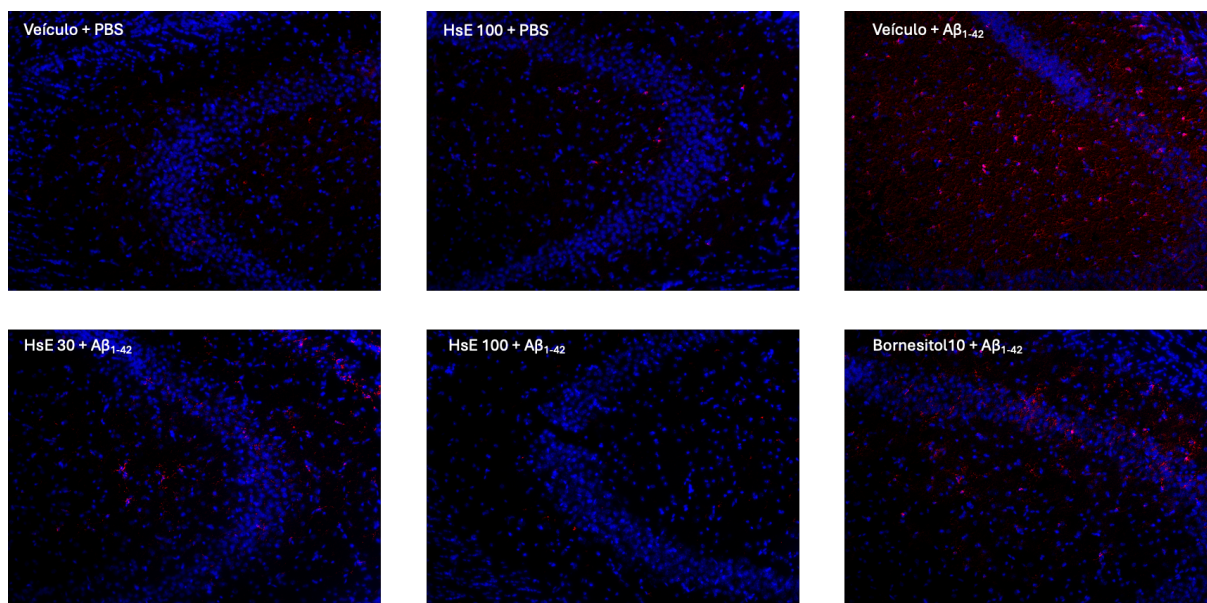
Em um estudo conduzido por Kong *et al* (2020), o D-pinitol, após 3 horas de pré-tratamento nas concentrações de 5 e 10 μ M, demonstrou capacidade de reduzir a resposta inflamatória induzida por LPS (1 μ g/mL, por 24 horas) em células microgliais (BV2). Este resultado foi observado com a redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-6 e IL-1 β) e, também, pela redução da produção de espécies reativas de oxigênio. Desta forma, os autores enfatizaram o potencial de ciclitois em reduzir a resposta inflamatória, inclusive em células do SNC. Estes resultados são condizentes com o encontrado para o bornesitol tanto na análise de seu efeito sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias, quanto a análise de sua atividade sobre a microgliose em hipocampus murinos.

Deste modo, nossos resultados referentes à redução de citocinas pró-inflamatórias e da microgliose demonstram o potencial de HsE, HsFr3 e do bornesitol no manejo da DA.

Figura 5.32: Imagens representativas do efeito do extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* (HsE) e do bornesitol sobre a imunomarcagem de iba-1 e DAPI, nas regiões (a) CA1, (b) GD e (c) CA3 de hipocampus murinos em modelo de DA induzida pela injeção intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$. As amostras foram testadas nas doses de 30 e 100 mg/kg/dia, para HsE, e 10 mg/kg/dia, para o bornesitol, por 7 dias após a cirurgia estereotáxica.



(c)



A padronização de extratos vegetais capazes de atuar concomitantemente na neuroinflamação, aqui demonstrado pela redução de citocinas pró-inflamatórias (*in vitro* e *in vivo*) e pela redução da ativação de micróglia (*in vivo*) e em outros fatores associados ao desenvolvimento e progresso da DA, como na redução da morte neuronal (*in vitro*) e melhora cognitiva (que demonstramos, *in vivo*, em trabalho anterior – Carneiro Junior, 2020) é de importância ímpar para a identificação de agentes potencialmente ativos na DA. Neste contexto, de forma inédita, descrevemos a potencialidade de extrato padronizado de folhas de *H. speciosa* em reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo murino de DA. Este efeito nos leva a avançar na compreensão da melhora cognitiva induzida pelo tratamento com o extrato supracitado em modelo murino de DA, o qual também fomos pioneiros em descrever (Carneiro Junior, 2020).

6 CONCLUSÕES

Foi obtido um extrato hidroacetônico padronizado de folhas de *H. speciosa* e uma fração enriquecida em proantocianidinas, que apresentaram composição química qualitativa semelhantes ao extrato e à fração preparados durante o mestrado do autor, indicando reprodutibilidade do processo extrativo e do fracionamento. O desengorduramento do extrato, realizado previamente ao fracionamento, resultou em uma fração rica em proantocianidinas sem a presença de rutina e ácido clorogênico.

Análises extensivas por CLUE-ESI-EM/EM associadas a reações de degradação por tiólise do extrato em acetona/água (70:30) de *H. speciosa* e da fração enriquecida em proantocianidinas possibilitaram caracterizar a presença de quatro procianidinas diméricas isoméricas do tipo B C-glicosiladas, bem como de duas procianidinas triméricas isoméricas do tipo B C-glicosiladas.

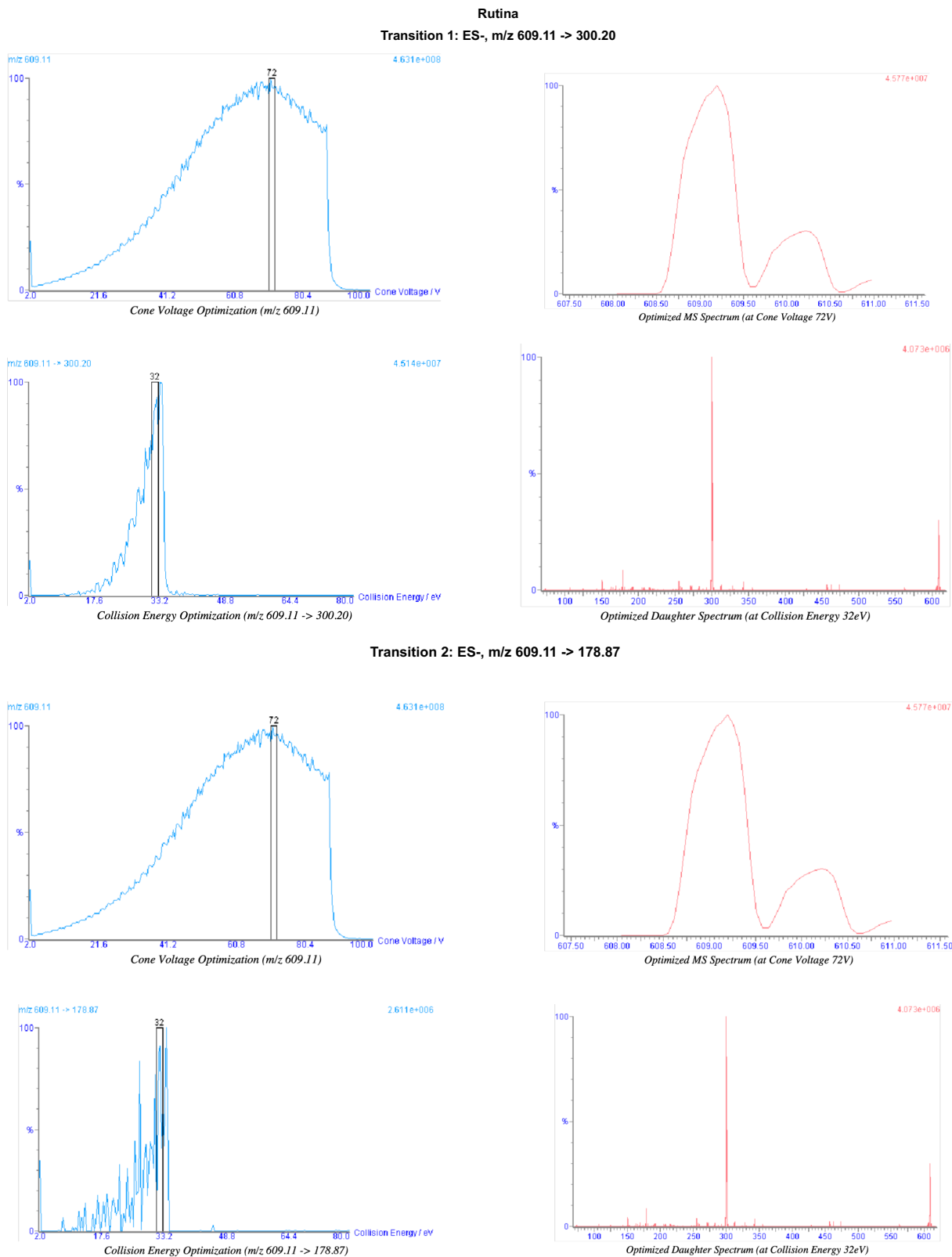
O método analítico de CLUE-EM baseado em MRM desenvolvido e validado para a quantificação de marcadores químicos no extrato hidroacetônico de folhas de *H. speciosa* e na fração enriquecida em proantocianidinas se demonstrou linear, preciso, exato e robusto. O teor de procianidinas na fração enriquecida atingiu $95,8 \pm 0,1\%$ m/m, consideravelmente maior que no extrato de origem ($5,8 \pm 0,1\%$ m/m).

