

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

WELLERSON DE OLIVEIRA CARNEIRO JUNIOR

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DE
***Hancornia speciosa* GOMES EM MODELO MURINO DE DOENÇA DE**
ALZHEIMER

BELO HORIZONTE

2020

WELLERSON DE OLIVEIRA CARNEIRO JUNIOR

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DE
Hancornia speciosa GOMES EM MODELO MURINO DE DOENÇA DE
ALZHEIMER**

Dissertação 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 Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana, FAFAR, UFMG.

Co-orientadores: Prof. Dr. Fernão Castro Braga, FAFAR, UFMG.

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

BELO HORIZONTE

2020

Carneiro Junior, Wellerson de Oliveira.

C289a Avaliação fitoquímica e do potencial neuroprotetor de *Hancornia speciosa* Gomes em modelo murino de Doença de Alzheimer / Wellerson de Oliveira Carneiro Junior. – 2020.
104 f. : il.
Orientadora: Priscilla Rodrigues Valadares Campana.
Coorientadores: Fernão Castro Braga e Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira.

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

1. Alzheimer, Doença de – Teses. 2. *Hancornia speciosa* – Teses. 3. Apocynaceae – Teses. 4. Mangaba – Teses. 5. Proantocianidinas – Teses. 6. Polifenóis – Teses. 7. Testes comportamentais – Teses.
I. Campana, Priscilla Rodrigues Valadares. II. Braga, Fernão Castro. III. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 616.831

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



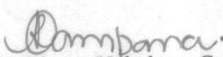
FOLHA DE APROVAÇÃO

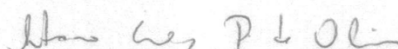
Avaliação fitoquímica e do potencial neuroprotetor de Hancornia speciosa em modelo murino de doença de alzheimer

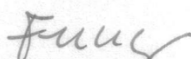
WELLERSON DE OLIVEIRA CARNEIRO JÚNIOR

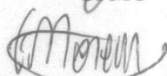
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.


Aprovada em 06 de março de 2020, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Priscilla Rodrigues Valadares Campana - Orientadora
UFMG


Prof. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira - Coorientador
UFMG


Prof. Fernão Castro Braga - Coorientador
UFMG


Prof. Fabrício de Araújo Moreira
UFMG


Dra. Betânia Barros Cota
Centro de Pesquisas René Rachou

Belo Horizonte, 6 de março de 2020.

À mulher que me ensinou a ser homem!

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!

À minha orientadora Professora Priscilla Campana, pela confiança em mim depositada. Agradeço 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. Este trabalho só foi possível devido ao seu apoio desde o início. Obrigado por tudo, Priscilla!

Agradeço ao meu co-orientador Professor Fernão Braga, pela inestimável orientação, confiança, conselhos, paciência, compreensão e ensinamentos. Meu espelho profissional e exemplo de ser humano.

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 dissertação. Meu exemplo de pesquisador e de ser humano.

À Raquel pelo apoio técnico, por me contestar e me mostrar outros pontos de vista. Te admiro como mulher, amiga e profissional.

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

À Nayara pela ajuda na realização deste trabalho e pelas ótimas conversas.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica: Luciana, José Hugo, Diego, Alisson, Rosângela, Marina Rocha, Maria Fernanda, Lyandra, Juliana Raposo, Prof.

Alaíde e Isabela, pelas valiosas contribuições, pela amizade e por proporcionarem momentos tão agradáveis.

Às minhas queridas amigas do Laboratório de Farmacognosia: Gabriela, Maria Beatriz, Alessandra, Karla e Ana, pela amizade e momentos de descontração. Vocês são muito queridas e especiais, tenho um enorme carinho por vocês.

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.

*“Só quem driblou a morte pela morte
saca que nunca foi sorte, sempre foi
ÈSÙ”.*

Emicida.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência e se manifesta através de sinais como perda da memória, desorientação espacial, perda progressiva da função cognitiva e decréscimo intelectual. A senescência e a senilidade são os principais fatores de risco para o desenvolvimento e progressão da DA. Além disso, estudos epidemiológicos têm demonstrado que a hipertensão é um fator de risco para demências, existindo fortes evidências clínicas de que o uso de medicamentos anti-hipertensivos por idosos pode estar associado a uma menor incidência de demências e a um retardo no declínio cognitivo e redução da neuroinflamação. Nos últimos anos, nosso grupo tem demonstrado o potencial efeito anti-hipertensivo de diversas plantas do cerrado brasileiro, dentre as quais têm se destacado a *Hancornia speciosa*, popularmente conhecida como mangabeira. Neste intuito, camundongos C57Bl/6 machos, com idade entre 10 e 12 semanas, foram tratados por 7 dias, *per os*, com o extrato acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa*, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, sendo então submetidos à Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO). Nossos resultados demonstraram que os extratos não induziram alterações cognitivas nos animais avaliados. Em sequência, realizou-se a cirurgia estereotáxica para injeção intra-hipocampal de A β ₁₋₄₂ ou PBS e os animais foram tratados com o mesmo extrato, nas mesmas doses, por 7 dias. Nossos resultados demonstraram que o extrato acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa*, administrado *per os*, nas doses de 30 e 100 mg/kg foi capaz de reverter o dano cognitivo induzido por A β ₁₋₄₂. Esse extrato foi submetido ao estudo fitoquímico e análises preliminares indicaram a presença de metabólitos secundários pertencentes à diversas classes, principalmente polifenóis, como a rutina e as proantocianidinas. A quantificação de proantocianidinas por espectrometria UV/VIS revelou um teor de aproximadamente 4,5 % m/m dessas substâncias no extrato produzido. Esse extrato foi então fracionado por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 e as frações obtidas foram reunidas por CCD em 3 grupos frações enriquecidas em proantocianidinas. A fração TS2C3 apresentou menor complexidade química e massa suficiente para que se prosseguissem os estudos e a caracterização de seus constituintes. Os picos majoritários foram identificados por UPLC-ESI-MS-MS como sendo hexosídeos de proantocianidinas diméricas (picos 1 (Tr = 2,84 min); 2 (Tr = 3,01 min); 3 (Tr = 3,21 min); 4 (Tr = 3,30 min)), com massa molar de 740 g/mol, e triméricas (picos 6 (Tr = 3,53 min) e 7 (Tr = 3,64 min)), com massa molar de 1028 g/mol. Estudos adicionais serão realizados para definir a identidade química das substâncias majoritárias desta fração e para avaliar seu potencial neuroprotetor em modelo de DA. Também serão avaliadas as alterações histopatológicas pós-tratamento com o extrato e com a fração. Nossos resultados demonstraram que o extrato acetona:água (70:30) de *H. speciosa* foi capaz de reverter o dano cognitivo causado por A β ₁₋₄₂.

Palavras-chave: doença de Alzheimer, *Hancornia speciosa*, proantocianidinas, testes comportamentais.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and manifests itself through signs such as memory loss, spatial disorientation, progressive loss of cognitive function and intellectual impairment. Senescence and senility are the main risk factors for the development and progression of AD. In addition, epidemiological studies have shown that hypertension is a risk factor for dementias, and strong clinical evidence that the use of antihypertensive drugs by the elderly may be associated with a lower incidence of dementias and a delay in cognitive decline and reduced neuroinflammation. In recent years, our group has demonstrated the potential antihypertensive effect of several plants in the Brazilian Savana like bioma (Cerrado), among which, *Hancornia speciosa*, popularly known as "mangabeira", has stood out. For this purpose, male C57 Bl/6 mice, aged between 10 and 12 weeks, were treated for 7 days with acetone:water extract (70:30) from *H. speciosa* leaves, in doses of 10, 30 and 100 mg/kg, then being submitted to the Object Recognition Task (ORT). Our results showed that the extracts did not induce cognitive changes in animals tested in ORT. In sequence, different animals were submitted to stereotactic surgery for intra-hippocampal injection of A β ₁₋₄₂ or PBS and were treated with the same extract and doses, for 7 days. Our results showed that the extract, administered *per os*, at doses of 30 and 100 mg/kg was able to reverse the cognitive damage induced by A β ₁₋₄₂. Then, the aforementioned extract was submitted to the phytochemical study. Preliminary analyzes showed the presence of several secondary metabolites, mainly polyphenolics, such as rutin and proanthocyanidins. The quantification of proanthocyanidins by UV/VIS spectrometry demonstrated a content of ca. 4,5% w/w of these metabolites. The extract was then fractionated by Sephadex LH-20 chromatography column and the fractions obtained were combined by TLC into 3 groups of fractions enriched in proanthocyanidins. The TS2C3 fraction showed less chemical complexity and sufficient amount for further studies and the characterization of its constituents. Major peaks were identified by UPLC-ESI-MS-MS as being dimeric proanthocyanidin hexosides (peaks 1 (Tr = 2.84 min); 2 (Tr = 3.01 min); 3 (Tr = 3.21 min) ; 4 (Tr = 3.30 min)), with molar weight of 740 g/mol, as well as trimeric derivatives (peaks 6 (Tr = 3.53 min) and 7 (Tr = 3.64 min)), with molar weight of 1028 g/mol. Further studies will still be carried out to define the chemical identity of the major constituents of this fraction as well as its neuroprotective potential in an AD model. The histopathological findings after treatment with the extract and the fraction will be also evaluated. Our results shows that the acetone:water extract (70:30) from *H. speciosa* revert the cognitive deficit induced by A β ₁₋₄₂.