O extrato de hidroacetônico de *H. speciosa* (HsE), a fração enriquecida em proantocianidinas (HsFr3) e o bornesitol não apresentaram citotoxicidade para células SH-SY5Y e THP-1 nas concentrações ensaiadas. O tratamento de células THP-1 estimuladas com LPS com HsE, HsFr3 e bornesitol reduziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β e IL-6) e o estresse oxidativo. Estes achados demonstram potencial para o tratamento de inflamação sistêmica, que é um importante fator na gênese e progressão da DA. HsE, HsFr3 e bornesitol reverteram a citotoxicidade induzida por A β ₁₋₄₂ em células SH-SY5Y, indicando efeito neuroprotetor.

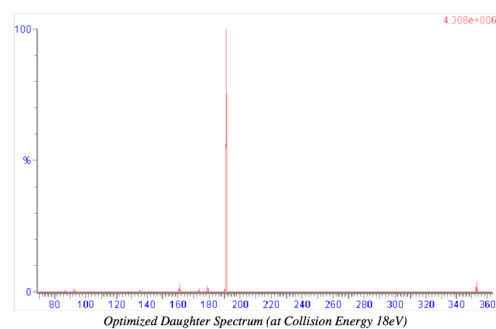
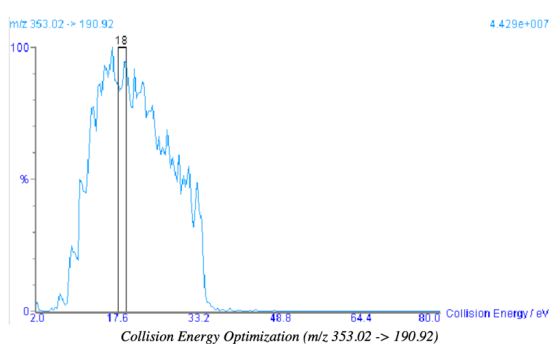
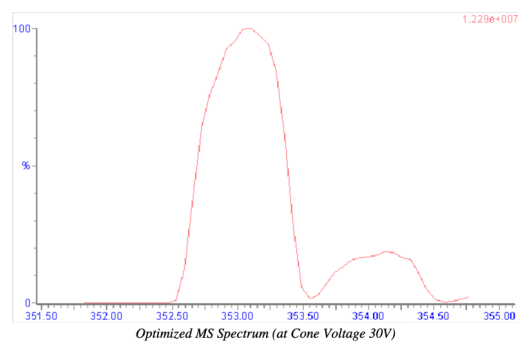
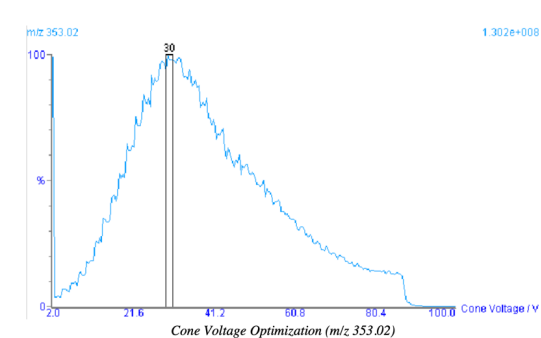
O extrato hidroacetônico de *H. speciosa* (HsE) reduziu a neuroinflamação em modelo murino de neurotoxicidade induzida por A β ₁₋₄₂, diminuindo a concentração de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β e IL-6) nos hipocampus dos animais tratados por via oral. É provável que o efeito anti-inflamatório contribua para a redução do déficit cognitivo anteriormente observado no mesmo modelo murino, após tratamento com HsE. Este efeito de melhora da neuroinflamação também foi observado quando se avaliou a ação do extrato e do bornesitol na microgliose induzida por A β ₁₋₄₂.

7 ANEXOS

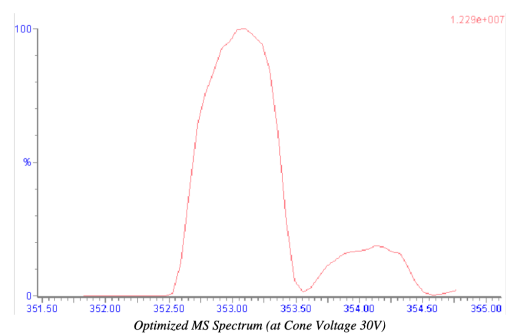
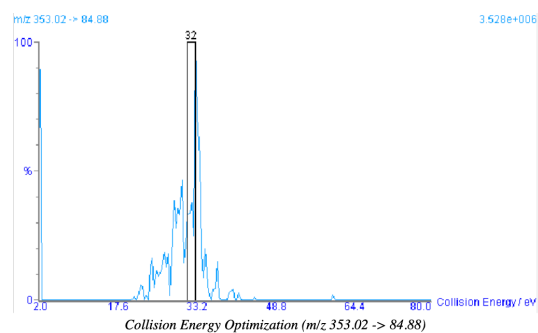
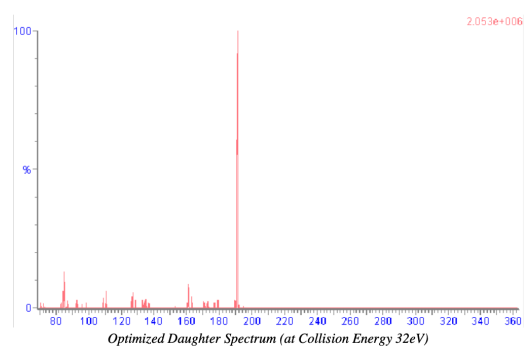
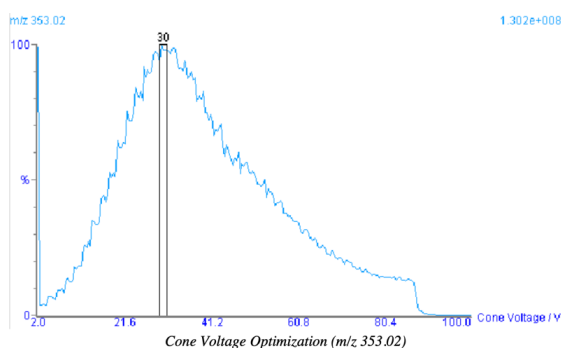
Figura 7.1: Gráficos de intensidade de sinal e resposta captada pelo equipamento durante a otimização dos parâmetros de MRM. Condições experimentais descritas na Parte Experimental, **item 4.10.1.1.**



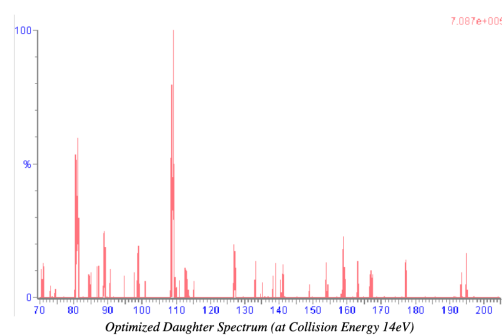
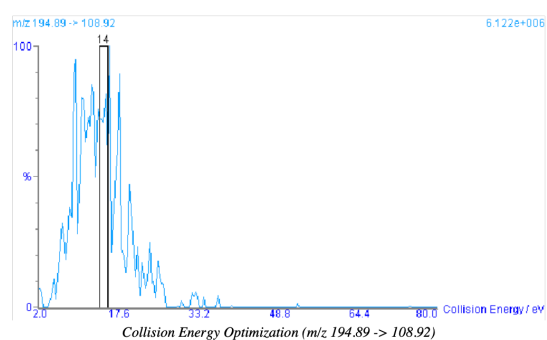
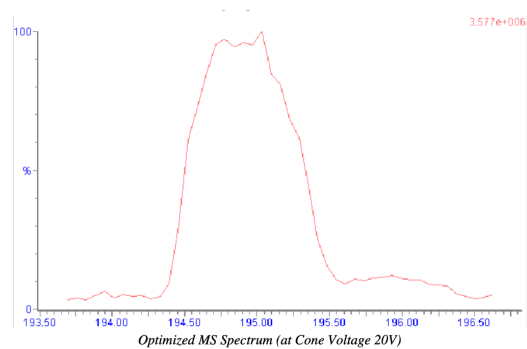
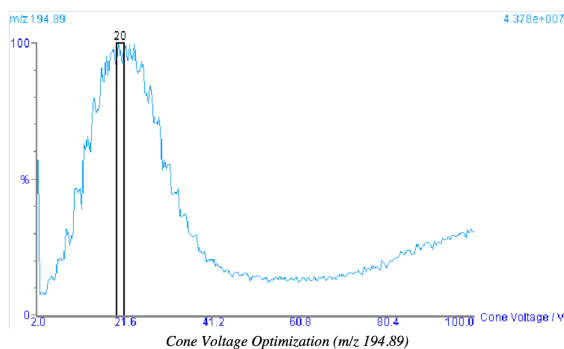
Acido clorogênico (354.31)
Transition 3: ES-, m/z 353.02 -> 190.92



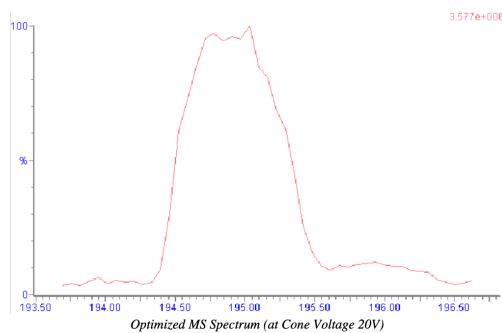
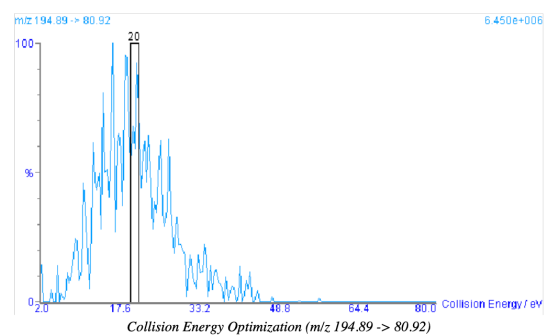
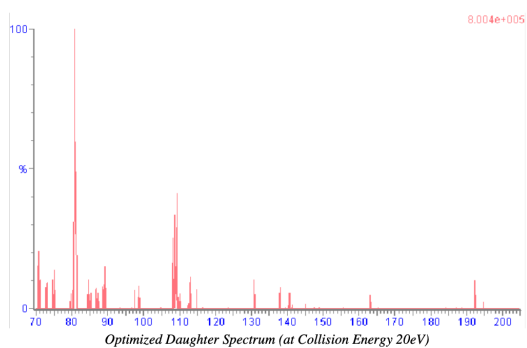
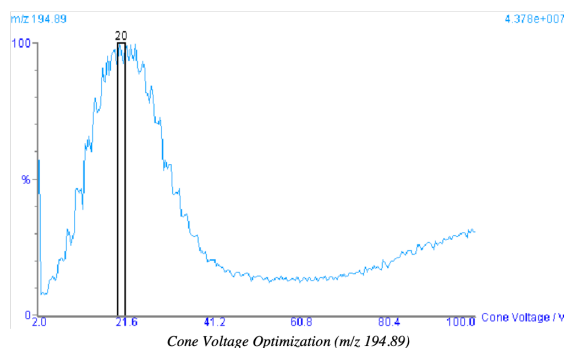
Transition 4: ES-, m/z 353.02 -> 84.88



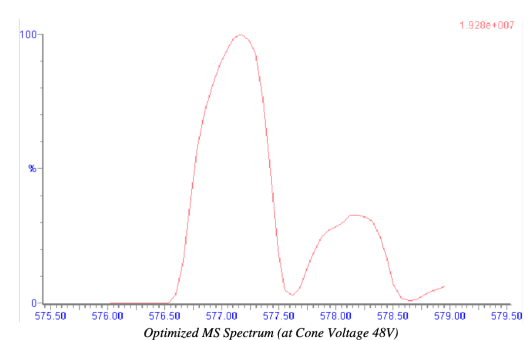
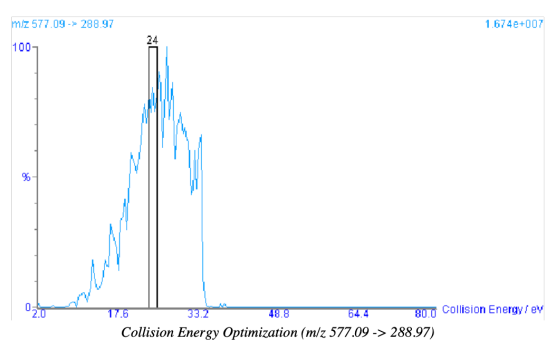
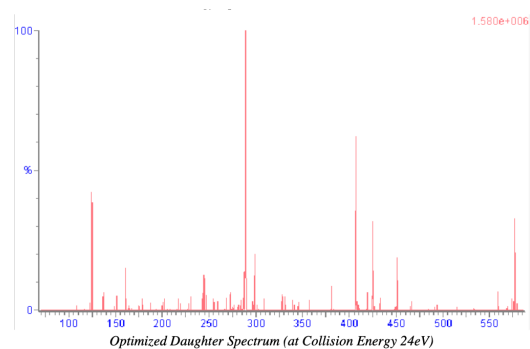
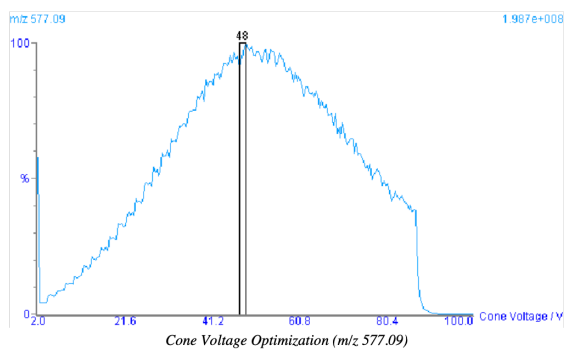
Bornesitol (194.18)
Transition 5: ES+, m/z 194.89 -> 108.92