Keywords: Alzheimer's diseases, *Hancornia speciosa*, proanthocyanidins, behavioral tests.

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, porém também há a 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: Esquema representando a falha neuronal mediada por oligômeros A β . Oligômeros A β , por meio de processos como a peroxidação lipídica, ativa o receptor NMDAr 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).....	24
Figura 3.3: Fruto, flores e folhas de <i>H. speciosa</i> (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO in Flora Brasil 2020 em construção)	35
Figura 4.1: Posição anatômica da junção de suturas bregma. (adaptado de ALLAHYARI et al., 2015)	55
Figura 4.2: Região da injeção intra-hipocampal, segundo o atlas Paxinos. Fonte: The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Paxinos e Franklin, 2001).....	56
Figura 5.1. Perfil cromatográfico obtido por HPLC-FR para o extrato em acetona:água (70:30) de folhas de <i>H. speciosa</i>	61
Figura 5.2: Curva de concentração-resposta da determinação da absorvância no UV/VIS de solução padrão de cloreto de cianidina.....	62
Figura 5.3: Representação esquemática do fracionamento do extrato em acetona:água (70:30) de folhas de <i>H. speciosa</i> , visando a obtenção de frações enriquecidas em proantocianidinas	64

Figura 5.4: Cromatograma obtido por CCD de sílica gel para as frações TS1C3, TS2C3 e TS5C3. Condições cromatográficas: eluente n-butanol / ácido acético / água (40:10:50); revelador: vanilina sulfúrica, seguido de aquecimento	65
Figura 5.5: Cromatogramas obtidos por HPLC-FR para as frações (a) TS1C, (b) TS2C3 e (c) TS5C3	66
Figura 5.6: Cromatograma obtidos por HPLC-DAD para a fração EtOAc, obtida a partir do fracionamento do extrato acetona:água de <i>H. speciosa</i> por partição entre solventes imiscíveis	67
Figura 5.7: Cromatograma obtidos por HPLC-FR para a fração TSN2.....	68
Figura 5.8 Cromatogramas obtidos por UPLC-FR para a fração TS2C3.....	69
Figura 5.9 Espectro no UV e espectro de massas no modo negativo de ionização para os picos 1 (Tr = 2,84 min), 2 (Tr = 3.01 min), 3 (Tr = 3,21 min) e 4 (Tr = 3,30 min).....	71
Figura 5.10:. Espectro de massas para os íons filhos de 739 m/z [M-H] ⁻ dos picos 1 (Tr = 2,84 min), 2 (Tr = 3.01 min), 3 (Tr = 3,21 min) e 4 (Tr = 3,30 min).....	73
Figura 5.11: Espectro de massas no modo negativo de ionização para os picos 6 (Tr = 3,53 min) e 7 (Tr = 3,64 min)	74
Figura 5.12: Espectro de massas para os íons filhos de 1027 m/z [M-H] ⁻ dos picos (a) 6 (Tr = 3,53 min) e (b) 7 (Tr = 3,64 min)	75
Figura 5.13: Propostas de fragmentação e prováveis estruturas dos íons obtidos pela espectrometria de massas sequencial.....	76
Figura 5.14: Percentual de reconhecimento do objeto novo na TRO por camundongos tratados com extrato acetona:água (70:30) de folhas de <i>H. speciosa</i> (HPF1).....	79
Figura 5.15: Efeito do extrato de folhas de <i>H. speciosa</i> sobre a cognição de camundongos em modelo murino de DA, avaliado por meio da tarefa de reconhecimento de objetos.....	81

Figura 5.16: Efeito do extrato de folhas de *H. speciosa* sobre a cognição de camundongos em modelo murino de DA, avaliado por meio do paradigma do medo condicionado ao contexto..... **84**

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 4.1: Rendimento das frações obtidas por partição do extrato em acetona:água (70:30) de <i>H. speciosa</i> entre solventes imiscíveis	48
Tabela 4.2: Primeiro fracionamento do extrato em acetona:água (70:30) de <i>H. speciosa</i> em coluna de Sephadex LH20	49
Tabela 4.3: Segundo fracionamento do extrato em acetona:água (70:30) de <i>H. speciosa</i> em coluna de Sephadex LH20	49
Tabela 4.4: Terceiro fracionamento do extrato em acetona:água (70:30) de <i>H. speciosa</i> em coluna de Sephadex LH20.....	50
Tabela 4.5: Quarto fracionamento do extrato em acetona:água (70:30) de <i>H. speciosa</i> em coluna de Sephadex LH20.....	50
Tabela 4.6: Primeiro fracionamento em coluna de Sephadex LH20 da fração EtOAc, oriunda da partição do extrato em acetona:água de <i>H. speciosa</i> entre solventes imiscíveis.....	51
Tabela 4.7: Segundo fracionamento em coluna de Sephadex LH20 da fração EtOAc, oriunda da partição do extrato em acetona:água de <i>H. speciosa</i> entre solventes imiscíveis.....	51
Quadro 4.1: Gradiente de eluição empregado para obtenção dos perfis cromatográficos por UPLC-MS.....	53
Tabela 5.1: Teor de proantocianidinas no extrato acetona:água de folhas de <i>H. speciosa</i>	63
Tabela 5.2: Dados obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS para proantocianidinas da fração TS2C3 do extrato acetona:água (70:40) de folhas de <i>H. speciosa</i>	70

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
A β	β -amiloide
A β ₁₋₄₂	peptídeo com 42 aminoácidos
BACE1	Beta-secretase 1
BHE	barreira hematoencefálica
BuChE	butirilcolinesterase
CCD	cromatografia em camada delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CK	creatinina quinase
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 Drugs Administration</i> (Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos da América)
FR	fase reversa
g	grama
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ	interferon- γ
IL-1	interleucina 1
ip	Intraperitoneal
kg	quilograma
LL	lâtero-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	moléculas associadas à neurodegeneração
NFT	emaranhados neurofibrilares
NF- κ B	fator de transcrição nuclear kapa B
NMDA	(receptor) N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
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- α	fator de necrose tumoral- α
TRO	Tarefa de Reconhecimento de Objetos
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPLC	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

a. Donepezila.....	31
b. Rivastigmina	31
c. galantamina.....	31
1. Rutina.....	36
2. Bornesitol.....	36
3. Ácido quínico.....	36
4. Ácido clorogênico.....	36
5. Ácido gálico.....	38
6. Ácido siríngio.....	38
7. 2,7-diidroxixantona.....	38
8. <i>trans</i> -linalol.....	38
9. <i>cis</i> -linalol.....	38
10. Eugenol.....	38
11. Lupeol.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	21
3.2 Hipertensão como um fator de risco para DA.....	27
3.3 Modelos animais para o estudo da Doença de Alzheimer.....	29
3.4 Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer.....	30
3.5 Perspectivas de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DA.....	32
3.7 <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	34
3.8 Produtos naturais polifenólicos e atividade neuroprotetora.....	40
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	43
4.1 Equipamentos.....	43
4.2 Solventes e reagentes.....	44
4.3 Vidrarias e materiais diversos.....	45
4.4 Reveladores para Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	46
4.5 Material vegetal.....	46
4.6 Preparo do extrato acetona:água (70:30 v/v) de folhas de <i>H. speciosa</i>	46
4.7 Obtenção de perfis cromatográficos por CCD e HPLC-FR do extrato em acetona:água de <i>H. speciosa</i>	47
4.8 Quantificação de proantocianidinas por espectroscopia no UV/VIS.....	47
4.9.1 Partição entre solventes imiscíveis.....	49
4.9.2 Fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH-20.....	49
4.10 Análises por UPLC-ESI-MS.....	53

4.11	Ensaio de atividade neuroprotetora <i>in vivo</i>	54
4.11.1	Animais.....	54
4.11.2	Protocolo experimental.....	55
4.11.3	Preparo e ativação das alíquotas de A β ₁₋₄₂	55
4.11.4	Cirurgia estereotáxica e injeção intra-hipocampal de A β ₁₋₄₂	56
4.11.5	Avaliação da memória.....	57
4.11.5.1	Avaliação da capacidade cognitiva através da Tarefa de Reconhecimento de Objetos - TRO.....	58
4.11.5.2	Medo condicionado ao contexto.....	59
4.12	Análise estatística.....	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
5.1	Caracterização química do extrato de <i>H. speciosa</i>	62
5.2	Quantificação de proantocianidinas no extrato acetona:água (70:30) de folhas de <i>H. speciosa</i> por espectroscopia no UV/VIS.....	63
5.3	Fracionamento de HPF1 e obtenção de frações enriquecidas em proantocianidinas.....	65
5.4	Caracterização química da fração TS2C3.....	70
5.3	Avaliação do efeito do extrato de <i>H. speciosa</i> na função cognitiva de camundongos.....	82
5.4	Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato de <i>H. speciosa</i> em modelo murino de doença de Alzheimer na TRO.....	84
5.5	Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato acetona:água (70:30) de folhas de <i>H. speciosa</i> em modelo murino de doença de Alzheimer – MCC..	86
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é um processo neurodegenerativo progressivo, irreversível com a terapêutica atualmente disponível, relacionado principalmente à senescência e à senilidade (SERENIKI e VITAL, 2008).

Segundo dados do *Alzheimer's Disease International* (2016), mais de 47 milhões de pessoas vivem na atualidade com algum tipo de demência em todo o mundo, podendo chegar a 75 milhões em 2030 (OMS, 2013). Demências, como a DA, estão entre os principais fatores que contribuem para incapacidade, dependência e mortalidade em idosos. Além dos aspectos sociais e dos impactos gerados na vida do paciente, de seus familiares e das pessoas no seu círculo social, a DA implica em custos elevados no cuidado dos pacientes, estimados em cerca de 612 bilhões de dólares anuais, em todo o mundo. Estes custos referem-se aos gastos com medicamentos, cuidadores e médicos, bem como aqueles decorrentes do afastamento dos portadores de DA do mercado de trabalho (APRAHAMIAN et al., 2011; RONDÓN & VIZCAYA, 2014;).

Estudos epidemiológicos demonstraram que a hipertensão é um fator de risco para demências, como a DA, existindo fortes evidências de seus efeitos deletérios à função cognitiva. Além disso, evidências clínicas indicam que o uso de medicamentos anti-hipertensivos por idosos pode estar associado a uma menor incidência de demências. Diversas classes de anti-hipertensivos apresentam efeitos benéficos na prevenção da DA em estágios iniciais. Acredita-se que o uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) seja benéfico para retardar o declínio cognitivo na DA (ZHUANG et al., 2016; RYGIEL, 2016; TORIKA et al., 2016; TAN et al., 2017; MARFANY et al., 2018).

As evidências clínicas e epidemiológicas existentes indicam a importância de se avaliar o efeito de substâncias com atividade anti-hipertensiva em modelos de DA. Uma fonte promissora de substâncias anti-hipertensivas são produtos naturais de plantas, incluindo inibidores da ECA, alguns dos quais também apresentam efeitos anti-inflamatórios. Dentre as plantas da flora brasileira destaca-se a *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).

Não existem estudos sobre os efeitos de extratos de *H. speciosa*, 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 de extratos vegetais supracitados e de seus constituintes em modelos experimentais de DA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito neuroprotetor do extrato de *Hancornia speciosa* Gomes em modelo murino de doença de Alzheimer (DA) e realizar seu estudo fitoquímico.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir o extrato acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa*
- Avaliar se o tratamento com o extrato produzido acima induz alterações comportamentais em camundongos C57BL/6.
- Avaliar o efeito do extrato supracitado sobre alterações induzidas por peptídeo β -amiloide e sobre a progressão das alterações patológicas em modelo murino de Doença de Alzheimer.
- Quantificar o teor de proantocianidinas no extrato acetona água (70:30) de folhas de *H. speciosa*.
- Realizar o fracionamento do extrato visando obter frações enriquecidas em proantocianidinas.
- Realizar a caracterização química das frações ricas em proantocianidinas por UPLC-ESI-MS.

3. REVISÃO DA 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. Durante a autópsia da paciente, o médico observou uma redução do volume cerebral e a presença de depósitos anormais extracelulares (ALZHEIMER, 1907; BELLOZI, 2014).

A DA é uma doença neurodegenerativa associada a um 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 presente 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 (XU *et al.*, 2015; DUBOISA *et al.*, 2016; O'BRYANT *et al.*, 2017).

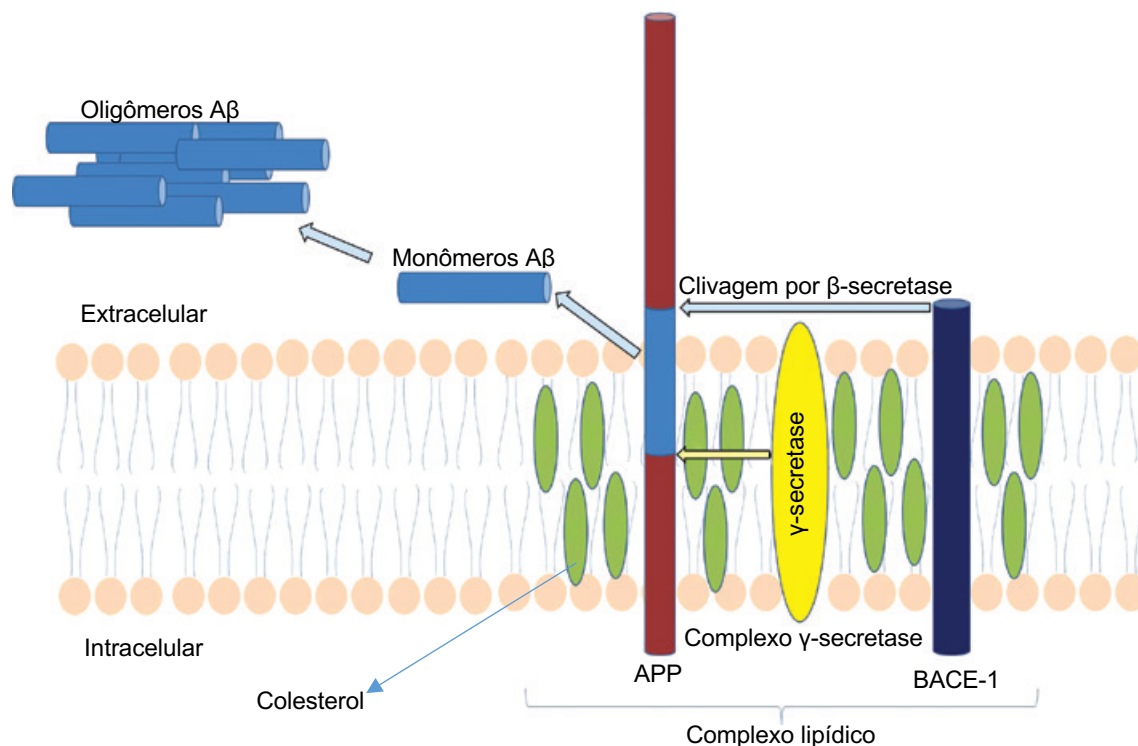
O início da DA é condizente com o surgimento de agregados de proteína β -amiloide extracelulares, também chamados de placas senis, e de emaranhados neurofibrilares (NFT) intraneuroniais de proteína tau hiperfosforilada, além de morte progressiva de neurônios, principalmente de neurônios colinérgicos, acompanhado de neuroinflamação com evidente microgliose e astrocitose, assim como destruição dos mecanismos de comunicação neuronal e evidente atrofia hipocampal e encefálica (ČOLOVIĆ *et al.*, 2013; O'NEILL, 2013; HORVATH *et al.*, 2015; TARASOFF-CONWAY *et al.*, 2015; 2017; IHARA *et al.*, 2018).