Transition 6: ES+, m/z 194.89 -> 80.92



Procianidina B2 (578.50)
Transition 7: ES-, m/z 577.09 -> 288.97



Transition 8: ES-, m/z 577.09 -> 424.99

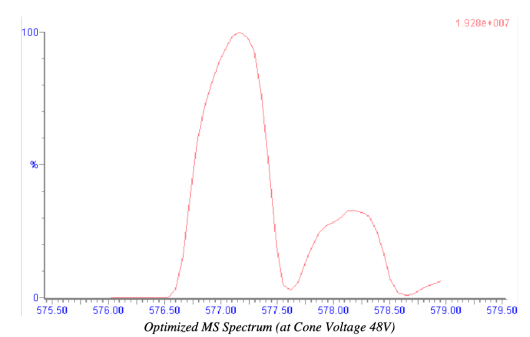
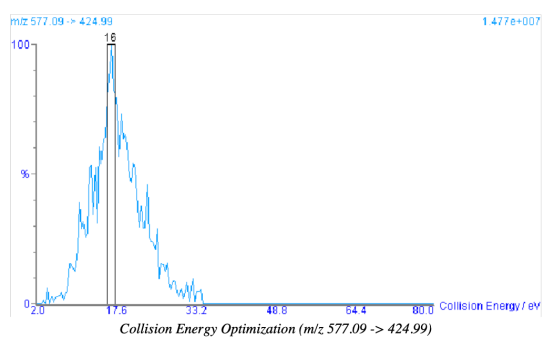
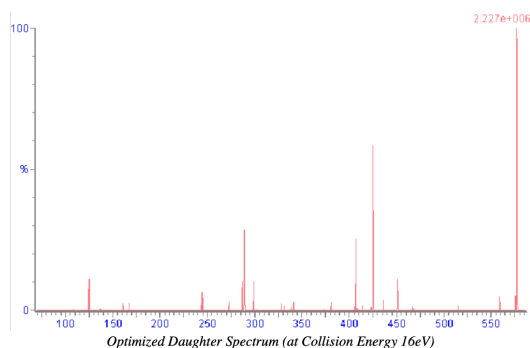
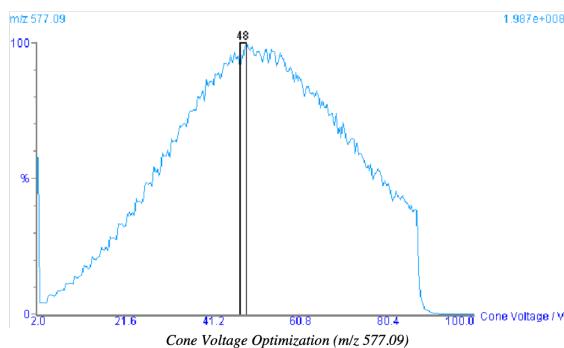
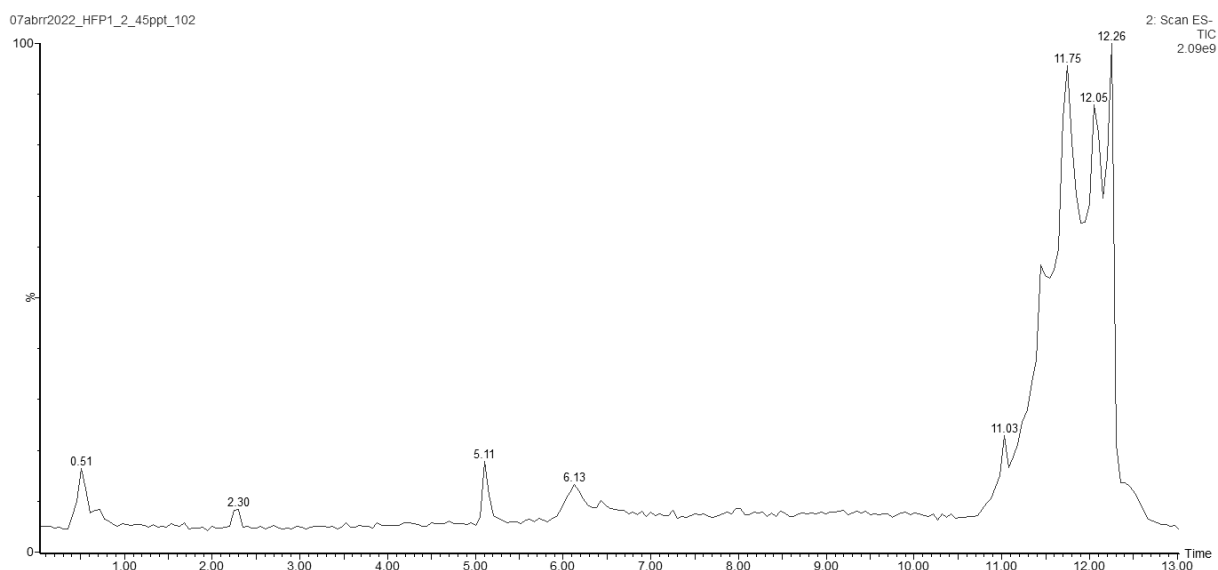


Figura 7.2: Cromatograma obtido por CLUE-DAD para a amostra branco da reação de degradação por tiólise. Condições experimentais descritas no Idem **item 4.8**.



8 REFERÊNCIAS

- ABEYSINGHE, A. A. D. T.; DESHAPRIYA, R. D. U. S.; UDAWATTE, C. Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions. **Life Sciences**, [s. l.], v. 256, p. 117996, 2020.
- AL AMIN, Md. *et al.* Flavonoids and Alzheimer's disease: reviewing the evidence for neuroprotective potential. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04922-w>. Acesso em: 26 jun. 2024.
- ALBAR, Nezar Y. *et al.* The interaction between insulin resistance and Alzheimer's disease: a review article. **Postgraduate Medicine**, [s. l.], v. 136, n. 4, p. 377–395, 2024.
- ARANDA, A. *et al.* Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 954–963, 2013.
- ASHBY, Emma L. *et al.* Effects of Hypertension and Anti-Hypertensive Treatment on Amyloid- β (A β) Plaque Load and A β -Synthesizing and A β -Degrading Enzymes in Frontal Cortex. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 1191–1203, 2016.
- AYTON, Scott; BUSH, Ashley I. β -amyloid: The known unknowns. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 65, p. 101212, 2021.
- BAHAR, Entaz *et al.* Protective role of quercetin against manganese-induced injury in the liver, kidney, and lung; and hematological parameters in acute and subchronic rat models. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 11, p. 2605–2619, 2017.
- BAI, Renren *et al.* Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 77, p. 101619, 2022.
- BARROS, Ivelone Maria de Carvalho. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). [s. l.], 2008. Disponível em: <http://repositorio2.unb.br/jspui/handle/10482/4709>. Acesso em: 18 jul. 2024.
- BASTOS, Katherine Xavier *et al.* Identification of Phenolic Compounds from *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) Leaves by UHPLC Orbitrap-HRMS. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 143, 2017.
- BELLAVITE, Paolo. Neuroprotective Potentials of Flavonoids: Experimental Studies and Mechanisms of Action. **Antioxidants**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 280, 2023.
- BELLOZI, Paula. M.aria Q.uaglio. Efeito de um inibidor dual da enzima fosfatidil-3-quinase (PI3K) e do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) nas alterações patológicas induzidas por peptídeo β -amiloide 1-42 in vivo e in vitro. 2014.

Dissertação (Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

BRASIL. **Panorama do Censo 2022**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://censo2022.ibge.gov.br/panorama/>. Acesso em: 30 abr. 2024.

BRASIL. **Qual o tratamento para o Alzheimer?**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/alzheimer/tratamento/tratamento>. Acesso em: 25 jun. 2024.

BROD, Staley A. Anti-Inflammatory Agents: An Approach to Prevent Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 457–472, 2022.

CAI, Yongle *et al.* Microglia in the Neuroinflammatory Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Related Therapeutic Targets. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, p. 856376, 2022.

CALSOLARO, Valeria; EDISON, Paul. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. **Alzheimer's & Dementia**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 719–732, 2016.

CARNEIRO JUNIOR, Wellerson de Oliveira. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DE *Hancornia speciosa* GOMES EM MODELO MURINO DE DOENÇA DE ALZHEIMER. 2020. 104p.

CASTILLO, Willian Orlando *et al.* *Caliphruria subedentata* (Amaryllidaceae) decreases genotoxicity and cell death induced by β -amyloid peptide in SH-SY5Y cell line. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 836, Latin-American Congress of Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Teratogenesis Association (ALAMCTA), p. 54–61, 2018.