Duas principais hipóteses tentam explicar a etiologia da DA relacionando-a às proteínas β -amiloide ($A\beta$) e tau. De acordo com a proposta da cascata

amiloidal, a neurodegeneração pode ser iniciada pela clivagem proteolítica da proteína precursora de amiloide (APP), resultando na produção, agregação e deposição do peptídeo A β e de placas difusas e neuríticas. A clivagem não amiloidogênica da APP é realizada pelas α - e γ -secretases, enquanto os peptídeos β -amiloides que formam as placas senis são resultantes da hidrólise da APP por β - e γ -secretases, formando polipeptídeos. Estes são constituídos por 40 a 42 aminoácidos, os quais são tóxicos, sendo o A β_{1-42} o que apresenta maior capacidade de formar emaranhados e efeito neurotóxico. É importante ressaltar que ambos os processos ocorrem em condições homeostáticas. No entanto, por algum motivo, em paciente 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 N-metil-D-aspartato (NMDA), aumentando o influxo deste íon, podendo levar à desestabilização e desgaste de membranas. Devido sua toxicidade, esses polipeptídeos iniciam um processo inflamatório, com ativação de células da glia, lesando as células, as quais morrem na sequência. Este processo de morte celular é exacerbado pelo aumento intra- e extracelular de radicais de oxigênio e nitrogênio, promovendo neurodegeneração importante. Além disso, os radicais livres possuem ação sobre o DNA, podendo causar modificações que contribuem para o avanço e aparecimento da doença e seus sinais e sintomas (ROBINSON et al., 2013; GUNN *et al.*, 2016).

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} , porém também há a 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

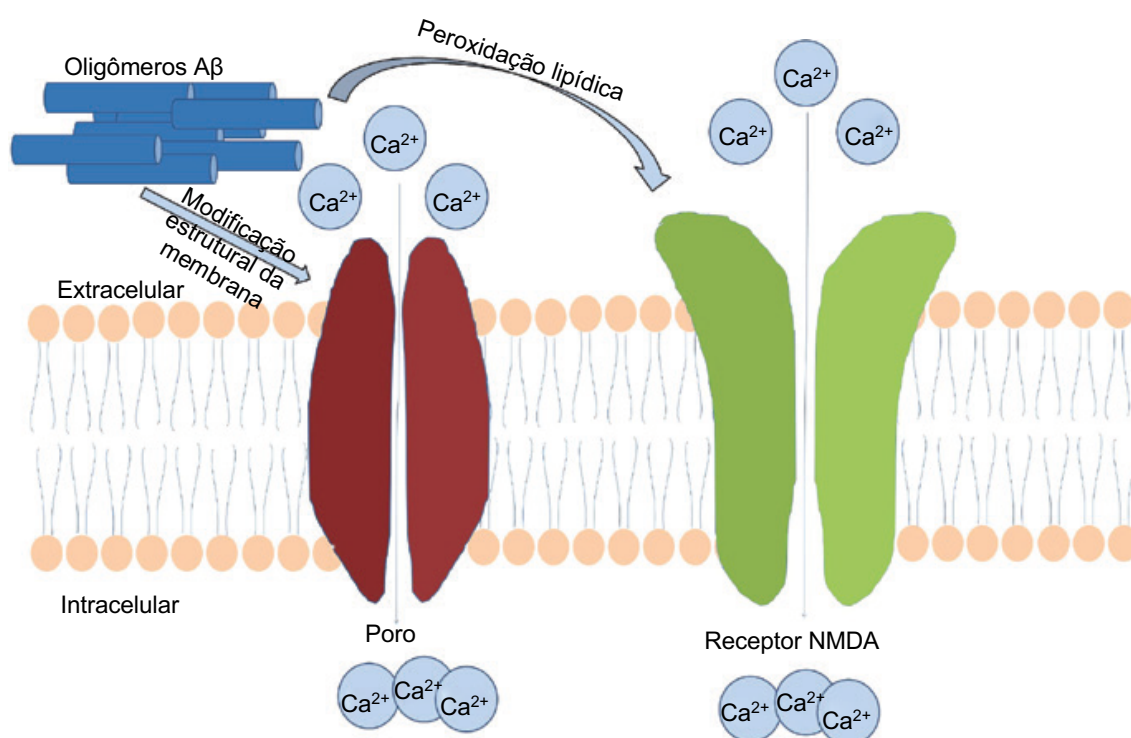
lipídico, região da bicamada lipídica que contém marcadores distintos, rica em colesterol, esfingolípídeos e glicolípídeos (adaptado de Reiss *et al.*, 2018).



Um mecanismo de toxicidade da Aβ comumente reconhecido é que seus peptídeos são capazes de causar ruptura da homeostase iônica ao levar a um aumento do influxo de íons Ca^{2+} , com consequente aumento de sua concentração intracitoplasmática. Como neurônios saudáveis necessitam de um grande gradiente de concentração iônica entre os espaços extra e intracitoplasmáticos, a perda desta diferença de concentração leva a depleção dos estoques de transmissores vesiculares. A hipótese que tenta explicar como este mecanismo ocorre relata que o influxo de Ca^{2+} pode resultar da formação de uma estrutura oca na membrana composta por pequenos oligômeros anulares de Aβ, com interior hidrofílico e exterior hidrofóbico. Estas estruturas fixam-se junto à membrana, originando um “vão” na bicamada, que resulta na criação de um poro que funciona como canal de Ca^{2+} . Já foi demonstrado, através de imagens geradas por microscopia de força atômica de alta resolução, o aparecimento de estruturas morfologicamente semelhantes a poros formadas por peptídeos Aβ incorporados à bicamada lipídica. Este achado foi posteriormente suportado por observações 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 ROS e levando à apoptose neuronal (**figura 3.2**) (PARODI *et al.*, 2010; JANG *et al.*, 2010; FERNÁNDEZ-MORALES *et al.*, 2012; LAZZARI *et al.*, 2015; REISS *et al.*, 2018).

Figura 3.2: Esquema representando a falha neuronal mediada por oligômeros $\text{A}\beta$. Oligômeros $\text{A}\beta$, por meio de processos como a 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).



Outra teoria que busca explicar como se instala esse processo neurodegenerativo é a teoria da formação dos emaranhados neurofibrilares de proteína tau (NFT). A tau é uma proteína axonal que se liga a microtúbulos, promovendo a união e estabilização destes, afetando sua dinâmica.

Desempenha um importante papel no crescimento dos processos neuronais e no desenvolvimento da polaridade neuronal. Em adultos, existem seis isoformas da proteína tau, sendo que esta proteína possui mais de 30 sítios de fosforilação. A fosforilação da proteína tau é determinada principalmente por um balanço entre a ativação de várias proteínas quinases e fosfatases; a quebra desse equilíbrio resulta na fosforilação anormal da tau, que é observado na DA. Cada sítio 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 o transporte axonal e comprometendo a função neuronal e sináptica. A hiperfosforilação da proteína tau não apenas resulta na perda de sua função biológica, como também promove sua polimerização e acúmulo na forma de filamentos helicoidais pareados, formando estrutura filamentosas descritas como filamentos neurofibrilares (NFT) intracitoplasmáticos, que são tóxicos e causam neurodegeneração (MOKHTAR et al., 2013; LIU *et al.*, 2015).

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, neurotransmissores e aumento da concentração de íons cálcio intracitoplasmáticos, além de comprometimento no ciclo celular normal. O principal sistema neurotransmissor acometido é o sistema colinérgico, gerando consequências evidentes, uma vez que a acetilcolina possui importante papel no aprendizado, atenção e plasticidade sináptica (QUERFUTH E LAFERLA, 2010).

Uma importante característica da doença de Alzheimer é a neuroinflamação. Este processo pode ser desencadeado por diferentes eventos que ocorrem em doenças neurodegenerativas, ocorrendo ao mesmo tempo em que aparecem modificações na estrutura encefálica e na plasticidade sináptica, levando à consequente neurodegeneração. A presença de uma resposta neuroinflamatória é considerada indicativa de uma sequência não específica de morte neuronal em doenças neurodegenerativas. No entanto, evidências emergentes sugerem que a inflamação não apenas é um contribuinte crucial nos mecanismos de morte neuronal, mas também um fator chave no controle da

interação entre o sistema imune e o sistema nervoso central (SNC) (RUIVO et al., 2013)

Na DA, a resposta imune-inflamatória 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, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e interferon- γ (IFN- γ), as quais são neurotóxicas e estimulam a formação de β -amiloide. (DESPLASTS, 2019).

Recentemente, análises de RNA de células-únicas de células imunes do SNC em várias doenças neurodegenerativas revelaram micróglia associada a patologias (MAP), um subtipo de micróglia que demonstra uma assinatura transcricional e funcional única. MAP são associadas com risco genético à DA, incluindo a ativação de receptores expressos em células mieloides do tipo 2. Micróglia podem induzir respostas inflamatórias contra moléculas associadas 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) (MICHELL-ROBINSON *et al.*, 2015).

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, 2011), cerca de 7,6% 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 cada mil habitantes, 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 (GILLIS *et al.*, 2019).

A demência, principalmente a doença de Alzheimer, juntamente com doenças cardiovasculares, depressão e artrites, são a principal causa de incapacidade em idosos. Em países desenvolvidos, a demência acomete de 5 a 8% da população com idade em torno dos 65 anos, chegando a atingir 50% dos idosos com mais de 80 anos. No Brasil, estima-se que a DA atinja cerca de 0,7% dos idosos com idade próxima a 65 anos e 38,6% dos idosos com mais de 90 anos (APRAHAMIAN *et al.*, 2011; OMS, 2013).

Com o crescimento da população de idosos no Brasil e no mundo tende a aumentar o número de pessoas vivendo com demência. Segundo dados da *World Alzheimer Report (2015)*, mais de 46 milhões de pessoas vivem atualmente com algum tipo de demência em todo o mundo, podendo chegar a 75 milhões em 2030.

Além dos aspectos sociais e dos impactos gerados na vida do paciente, de seus familiares e das pessoas no seu convívio social, a DA produz custos elevados no cuidado dos pacientes, conforme demonstrado por Rondón e Vizcaya (2014), estimados em cerca de 612 bilhões de dólares em todo o mundo por ano. Estes custos referem-se aos gastos com medicamentos, cuidadores e gastos médicos, bem como pela perda de mão de obra de portadores de DA.

3.2 Hipertensão como um fator de risco para DA

Além dos fatores relacionados à DA já apresentados, estudos epidemiológicos indicam que a hipertensão é um fator de risco para o desencadeamento da DA (MARFANY *et al.*, 2018).

Um estudo de coorte longitudinal, iniciado em 1961, visava investigar o envelhecimento de um grupo de voluntários, os quais eram submetidos a exames físicos e laboratoriais a cada três ou seis anos. Como um 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,

adicionalmente, testes cognitivos dos participantes do estudo. A análise dos resultados do teste cognitivo, comparado com os testes anteriores, e considerando a idade de início da hipertensão em alguns pacientes que a desenvolveram, permitiu formular a hipótese de que pressão sanguínea elevada, por longo período de tempo, 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, hipertensão foi identificada como um fator de risco para depósitos corticais de β -amiloide fibrilar (PETROVITCH *et al.*, 2000; TOLEDO *et al.*, 2012; RODRIGUE *et al.*, 2013).

Hipertensão crônica pode alterar a movimentação da β -amiloide intra- e extra-cerebral 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).

Concomitantemente a estes estudos, evidências clínicas sugerem que o uso de anti-hipertensivos está 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.*, 2017).

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 que atravessam a barreira hematoencefálica e possuem atividade no sistema nervoso central foram associados à redução de 65% da taxa de declínio cognitivo por ano de tratamento, desta forma, sendo observada uma redução no avanço da doença. Também se observou uma

associação entre melhora na neuroinflamação e ativação microglial com o uso de inibidores da ECA (SINK *et al.*, 2009; SOTO *et al.*, 2013; TORIKA *et al.*, 2016).

3.3 Modelos animais para o estudo da Doença de Alzheimer

Um das principais dificuldades em se estudar doenças neurodegenerativas é conseguir estabelecer um modelo confiável e reprodutível. No estudo da DA existem alguns modelos animais já bem estabelecidos e que já permitiram obter alguns avanços sobre a doença, seu desenvolvimento, e tratamento (KINOSHITA, 2012; BELLOZI, 2014).

Os modelos utilizados no estudo da DA geralmente mimetizam os sintomas da doença por reproduzir as lesões da doença, porém geralmente não mimetizam outros mecanismos patogênicos. Alguns modelos envolvem formas para gerar depleção colinérgica nos animais testes, considerando-se que a redução de acetilcolina (ACh) está relacionada com a perda de determinadas 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).

Além dos modelos induzidos por danos, existem os modelos espontâneos 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 estes modelos genéticos estão os modelos que envolvem a expressão de presenilina mutante, os quais induzem a deposição de placas senis e, conseqüentemente, perda de memória, morte neuronal e neuroinflamação. Outros modelos envolvem a expressão de proteína tau que leva à formação de NFT (tauP_{301L}) (CHEN *et al.*, 2010; PASSOS *et al.*, 2010; BELLOZI, 2014).

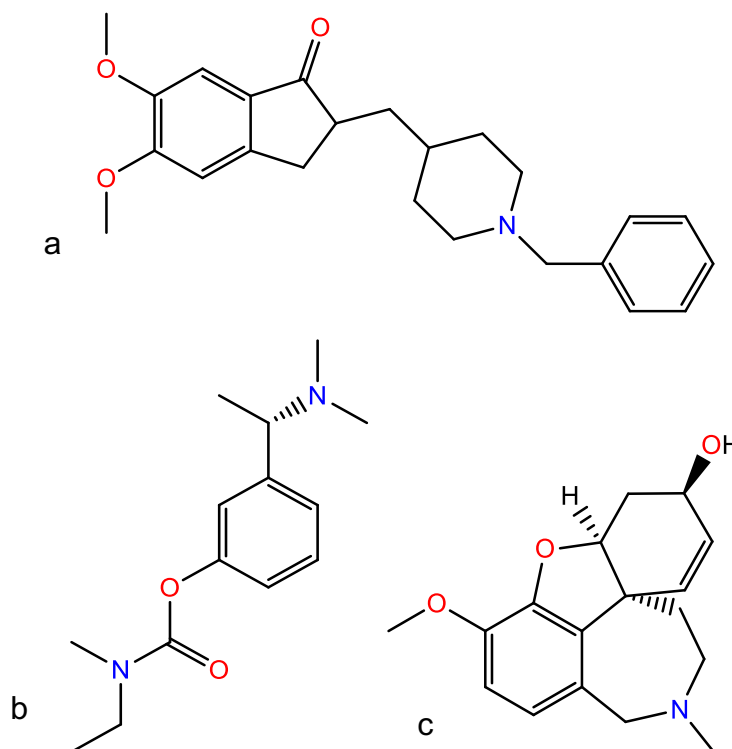
3.4 Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer

Os fármacos atualmente disponíveis para tratar doenças neurodegenerativas, incluindo DA, apresentam limitações, não conseguindo reverter ou impedir o avanço da doença. Porém, tais fármacos são eficazes em contribuir de forma bastante significativa para uma melhor qualidade de vida do paciente (BELLOZI, 2014).

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 demonstrado 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: donepezila (a), rivastigmina (b) e galantamina (c). A tacrina foi inicialmente utilizada, porém foi abandonada devido à alta incidência de reações adversas, principalmente a 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. Não há relevância clínica reconhecida quanto a estas diferenças (ČOLOVIĆ *et al.*, 2013; BRASIL, 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. Atualmente também foram desenvolvidos agentes antiagregantes de placas senis e modificadores do processamento da APP (ainda sem dados sobre seu uso na prática clínica) (MENDIOLA-PRECOMA, 2016).

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) do Ministério da Saúde do Brasil, estão indicados para o tratamento da DA o uso de

donepezil (comprimido de 5 ou 10 mg por dia; via oral), galantamina (cápsulas de liberação prolongada de 8, 16 ou 24 mg administrado uma vez ao dia, pela manhã e preferencialmente com alimento) ou rivastigmina (1,5; 3; 4,5 ou 6 mg; solução oral de 2 mg/mL, iniciando com 3 mg por dia). Sobre o tratamento farmacológico, o PCDT aconselha a suspendê-lo caso o paciente apresente perda cognitiva que torne o tratamento mais agressivo ao organismo do que benéfico na mitigação do avanço da doença. Como critério para determinar o momento de suspensão do tratamento, por não se observar melhora considerável, deve-se considerar resultado com “score” no Mini Exame do Estado Mental (MEEM) inferior a 12 para pacientes que possuem quatro ou mais anos de estudo formal (anos iniciais do ensino fundamental) e inferior a 8 para os que possuem menos de quatro anos de estudo formal. O tratamento também deve ser interrompido se não houver estabilização do quadro de perda cognitiva após três a quatro meses de tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

3.5 Perspectivas de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DA

Em uma revisão sistemática de Cazarim *et al.* (2016), os autores descrevem substâncias que poderiam atuar em diferentes alvos terapêuticos da DA, com potencial em melhorar alguns sintomas da doença. Entre os novos possíveis fármacos que atuam como inibidores da AChE, alguns alcaloides como a huperzina, extraída do *Lycopodium clavatum*, um inibidor competitivo da AChE, melhorou a memória de curto prazo em estudos clínicos. Imunomoduladores vêm sendo testados por meio de vacinas de anticorpos monoclonais e demonstraram efetividade na imunização ativa contra a deposição de oligômeros A β (Cazarim *et al.*, 2016).