CASTILLO, Willian O. *et al.* Galanthamine decreases genotoxicity and cell death induced by β -amyloid peptide in SH-SY5Y cell line. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 57, p. 291–297, 2016.

CASTILLO, Willian Orlando *et al.* Genistein and Galantamine Combinations Decrease β -Amyloid Peptide (1–42)–Induced Genotoxicity and Cell Death in SH-SY5Y Cell Line: an In Vitro and In Silico Approach for Mimic of Alzheimer's Disease. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 691–706, 2020.

CHATTERJEE, Saion *et al.* Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Dementia in Women Compared With Men: A Pooled Analysis of 2.3 Million People Comprising More Than 100,000 Cases of Dementia. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 300, 2016.

CHEN, Lei *et al.* Chotosan improves A β 1–42-induced cognitive impairment and neuroinflammatory and apoptotic responses through the inhibition of TLR-4/NF- κ B signaling in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 191, p. 398–407, 2016.

CHEN, Lu *et al.* The Antioxidant Procyanidin Reduces Reactive Oxygen Species Signaling in Macrophages and Ameliorates Experimental Colitis in Mice. **Frontiers in**

Immunology, [s. l.], v. 8, p. 1910, 2018.

CHONPATHOMPIKUNLERT, Pennapa *et al.* TEMPOL protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced cell toxicity. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 650, n. 2, p. 544–549, 2011.

CICCOCIOPPO, Fausta *et al.* Neurodegenerative diseases as proteinopathies-driven immune disorders. **Neural Regeneration Research**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 850–856, 2019.

ČOLOVIĆ, Mirjana B *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

COMMISSIONER, Office of the. **FDA Converts Novel Alzheimer's Disease Treatment to Traditional Approval**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-converts-novel-alzheimers-disease-treatment-traditional-approval>. Acesso em: 26 jun. 2024.

CUMMINGS, Jeffrey *et al.* Aducanumab produced a clinically meaningful benefit in association with amyloid lowering. **Alzheimer's Research & Therapy**, [s. l.], v. 13, p. 98, 2021.

DAJAS, Federico. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 143, n. 2, p. 383–396, 2012.

DEBREGEAS ET ASSOCIÉS PHARMA (D & A PHARMA) V EUROPEAN COMMISSION AND EUROPEAN MEDICINES AGENCY. ECJ. Appeal – Medicinal products for human use – Application for marketing authorisation – Independence of experts consulted by the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) of the European Medicines Agency (EMA) – Article 41 of the Charter of Fundamental Rights of the European Union – Right to good administration – Requirement of objective impartiality – Criteria for verifying the absence of conflict of interest – EMA's policy on competing interests – Activities as a principal researcher, consultant or strategic adviser for the pharmaceutical industry – Rival products – Re-examination procedure – Regulation (EC) No 726/2004 – Article 56, Article 62, Article 63 – EMA Guidelines – Consultation of a scientific advisory group (SAG) or an ad hoc expert group. n. Case C-291/22 P, 14 mar. 2024. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX:62022CJ0291>. Acesso em: 26 jun. 2024.

DECZKOWSKA, Aleksandra *et al.* Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. **Cell**, [s. l.], v. 173, n. 5, p. 1073–1081, 2018.

DENG, Yuanyuan *et al.* CZYH Alleviates β -Amyloid-Induced Cognitive Impairment and Inflammation Response via Modulation of JNK and NF- κ B Pathway in Rats. **Behavioural Neurology**, [s. l.], v. 2019, p. 9546761, 2019.

DERKACZEW, Maria *et al.* Cyclitols: From Basic Understanding to Their Association with Neurodegeneration. **Nutrients**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 2029, 2023.

DEVKOTA, Sujana; WILLIAMS, Todd D.; WOLFE, Michael S. Familial Alzheimer's disease mutations in amyloid protein precursor alter proteolysis by γ -secretase to

increase amyloid β -peptides of ≥ 45 residues. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 296, p. 100281, 2021.

DHAPOLA, Rishika *et al.* Recent Advances in Molecular Pathways and Therapeutic Implications Targeting Mitochondrial Dysfunction for Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 535–555, 2022.

DONG, Xinyan *et al.* Captopril alleviates epilepsy and cognitive impairment by attenuation of C3-mediated inflammation and synaptic phagocytosis. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 19, p. 226, 2022.

DUBOIS, Bruno *et al.* Biomarkers in Alzheimer's disease: role in early and differential diagnosis and recognition of atypical variants. **Alzheimer's Research & Therapy**, [s. l.], v. 15, p. 175, 2023.

DUNKHUNTHOD, Benjawan *et al.* Gymnema inodorum (Lour.) Decne. Extract Alleviates Oxidative Stress and Inflammatory Mediators Produced by RAW264.7 Macrophages. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2021, p. 8658314, 2021.

EFTHYMIU, Anastasia G.; GOATE, Alison M. Late onset Alzheimer's disease genetics implicates microglial pathways in disease risk. **Molecular Neurodegeneration**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 43, 2017.

ENDRINGER, Denise; OLIVEIRA, Osmair; BRAGA, Fernão. In vitro and in silico inhibition of angiotensin-converting enzyme by carbohydrates and cyclitols. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 37–45, 2014.

ENDRINGER, Denise C.; PEZZUTO, John M.; BRAGA, Fernão C. NF-kappaB inhibitory activity of cyclitols isolated from Hancornia speciosa. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 1064–1069, 2009.

ENGSTRÖM, Marica T. *et al.* Rapid Qualitative and Quantitative Analyses of Proanthocyanidin Oligomers and Polymers by UPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 15, p. 3390–3399, 2014.

ES-SAFI, Nour-Eddine *et al.* Application of ESI/MS, CID/MS and tandem MS/MS to the fragmentation study of eriodictyol 7-O-glucosyl-(1→2)-glucoside and luteolin 7-O-glucosyl-(1→2)-glucoside. **International Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 247, n. 1, p. 93–100, 2005.

FERREIRA, H.C. *et al.* Endothelium-dependent vasodilation induced by Hancornia speciosa in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 14, n. 7–8, p. 473–478, 2007.

FERREIRA, Herick Campos. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of Hancornia speciosa via phosphatidyl-inositol 3-kinase. **Journal of ...**, [s. l.], 2007. Disponível em: https://www.academia.edu/58153357/Nitric_oxide_dependent_vasodilatation_by_ethanolic_extract_of_Hancornia_speciosa_via_phosphatidyl_inositol_3_kinase. Acesso em: 4 mar. 2024.

FERREIRA-VIEIRA, Talita *et al.* Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 101–115, 2016.

FISH, PV *et al.* New approaches for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, [s. l.], v. 29, n. 2, 2019. Disponível em: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez27.periodicos.capes.gov.br/30501965/>. Acesso em: 30 abr. 2024.

FREITAG *et al.* Spermidine reduces neuroinflammation and soluble amyloid beta in an Alzheimer's disease mouse model. **Journal of neuroinflammation**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2022. Disponível em: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez27.periodicos.capes.gov.br/35780157/>. Acesso em: 30 abr. 2024.

FREJ, Anna D.; OTTO, Grant P.; WILLIAMS, Robin S. B. Tipping the scales: Lessons from simple model systems on inositol imbalance in neurological disorders. **European Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 154–163, 2017.

GANGULY, Upasana *et al.* Oxidative Stress, Neuroinflammation, and NADPH Oxidase: Implications in the Pathogenesis and Treatment of Alzheimer's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2021, p. e7086512, 2021.

GANGULY, Gargi *et al.* Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 11, p. 797–810, 2017.

GAO, Chi *et al.* Development of a Thiolytic HPLC Method for the Analysis of Procyanidins in Cranberry Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 9, p. 2159–2167, 2018.

GEA, An *et al.* In situ analysis and structural elucidation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) tannins for high-throughput germplasm screening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 495–503, 2011.

GELLER, Fabiana Cristina *et al.* Evaluation of the Wound Healing Properties of *Hancornia speciosa* Leaves. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 29, n. 12, p. 1887–1893, 2015.

GHAFOURI-FARD, Soudeh *et al.* Disease-associated regulation of gene expression by resveratrol: Special focus on the PI3K/AKT signaling pathway. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 298, 2022.