Testes com anti-inflamatórios demonstraram que principalmente os inibidores seletivos de ciclo-oxigenase isoforma 2 (COX-2), são efetivos em reduzir os níveis de A β depositada em cérebros de animais, mas sem evidência de impedir o declínio cognitivo em humanos. Além disso, anti-inflamatórios podem ser considerados por apresentarem também a atividade moduladora de γ -secretase (CAZARIM *et al.*, 2016).

Fármacos inibidores ou moduladores de β e γ -secretase vêm sendo estudados na tentativa de desenvolver substâncias que ajudem a reduzir a formação de placas amiloides e reduzam o declínio cognitivo (BOLOGNESI, 2011).

Diversos compostos vêm sendo investigados com a intenção de reduzir o avanço da doença e melhorar a cognição dos pacientes. Porém, como visto, a DA é uma doença complexa na qual há envolvimento de diversos processos na sua patogenia. A exemplo do que acontece no tratamento de algumas doenças infectocontagiosas, quando o tratamento de uma doença necessita de uma abordagem mais complexa para garantir a efetividade do tratamento, uma alternativa terapêutica é a associação de medicamentos que atuem em diferentes sítios associados à fisiopatogenia da doença. Estes chamados “coquetéis” envolvem a combinação de mais de um fármaco seja em dose fixa, quando os vários fármacos estão presentes na formulação de um único medicamento, ou podem envolver a combinação de fármacos em formulações diferentes, podendo ser ou não na mesma forma farmacêutica. Na DA, assim como em outras doenças neurodegenerativas, as atividades de pesquisa têm como foco fármacos de ação múltipla, que atuem nos diferentes processos envolvidos na fisiopatogênese da doença (BOLOGNESI, 2011; DIAS E VIEGAS JUNIOR, 2014 CAZARIM *et al*, 2016).

Além da estratégia de combinação de fármacos em uma mesma formulação, ou em formulações diferentes, porém administrados como um coquetel, pesquisas recentes têm se utilizado de técnicas de hibridação na busca de fármacos direcionados a vários alvos da DA (DIAS E VIEGAS JUNIOR, 2014).

Nos últimos anos, diversos novos fármacos que são produtos naturais, ou derivados destes, têm sido aprovados (NEWMAN *et al.*, 2016). Em sua maioria são metabólitos secundários de plantas, cujos exemplos são taxol, de *Taxus brevifolia*, vimblastina, de *Catharanthus roseus*, doxorubicina, de *Streptomyces peucetius*, dentre outros (SKIRYCZ *et al.*, 2016; SCOSSA *et al.*, 2018). O primeiro passo na descoberta de produtos naturais bioativos envolve a extração dos metabólitos secundários da droga vegetal através de várias técnicas de extrativas, como extração por fluido supercrítico (YOSHIOKA *et al.*, 2018; MORALES *et al.*, 2018), percolação, extração assistida por micro-ondas e ultrassônica (GIL-CHAVES *et al.*, 2013), métodos de destilação molecular (GAN

et al., 2016) e extração por membrana (WILLIAMS *et al.*, 2012). Além disso, o fracionamento guiado por bioensaio, usando métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), é aplicado para o isolamento e purificação de metabólitos ativos de seus extratos brutos (SALAM *et al.*, 2019). Outras técnicas, como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (MS) e a espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-VIS) permite a caracterização detalhada e, finalmente, a elucidação estrutural desses compostos (THOMFORD *et al.*, 2018). Então, investiga-se a atividade farmacológica, em modelos *in vitro*, *in vivo* e voluntários humanos. No entanto, alguns problemas como, por exemplo, degradação ou modificação química dos compostos bioativos, podem ocorrer durante esse processo de isolamento e purificação dos compostos. Além disso, informações biológicas importantes que estavam presentes no extrato original podem ser perdidas durante o fracionamento (ROBINETTE *et al.*, 2012). Além disso, em muitos casos observa-se melhores efeitos terapêuticos ao usar os extratos brutos, como praticado na medicina tradicional, em vez de uma molécula isolada. Esse efeito pode ser atribuído à sinergia entre componentes bioativos e, possivelmente, aqueles que não apresentariam atividade quando isolados (por exemplo, estudos mostraram os efeitos sinérgicos de diferentes extratos vegetais e doxorrubicina no tratamento de tumores) (SHARMA *et al.*, 2004). Tendo em vista a complexidade de mecanismos patológicos envolvidos em doenças neurodegenerativas, o emprego de extratos brutos ou frações enriquecidas em determinados compostos, na forma de fitoterápicos, é bastante promissor na terapia farmacológica de doenças como a DA.

3.7 *Hancornia speciosa* Gomes

Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae), popularmente conhecida como mangaba, mangava ou mangabeira, é uma árvore frutífera 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, xaropes, 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).

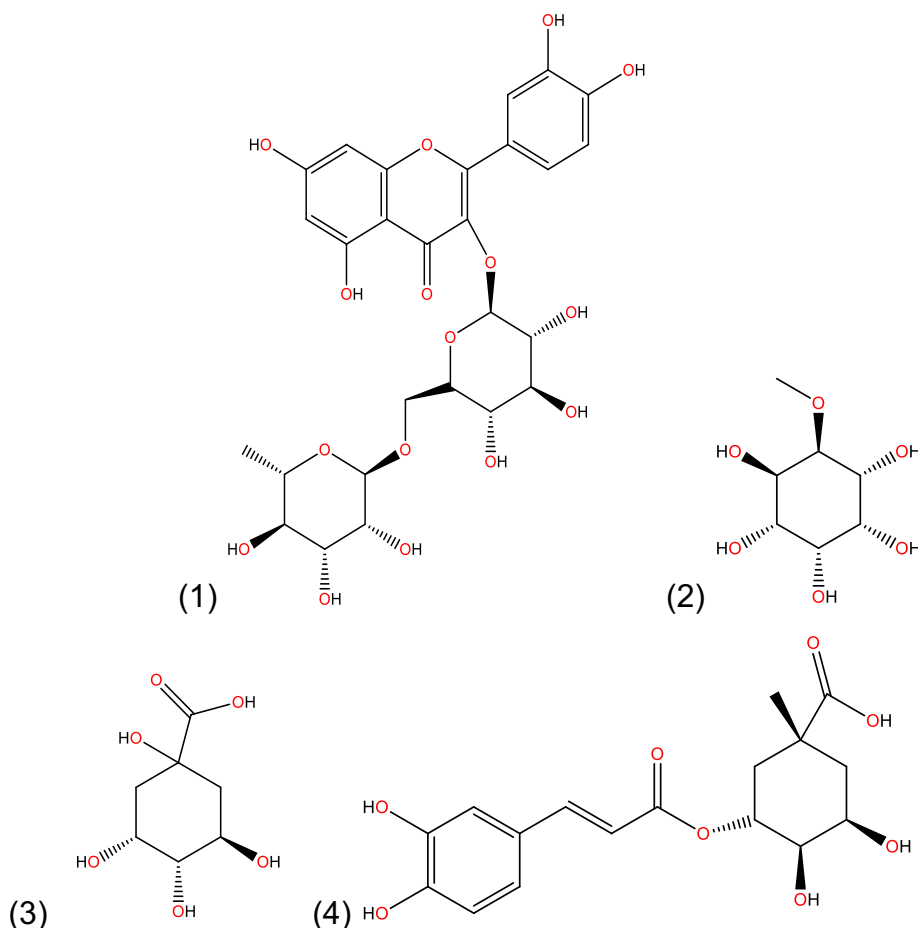
Moraes e colaboradores (2008) relataram atividade gastroprotetora e atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* para extratos etanólicos de cascas da espécie. Rufino e colaboradores (2009) comprovaram a atividade antioxidante frente ao DPPH para os frutos da espécie. A atividade anti-inflamatória foi 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, para o extrato etanólico de folhas da espécie (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 em construção*)



Nosso grupo de pesquisa vem investigando o potencial farmacológico das folhas de *H. speciosa* há cerca de 15 anos. Assim, o efeito anti-hipertensivo do extrato etanólico de folhas da espécie e de uma fração derivada deste foi caracterizado como resultante de inibição da ECA e do 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* (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).

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.*, 2007a; FERREIRA *et al.*, 2007b).



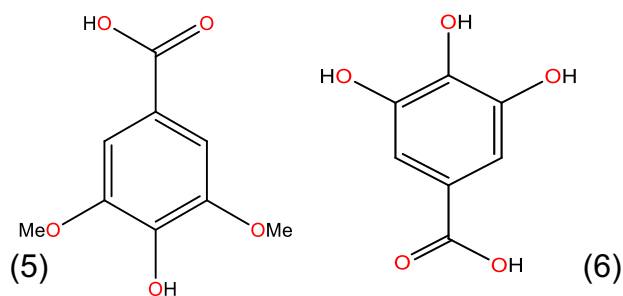
Silva e colaboradores (2016) demonstraram o mecanismo hipotensor da fração padronizada de *H. speciosa* após a administração oral da fração nas doses de 0,03 a 1 mg/kg. De acordo com os autores, a redução da resistência periférica pela produção de óxido nítrico (NO) e aumento da produção de H₂O₂ nas artérias mesentéricas de ratos hipertensos seria responsável pela resposta hipotensora, sendo este efeito dose-dependente. Em um estudo anterior, os autores demonstraram que uma fração padronizada de *H. speciosa*, enriquecida em ciclitóis, como o bornesitol, e flavonoides, como 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).

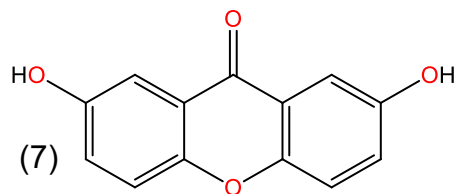
Conforme explicado anteriormente, um dos constituintes anti-hipertensivos de *H. speciosa* já identificados é o bornesitol [(1,2,3,4,5,6)-1-O-metil-mio-inositol], um derivado de mio-inositol encontrado em diversas espécies de plantas (NISHBE *et al.*, 2001).

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-κB), 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-κB (ENDRINGER *et al.*, 2009).

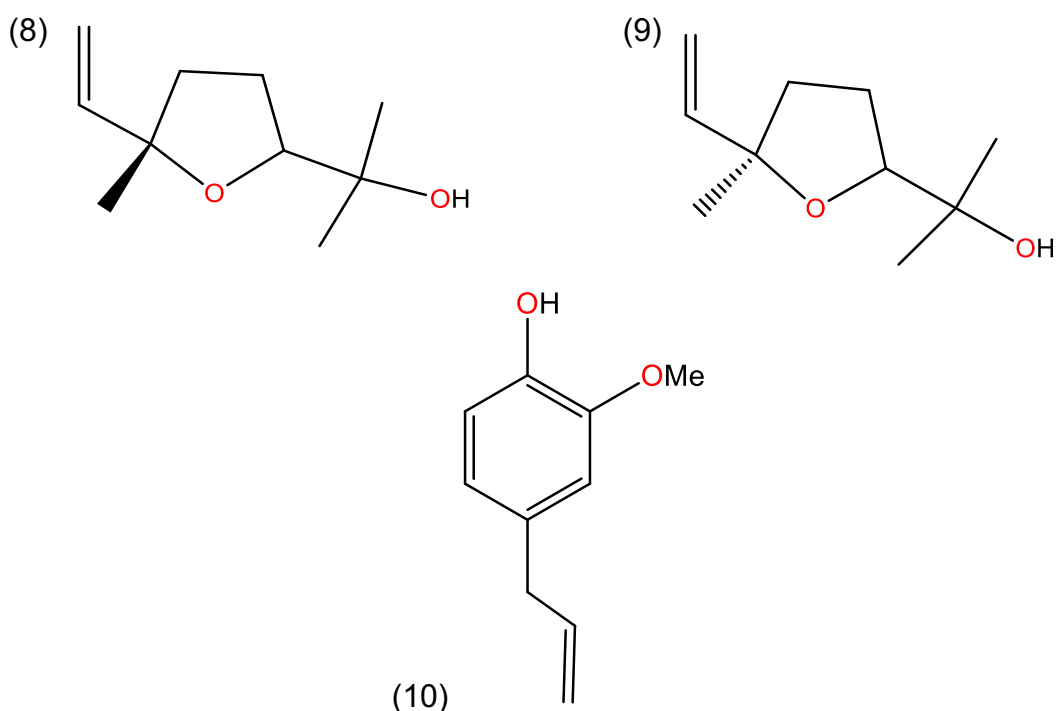
Nosso grupo de pesquisa também realizou a avaliação da toxicidade pré-clínica de um extrato padronizado de folhas de *H. speciosa*. A partir dos resultados do estudo de toxicidade aguda, o extrato foi classificado na categoria 5 do *Globally Harmonized System*, possuindo baixa toxicidade oral em dose 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 da espécie inclui ácidos orgânicos e seus derivados, como os ácidos gálico (5) e siríngico (6) 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico, 3-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico) (4), 5-O-cafeoilquínico, além de cis-clorogenato de metila, trans-clorogenato de metila, 2,7-diidroxixantona (7) e 2,7-dimetoxixantona, além de procianidinas do tipo B (RODRIGUES *et al.*, 2006).





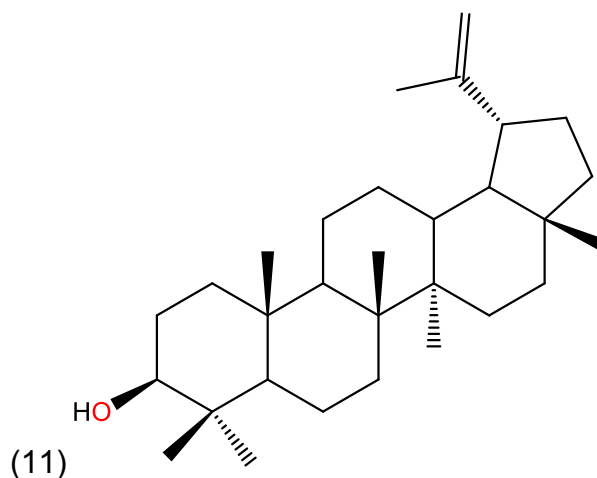
A análise do óleo essencial de folhas de *H. speciosa* por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas permitiu a identificação de alguns compostos voláteis como o óxido de *trans*-linalol (8), óxido de *cis*-linalol (9), α -terpinol, linolol, geraniol, metil-antranilato, eugenol (10) e isoeugenol (SANTOS *et al.*, 2006).



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). A quantificação do bornesitol foi realizada por HPLC-UV, após derivatização com cloreto de tosila (PEREIRA *et al.*, 2012).

Outros compostos apolares foram obtidos a partir 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 (11). No extrato etanólico foram identificados rutina (1) e ácido clorogênico (4) (BARROS, 2008).



3.8 Produtos naturais polifenólicos e atividade neuroprotetora

Produtos naturais polifenólicos têm ganhado especial atenção como uma fonte promissora de novos fármacos para o tratamento da DA, por serem considerados menos tóxicos do que produtos sintéticos (KIM *et al.*, 2010). No entanto, nem sempre o mecanismo de ação é conhecido devido à grande diversidade de substâncias presentes em extratos e frações enriquecidas (MORALES *et al.*, 2018).

Produtos naturais com atividade anti-inflamatória, antioxidante e anti-amiloide podem interagir com mediadores neuroinflamatórios. A permeabilidade pela barreira hematoencefálica (BHE) de diversos desses produtos permanece inconclusiva. Após a administração oral, metabólitos de (-)-epicatequina foram encontrados no cérebro de camundongos (VAN PRAAG *et al.*, 2007). Resultados similares foram encontrados em estudos com extratos de *Ginkgo biloba* (RANGEL-ORDÓNEZ *et al.*, 2010). Foi observado que flavonoides do extrato de *G. biloba* estavam distribuídos pelo hipocampo, estriado, córtex pré-frontal e cerebelo de roedores (RANGEL-ORDÓNEZ *et al.*, 2010).

Flavonoides são uma classe de compostos polifenólicos que possuem benefícios significativos para a saúde humana. Quercetina, um flavonoide extraído de plantas como *Morus alba* (DAJAS, 2012) demonstrou reversão de dano neurodegenerativo induzido por manganês em ratos *Dawley Sprague*, em modelo subcrônico (oito dias de tratamento), nas doses de 25 e 50 mg/kg, *per*

os. Este efeito neuroprotetor foi observado devido 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 reduzindo a produção excessiva de A β . Derivados do ácido quínico demonstraram 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).

Alguns flavonoides, como os flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis, polimerizam formando taninos condensados. Taninos são metabólitos secundários que podem ser do tipo hidrolisáveis ou condensados. Taninos hidrolisáveis são os galotaninos e os elagitaninos, derivados dos ácidos elágico ou gálico, respectivamente (RAVISHANKAR *et al.*, 2013; KY *et al.*, 2016).

Os taninos condensados são também conhecidos como proantocianidinas. Estas são encontradas em flores, frutos, nozes, cascas e sementes de várias plantas, agindo como defesas contra estressores bióticos e abióticos. Sua adstringência protege as plantas de patógenos e predadores. Seus blocos de construção envolvem catequina ou epicatequina. Leucoantocianidinas redutases catalisam a síntese de catequina, sendo este o primeiro passo na biossíntese de proantocianidinas. O grau de polimerização de proantocianidinas pode variar de duas a onze subunidades. Nestas, as subunidades poliméricas de flavan-3-ol são unidas por ligações do tipo carbono-carbono (C-C) e ocasionalmente carbono-oxigênio-carbono (C-O-C). Condensações oxidativas ocorrem no carbono C₄ do heterociclo e nos carbonos C₆ ou C₈ (DONG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2016).