GIBBONS, Garrett S.; LEE, Virginia M. Y.; TROJANOWSKI, John Q. Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau. **JAMA neurology**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 101–108, 2019.

GILLIS, Cai *et al.* The incidence of mild cognitive impairment: A systematic review and data synthesis. **Alzheimer's & Dementia : Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring**, [s. l.], v. 11, p. 248–256, 2019.

GOMES, José Hugo De Sousa *et al.* Forced degradation of l-(+)-bornesitol, a bioactive marker of *Hancornia speciosa*: Development and validation of stability indicating UHPLC-MS method and effect of degraded products on ACE inhibition.

Journal of Chromatography B, [s. l.], v. 1093–1094, p. 31–38, 2018.

GONG, Yu-Shi *et al.* Ameliorative effect of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive impairment and brain aging induced by D-galactose. **Experimental Gerontology**, [s. l.], v. 74, p. 21–28, 2016.

GU, Liwei *et al.* Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 25, p. 7513–7521, 2003.

GUERRERO, Ana; STROOPER, Bart De; ARANCIBIA-CÁRCAMO, I. Lorena. Cellular senescence at the crossroads of inflammation and Alzheimer's disease. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 44, n. 9, p. 714–727, 2021.

GUSTAVSSON, Anders *et al.* Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum. **Alzheimer's & Dementia**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 658–670, 2023.

Hake, A. M.. The treatment of Alzheimer's disease: the approach from a clinical specialist in the trenches. *Seminars in Neurology*. v 22, n 1, p71-74. 2012.

HAMPEL, Harald *et al.* The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain : a journal of neurology**, [s. l.], v. 141, n. 7, 2018. Disponível em: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez27.periodicos.capes.gov.br/29850777/>. Acesso em: 29 abr. 2024.

HAMPEL, Harald *et al.* The β -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. **Biological psychiatry**, [s. l.], v. 89, n. 8, p. 745, 2021.

HASSANPOUR, Seyyed Hossein; DOROUDI, Alireza. Review of the antioxidant potential of flavonoids as a subgroup of polyphenols and partial substitute for synthetic antioxidants. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 354–376, 2023.

HSU; TURK; GROSS. **Structural distinction among inositol phosphate isomers using high-energy and low-energy collisional-activated dissociation tandem mass spectrometry with electrospray ionization - Hsu - 2003 - Journal of Mass Spectrometry - Wiley Online Library**. [S. l.], 2003. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jms.457>. Acesso em: 31 jul. 2024.

HUANG, Xi-Shan *et al.* A New Polyketide from the Mangrove Endophytic Fungus *Penicillium* sp. sk14JW2P. **Helvetica Chimica Acta**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 664–668, 2014.

HUANG *et al.* CDT2-controlled cell cycle reentry regulates the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, [s. l.], v. 15, n. 2, 2019. Disponível em: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez27.periodicos.capes.gov.br/30321504/>. Acesso em: 29 abr. 2024.

HUANG, Hao *et al.* Procyanidins Extracted from Lotus Seedpod Ameliorate Amyloid- β -Induced Toxicity in Rat Pheochromocytoma Cells. **Oxidative Medicine and**

Cellular Longevity, [s. l.], v. 2018, p. 4572893, 2018.

IADECOLA, Costantino *et al.* Impact of Hypertension on Cognitive Function. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. e67–e94, 2016.

IHARA, Ryoko *et al.* Relative neuron loss in hippocampal sclerosis of aging and Alzheimer's disease. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 84, n. 5, p. 741–753, 2018.

JACK, Clifford R. *et al.* NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 535–562, 2018.

JELLINGER, Kurt A *et al.* Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: 'ALZheimer ASSociated gene'– a new blood biomarker? **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1094–1117, 2008.

JOCHEMSEN, Hadassa M. *et al.* Arterial stiffness and progression of structural brain changes: The SMART-MR study. **Neurology**, [s. l.], v. 84, n. 5, p. 448–455, 2015.

JÖNSSON, Linus *et al.* The affordability of lecanemab, an amyloid-targeting therapy for Alzheimer's disease: an EADC-EC viewpoint. **The Lancet Regional Health - Europe**, [s. l.], v. 29, p. 100657, 2023.

KAM, A. *et al.* The Protective Effects of Natural Products on Blood-Brain Barrier Breakdown. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 1830–1845,

KAYA, Zeynep Bengisu *et al.* Optimizing SH-SY5Y cell culture: exploring the beneficial effects of an alternative media supplement on cell proliferation and viability. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 4775, 2024.

KENCHAPPA, Pratap G. *et al.* In vitro evaluation of the neuroprotective potential of Olea dioica against A β peptide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 14, p. 1139606, 2023.

KINOSHITA, Denise.. Análise temporal de mediadores inflamatórios no tecido neuronal e na periferia em camundongos 3xTg-AD, um modelo animal para a Doença de Alzheimer. 2012. Monografia (Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

KHAN, Aamir *et al.* D-Pinitol improves cognitive dysfunction and neuronal damage induced by isoproterenol via modulation of NF- κ B/BDNF/GFAP signaling in Swiss albino mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 326–334, 2024.

KHAN, Sahil; BARVE, Kalyani H.; KUMAR, Maushmi S. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 1106, 2020.

KONG, Juan; DU, Zhigang; DONG, Li. Pinitol Prevents Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Responses in BV2 Microglia Mediated by TREM2. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 96–104, 2020.

KOVALEVICH, Jane; SANTERRE, Maryline; LANGFORD, Dianne. Considerations for the Use of SH-SY5YSH-SY5Y NeuroblastomaNeuroblastoma Cells in Neurobiology. *In*: AMINI, Shohreh; WHITE, Martyn K. (org.). **Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2021. p. 9–23. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1437-2_2. Acesso em: 18 jul. 2024.

KRASEMANN, Susanne *et al.* The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases. **Immunity**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 566–581.e9, 2017.

KREMEN, William S. *et al.* Influence of young adult cognitive ability and additional education on later-life cognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 116, n. 6, p. 2021, 2019.

KRISHTAL, Jekaterina *et al.* Toxicity of Amyloid- β Peptides Varies Depending on Differentiation Route of SH-SY5Y Cells. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 879–887, 2019.

LANG, Min *et al.* An imaging review of the hippocampus and its common pathologies. **Journal of Neuroimaging**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 5–25, 2024.

LARSSON, Susanna C. *et al.* Modifiable pathways in Alzheimer's disease: Mendelian randomisation analysis. **The BMJ**, [s. l.], v. 359, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.ez27.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC5717765/>. Acesso em: 30 abr. 2024.

LEE, Dohyun *et al.* A guanidine-appended scyllo-inositol derivative AAD-66 enhances brain delivery and ameliorates Alzheimer's phenotypes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 14125, 2017.

LENG, Fangda; EDISON, Paul. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 157–172, 2021.

LI, Huimin *et al.* Oxidative stress: The nexus of obesity and cognitive dysfunction in diabetes. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 14, p. 1134025, 2023.

LINNERBAUER, Mathias; WHEELER, Michael A.; QUINTANA, Francisco J. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation. **Neuron**, [s. l.], v. 108, n. 4, p. 608–622, 2020.

LIVINGSTON, Gill *et al.* Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 396, n. 10248, p. 413, 2020.

LOPEZ, Gianluca *et al.* Characterization of cerebellar amyloid- β deposits in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, [s. l.], v. 83, n. 2, p. 72–78, 2023.

LÓPEZ-GAMBERO, Antonio J. *et al.* The Biomedical Uses of Inositols: A Nutraceutical Approach to Metabolic Dysfunction in Aging and Neurodegenerative Diseases. **Biomedicines**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 295, 2020.

MA, Hang *et al.* Effects of a Standardized Phenolic-Enriched Maple Syrup Extract on β -Amyloid Aggregation, Neuroinflammation in Microglial and Neuronal Cells, and β -Amyloid Induced Neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Neurochemical research**, [s. l.], v. 41, n. 11, p. 2836, 2016.

MA, Chen; HONG, Fenfang; YANG, Shulong. Amyloidosis in Alzheimer's Disease: Pathogeny, Etiology, and Related Therapeutic Directions. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 1210, 2022.

MAHASE, Elisabeth. FDA approves controversial Alzheimer's drug despite uncertainty over effectiveness. **BMJ**, [s. l.], v. 373, p. n1462, 2021.

MAIRUAE, Nootchanat *et al.* Oroxyllum indicum (L.) extract protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced cell injury. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 1933–1942, 2019.

MARFANY, Agustí *et al.* High blood pressure, Alzheimer disease and antihypertensive treatment. **Panminerva Medica**, [s. l.], v. 60, n. 1, 2018. Disponível em: <https://www.minervamedica.it/index2.php?show=R41Y2018N01A0008>. Acesso em: 18 jul. 2024.

MCMILLAN, Jacqueline M. *et al.* Impact of pharmacological treatment of diabetes mellitus on dementia risk: systematic review and meta-analysis. **BMJ Open Diabetes Research & Care**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2018. Disponível em: <https://www-ncbi-nlm-nih.ez27.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC6254737/>. Acesso em: 30 abr. 2024.

MEGUR *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis and Alzheimer's Disease: Neuroinflammation Is to Blame? **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2020. Disponível em: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez27.periodicos.capes.gov.br/33374235/>. Acesso em: 30 abr. 2024.

MENDIOLA-PRECOMA, J. *et al.* Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2016, p. 2589276, 2016.

MERIGHI, Stefania *et al.* Microglia and Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 21, p. 12990, 2022.

MIRAGLIA, Francesca; VECCHIO, Fabrizio; ROSSINI, Paolo Maria. Searching for signs of aging and dementia in EEG through network analysis. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 317, p. 292–300, 2017.

MIZUNO, Mirei *et al.* Inhibition of β -amyloid-induced neurotoxicity by planar analogues of procyanidin B3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 29, n. 18, p. 2659–2663, 2019.

MOHAMED YUSOF, Nur Intan Saidaah; MOHD FAUZI, Fazlin. Nature's Toolbox for Alzheimer's Disease: A Review on the Potential of Natural Products as Alzheimer's Disease Drugs. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 176, p. 105738, 2024.

MOREIRA, Luciana N. *et al.* Determination of l-(+)-bornesitol, the hypotensive

constituent of *Hancornia speciosa*, in rat plasma by LC-MS/MS and its application on a pharmacokinetic study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 132, p. 110900, 2020.

MOREIRA, Luciana N. *et al.* The Cyclitol L-(+)-Bornesitol as an Active Marker for the Cardiovascular Activity of the Brazilian Medicinal Plant *Hancornia speciosa*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 42, n. 12, p. 2076–2082, 2019.

MOU, Yi *et al.* Gut Microbiota Interact With the Brain Through Systemic Chronic Inflammation: Implications on Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Aging. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, p. 796288, 2022.

MUELLER-HARVEY, Irene. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 86, n. 13, p. 2010–2037, 2006.

MURPHY, Michael P. *et al.* Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. **Nature Metabolism**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 651–662, 2022.

MUZIO, Luca; VIOTTI, Alice; MARTINO, Gianvito. Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 15, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2021.742065/full>. Acesso em: 18 jul. 2024.

N'GO, Pacôme Kouadio *et al.* Neuroprotective effects of the *Chrysophyllum perpulchrum* extract against an Alzheimer-like rat model of β amyloid1-40 intrahippocampal injection. **Translational Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 545–560, 2021.

NGUYEN, Ngoc Minh; CHO, Jungsook; LEE, Choongho. Gut Microbiota and Alzheimer's Disease: How to Study and Apply Their Relationship. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 4047, 2023.

NORDIN, Fariza Juliana *et al.* Immunomodulatory potential of *Clinacanthus nutans* extracts in the co-culture of triple-negative breast cancer cells, MDA-MB-231, and THP-1 macrophages. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. e0256012, 2021.

NOWELL, Joseph *et al.* Antidiabetic agents as a novel treatment for Alzheimer's and Parkinson's disease. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 89, p. 101979, 2023.

OGUNMOKUN, Gilbert *et al.* The Potential Role of Cytokines and Growth Factors in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 2790, 2021.

PAP, Nora *et al.* Toxicological and bioactivity evaluation of blackcurrant press cake, sea buckthorn leaves and bark from Scots pine and Norway spruce extracts under a green integrated approach. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 153, p. 112284, 2021.

PENIDO, Alexandre Batista *et al.* Medicinal Plants from Northeastern Brazil against Alzheimer's Disease. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine :**

eCAM, [s. l.], v. 2017, p. 1753673, 2017.

PEREIRA, Ana Bárbara D. *et al.* Definition of chemical markers for *Hancornia speciosa* Gomes by chemometric analysis based on the chemical composition of extracts, their vasorelaxant effect and α -glucosidase inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 299, p. 115692, 2022.

PEREIRA, Ana Bárbara Dias *et al.* Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancornia speciosa* leaves after derivatization with p-toluenesulfonyl chloride. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 887–888, p. 133–137, 2012.

PEREIRA, Aline C. *et al.* *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 161, p. 30–35, 2015.

PŁONKA, Joanna *et al.* Analyses of Antioxidative Properties of Selected Cyclitols and Their Mixtures with Flavanones and Glutathione. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 158, 2021.

POST, Gerald G.; ANDERSON, Laurens. **Cyclitols and Their Methyl Ethers. IV. The Absolute Configurations of the myo-Inositol Monomethyl Ethers**. [S. l.], 2002. research-article. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00862a031>. Acesso em: 18 jul. 2024.

POWER, Melinda C. *et al.* Blood pressure and cognition: Factors that may account for their inconsistent association. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 10.1097/EDE.0b013e3182a7121c, 2013.

PRILLAMAN, McKenzie. Alzheimer's drug slows mental decline in trial — but is it a breakthrough? **Nature**, [s. l.], v. 610, n. 7930, p. 15–16, 2022.

REISS, Allison B. *et al.* Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. **Reviews in the Neurosciences**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 613–627, 2018.

RODRIGUES, Clenilson M. *et al.* Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid communications in mass spectrometry: RCM**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 1907–1914, 2007.

ROSS, R. A.; SPENGLER, B. A.; BIEDLER, J. L. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 741–747, 1983.

RUSH, Michael D. *et al.* Rapid Determination of Procyanidins Using MALDI-ToF/ToF Mass Spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 43, p. 11355–11361, 2018.

SABIA, Séverine *et al.* Physical activity, cognitive decline, and risk of dementia: 28 year follow-up of Whitehall II cohort study. **The BMJ**, [s. l.], v. 357, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi-nlm-nih.ez27.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC5480222/>. Acesso em: 30 abr.

2024.

SALLOWAY, Stephen *et al.* Amyloid-Related Imaging Abnormalities in 2 Phase 3 Studies Evaluating Aducanumab in Patients With Early Alzheimer Disease. **JAMA Neurology**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 1–10, 2022.

SANTISTEBAN, Monica M.; IADECOLA, Costantino; CARNEVALE, Daniela. Hypertension, Neurovascular Dysfunction, and Cognitive Impairment. **Hypertension**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 22–34, 2023.

SCHELTS, Philip *et al.* Alzheimer's disease. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 397, n. 10284, p. 1577–1590, 2021.

SERRA, C. P. *et al.* Validation of a colorimetric assay for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 424–432, 2005.

SHAL, Bushra *et al.* Anti-neuroinflammatory Potential of Natural Products in Attenuation of Alzheimer's Disease. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2018.00548/full>. Acesso em: 18 jul. 2024.

SHI, Lei *et al.* A novel thiolysis-high-performance liquid chromatography method for the determination of proanthocyanidins in grape seeds. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 45, n. 11, p. 1874–1883, 2022.

SHI, Dan *et al.* Aerobic exercise combined with chlorogenic acid exerts neuroprotective effects and reverses cognitive decline in Alzheimer's disease model mice (APP/PS1) via the SIRT1/PGC-1 α /PPAR γ signaling pathway. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 15, p. 1269952, 2023.

SHI, Chun *et al.* Protective effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against β -amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 181, n. 1, p. 115–123, 2009.

SILVA, G. C. *et al.* *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 137, n. 1, p. 709–713, 2011.

SILVA, Grazielle C. *et al.* Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 214–219, 2016.

SINGH-MANOUX, Archana *et al.* Trajectories of Depressive Symptoms Before Diagnosis of Dementia: A 28-Year Follow-up Study. **JAMA Psychiatry**, [s. l.], v. 74, n. 7, p. 712, 2017.

SKRZYPCZAK-WIERCIOCH; SAŁAT. Lipopolysaccharide-Induced Model of Neuroinflammation: Mechanisms of Action, Research Application and Future Directions for Its Use. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 27, n. 17, 2022. Disponível em: <https://pubmed-ncbi-nlm->

nih.ez27.periodicos.capes.gov.br/36080253/. Acesso em: 30 abr. 2024.

SOHN, Eunjin *et al.* Ficus erecta Thunb. Leaves Ameliorate Cognitive Deficit and Neuronal Damage in a Mouse Model of Amyloid- β -Induced Alzheimer's Disease. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 12, p. 607403, 2021.

SORIA LOPEZ, Jose A.; GONZÁLEZ, Hector M.; LÉGER, Gabriel C. Chapter 13 - Alzheimer's disease. *In*: DEKOSKY, Steven T.; ASTHANA, Sanjay (org.). **Handbook of Clinical Neurology**. [S. l.]: Elsevier, 2019. (Geriatric Neurology). v. 167, p. 231–255. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128047668000133>. Acesso em: 18 jul. 2024.

SRIVASTAVA; DUBEY, Anubhav. D-Pinitol -A Natural Phytomolecule and its Pharmacological effect. [s. l.], v. 11, p. 6609–6623, 2020.

STEFANESCU, Raluca *et al.* Secondary Metabolites from Plants Possessing Inhibitory Properties against Beta-Amyloid Aggregation as Revealed by Thioflavin-T Assay and Correlations with Investigations on Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 870, 2020.

STELZMANN, Rainulf A.; NORMAN SCHNITZLEIN, H.; REED MURTAGH, F. An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde". **Clinical Anatomy**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 429–431, 1995.

TAN, Edwin C.K. *et al.* Antihypertensive Medication Regimen Intensity and Incident Dementia in an Older Population. **Journal of the American Medical Directors Association**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 577–583, 2018.

TARAWNEH, Rawan; PENHOS, Elena. The gut microbiome and Alzheimer's disease: Complex and bidirectional interactions. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, [s. l.], v. 141, p. 104814, 2022.

TELES-GRILLO RUIVO, Leonor M.; MELLOR, Jack R. Cholinergic modulation of hippocampal network function. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, [s. l.], v. 5, p. 2, 2013.

TERRA, X. *et al.* Procyanidin dimer B1 and trimer C1 impair inflammatory response signalling in human monocytes. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 611–619, 2011.

TODA, Toshihiko *et al.* Apple Procyanidins Suppress Amyloid β -Protein Aggregation. **Biochemistry Research International**, [s. l.], v. 2011, p. 784698, 2011.

TOLEDANO-DÍAZ, Adolfo; ÁLVAREZ, M Isabel; TOLEDANO, Adolfo. The relationships between neuroglial alterations and neuronal changes in Alzheimer's disease, and the related controversies I: Gliopathogenesis and glioprotection. **Journal of Central Nervous System Disease**, [s. l.], v. 14, p. 11795735221128703, 2022.

TOMAZI, Rosana *et al.* Hypoglycemic Activity of Aqueous Extract of Latex from Hancornia speciosa Gomes: A Study in Zebrafish and In Silico. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1, 2022.

l.], v. 14, n. 9, p. 856, 2021.

TORIKA, Nofar *et al.* Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors Ameliorate Brain Inflammation Associated with Microglial Activation: Possible Implications for Alzheimer's Disease. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, [s. *l.*], v. 11, n. 4, p. 774–785, 2016.

TORRES-RÊGO, Manoela *et al.* Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s. *l.*], v. 16, p. 275, 2016.

UKMAR-GODEC, Wegmann; M, Zweckstetter. Biomolecular condensation of the microtubule-associated protein tau. **Seminars in cell & developmental biology**, [s. *l.*], v. 99, 2020. Disponível em: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez27.periodicos.capes.gov.br/31260737/>. Acesso em: 29 abr. 2024.

VAN NIEUWKERK, Astrid C. *et al.* Cognitive Impairment in Patients With Cardiac Disease: Implications for Clinical Practice. **Stroke**, [s. *l.*], v. 54, n. 8, p. 2181–2191, 2023.

VAZ, Miguel; SILVESTRE, Samuel. Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. **European Journal of Pharmacology**, [s. *l.*], v. 887, p. 173554, 2020.

WALSH, Sebastian *et al.* Aducanumab for Alzheimer's disease? **The BMJ**, [s. *l.*], v. 374, p. n1682, 2021.

WANG, Jun *et al.* Brain-Targeted Proanthocyanidin Metabolites for Alzheimer's Disease Treatment. **The Journal of Neuroscience**, [s. *l.*], v. 32, n. 15, p. 5144–5150, 2012.

WANG, Pengwen *et al.* Curcumin regulates insulin pathways and glucose metabolism in the brains of APPswe/PS1dE9 mice. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, [s. *l.*], v. 30, n. 1, p. 25–43, 2017.

WANG, Yixuan *et al.* Hypoglycemic medicines in the treatment of Alzheimer's disease: Pathophysiological links between AD and glucose metabolism. **Frontiers in Pharmacology**, [s. *l.*], v. 14, p. 1138499, 2023.

WANG, Ziping *et al.* Procyanidins Extracted from the Lotus Seedpod Ameliorate Cognitive Impairment through CREB-BDNF Pathway Mediated LTP in APP/PS1 Transgenic Mice. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. *l.*], v. 24, n. 12, p. 1560–1567, 2023.

WANG; QUINN. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. **Progress in Lipid Research**, [s. *l.*], v. 49, n. 2, p. 97–107, 2010.

XIE, Junbo *et al.* Rapid identification and determination of 11 polyphenols in *Herba lycopi* by HPLC–MS/MS with multiple reactions monitoring mode (MRM). **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. *l.*], v. 24, n. 7, p. 1069–1072, 2011.

XIE, Junhua; VAN HOECKE, Lien; VANDENBROUCKE, Roosmarijn E. The Impact

of Systemic Inflammation on Alzheimer's Disease Pathology. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, p. 796867, 2022.

XU, Jufei *et al.* Procyanidine resists the fibril formation of human islet amyloid polypeptide. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 183, p. 1067–1078, 2021.

YANG, Lingyu *et al.* Proanthocyanidins against Oxidative Stress: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2018, p. 8584136, 2018.

YANG, Alex J. T.; BAGIT, Ahmed; MACPHERSON, Rebecca E. K. Resveratrol, Metabolic Dysregulation, and Alzheimer's Disease: Considerations for Neurodegenerative Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 4628, 2021.

YIN, Fei *et al.* Baicalin prevents the production of hydrogen peroxide and oxidative stress induced by A β aggregation in SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 492, n. 2, p. 76–79, 2011.

YU, Haibo *et al.* Protective and anti-oxidative effects of curcumin and resveratrol on A β -oligomer-induced damage in the SH-SY5Y cell line. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 441, p. 120356, 2022.

YU, Yan *et al.* Xylocoside G Reduces Amyloid- β Induced Neurotoxicity by Inhibiting NF- κ B Signaling Pathway in Neuronal Cells. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 263–275, 2012.

ZAKARIA, R. *et al.* Lipopolysaccharide-Induced Memory Impairment in Rats: a Model of Alzheimer's Disease. **Physiological Research**, [s. l.], p. 553–565, 2017.

ZHANG, Ming *et al.* The influence of Schisandrin B on a model of Alzheimer's disease using β -amyloid protein A β 1-42-mediated damage in SH-SY5Y neuronal cell line and underlying mechanisms. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, [s. l.], v. 80, n. 22, p. 1199–1205, 2017.

ZHAO, Siqi *et al.* Procyanidins and Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 8, p. 5556–5567, 2019.

ZU, Guoxiu *et al.* Mechanism of quercetin therapeutic targets for Alzheimer disease and type 2 diabetes mellitus. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, p. 22959, 2021.