Proantocianidinas apresentam diversas propriedades biológicas e farmacológicas já relatadas. São utilizadas como aditivos em preparações de alimentos para aumentar a estabilidade ao crescimento de microrganismos, ao aquecimento e a estabilidade oxidativa. Também possuem uma vasta gama de benefícios à saúde, tais como, antioxidante, antitumoral e propriedades imunoestimulatórias. Proantocianidinas oligoméricas possuem atividade antioxidante, antiviral, antibacteriana, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antialérgica e vasodilatadora (IAHTISHAM-UL-HAQ *et al.*, 2019).

Proantocianidinas melhoraram anormalidades respiratórias induzidas por pesticida rotenona em células da linhagem dopaminérgica, podendo, portanto, apresentar atividade neuroprotetora para a doença de Parkinson (STRATHEARN *et al.*, 2014). 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 óxido nítrico e A β , e a atividade das enzimas monoamino oxidase do tipo B e acetilcolinesterase (GONG *et al.*, 2016). Camundongos transgênicos Tg2576 para DA tratados com monômeros de catequina, na dose de 80 mg/kg/dia, *per os*, e com uma mistura complexa de proantocianidinas, na dose de 120 mg/kg/dia, *per os*, por 5 meses, apresentaram benefícios cognitivos através da melhora da plasticidade sináptica no encéfalo (WANG *et al.*, 2012).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos

- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB 204.
- Balança analítica Sartorius, modelo BP 211D.
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000.
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400 (40 kHz).
- Bomba de infusão Insight[®] EFF 311
- Bombas de vácuo Fabbe (modelo 0320) e Edwards (modelo C 560786).
- Bomba peristáltica de bancada Watson Marlow, modelo 120S.
- Bomba peristáltica Insight[®] EL 500B
- Capela de fluxo laminar vertical Veco, modelo BioProtector 09.
- Centrífuga Hermle Z323K.
- Coletor de frações digital Gilson, modelo FC 203B.
- Coluna para HPLC LiChrospher[®] 100 RP18, 250 × 4,6 mm d.i; com partículas de 5µm – Merck; com pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 × 4 mm d.i.), partículas de 5 µm.
- Coluna para UPLC, ACQUITY BEH C18 Shield, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm, Waters
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95.
- Espectrômetro ultravioleta-visível, com feixe duplo, HITACHI, modelo U-2900.
- Esterotático 2 duas torres Insight[®]
- Estufa de secagem com renovação de ar, Fanem.
- Evaporador rotatório Büchi (Rotavapor), modelo B-480.
- Liofilizador de bancada Liotop, modelo L101.
- Microcentrífuga Quimis, modelo Q222E14.
- Micropipetas HTL, vol. ajustável de 10 - 100 µL; 20 – 200 µL e 100 - 1000 µL.
- Microseringa 10 µL, Agulha Fixa – Hamilton, modelo 80300 / Sge 002000.
- Phmetro Metrohm, modelo 827 pH lab.
- Purificador de água Milli-Q Plus – Direct-Q 3 Millipore.

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters® 2695, constituído por injetor automático, detector de arranjos de diodos PDA 2996, bomba quaternária L-6200^a com degaseificador de linhas, e sistema computadorizado operado pelo programa Empower, Waters®.
- Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC)- Waters®, composto por detector de arranjos de diodo (DAD) e espectrômetro de massas de alta resolução equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI), analisador de massas do tipo quadrupolo e sistema computadorizado operado pelo programa MassLynx.
- Soprador térmico serigráfico Steinel, modelo HL-500.
- Ultrafreezer Liobras.
- Vórtex Mixer, Vixar.

4.2 Solventes e reagentes

- Ácidos grau P.A.: ácido fórmico, ácido sulfúrico e ácido clorídrico, Merck.
- Ácidos grau HPLC: ácido fórmico e ácido fosfórico, Merck.
- Amiloide-beta 1-42 (ref.: 03112; lote: 75949914); Life Technologies.
- Anasedan (cloridrato de xilazina 2%), Ceva.
- Bicarbonato de sódio P.A., LS Chemicals.
- *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.
- Paraformaldeído, Sigma-Aldrich.
- Peróxido de hidrogênio 5%, Synth.
- Sacarose, Merck.
- Sephadex LH-20, GE Healthcare.

- Sílica gel 60, 230-400 mesh, Merck.
- Sílica gel 60, 70-230 mesh, Merck.
- Solventes grau HPLC acetonitrila e metanol, Tedia.
- Solventes grau padrão analítico (P.A.): acetona, metanol e álcool etílico, Quimex; álcool etílico 95%, Fmaia, tolueno, Merck.
- Soro fetal bovino estéril, Gibco, Invitrogen.
- Tubo de plástico tipo safe-lock de 2 mL, MDI.
- Vanilina P.A., Isofar.

4.3 Vidrarias e materiais diversos

- Borrifador de vidro.
- Capilar para aplicação em CCD.
- Colunas cromatográficas de vidro de dimensões variadas.
- Cromatoplasmas de vidro de 5 ×10 cm e 10 ×10 cm.
- Cromatofolhas (Al) de sílica gel, Merck.
- Cubas cromatográficas de vidro Pyrex.
- Microtubo plástico de 2 mL e 1,5 mL do tipo *safe-lock*, Axygen.
- Ponteiras plásticas, Corning.
- Seringas e agulhas de diferentes dimensões.
- Sistema de filtração esterilizante, descartável, membrana de 0,22 µm, capacidade para 500 mL e 1000 mL, Corning.
- Tubo de ensaio para coletor de frações.
- Tubos plásticos do tipo Falcon com volumes de 15 e 50 mL, TPP.
- Tubo de plástico do tipo safe-lock de 2 mL, MDI.
- Vials de vidro com tampa e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de HPLC e UPLC-MS.

4.4 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. No momento do uso as soluções foram adicionadas na proporção (1:1).

4.5 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. A droga vegetal foi adicionalmente seca em estufa ventilada à 40 °C, por, no mínimo, 72 horas.

4.6 Preparo do extrato acetona:água (70:30 v/v) de folhas de *H. speciosa*

Após a secagem, o material vegetal foi pulverizado em moinho de facas e submetido à percolação exaustiva com acetona:água (70:30), à temperatura ambiente. O extrato foi concentrado, sob pressão reduzida, em evaporador rotatório, à temperatura máxima de 50 °C, até resíduo. A água residual foi removida por liofilização.

Partindo de uma massa de 200,0 gramas do material vegetal, obteve-se 70,8 gramas de extrato de *H. speciosa* em acetona:água (70:30), com um rendimento de 35,4% (m/m).

4.7 Obtenção de perfis cromatográficos por CCD e HPLC-FR do extrato em acetona:água de *H. speciosa*

Uma porção (5 mg) do extrato em acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa* foi solubilizado em 2 mL de MeOH grau HPLC, com auxílio de ultrassom por 10 minutos. A amostra foi então centrifugada por 10 minutos, à $8.400 \times g$. O sobrenadante foi transferido para um *vial* devidamente identificado. O perfil cromatográfico foi obtido em sistema de HPLC-FR (Waters® 2695), com detector de arranjo de diodos (DAD - Waters® 2996). O fluxo foi mantido em 1 mL/min. A fase móvel utilizada foi constituída por água deionizada e acetonitrila (MeCN), ambas acidificadas a 1% (v/v) com ácido fosfórico. A eluição foi realizada com gradiente linear de 5% a 95% de MeCN em 70 minutos, seguida de eluição isocrática com 95% de MeCN até 85 min. Utilizou-se a coluna LiChospher® 100 RP18 (250 × 4,6 mm; 5µm, Merck).

Para obtenção do perfil cromatográfico do extrato por CCD de sílica gel, utilizou-se a mesma solução preparada anteriormente, a qual foi aplicada com capilar em cromatofolha de alumínio recoberta com sílica gel 60 com indicador de fluorescência. A eluição foi feita com *n*-butanol / ácido acético / água (40:10:50) e, para revelação, utilizou-se vanilina-ácido sulfúrico, seguido de aquecimento com o auxílio de soprador térmico.

4.8 Quantificação de proantocianidinas por espectroscopia no UV/VIS

Pesou-se quantitativamente massa suficiente de padrão de cloreto de cianidina para o preparo de soluções, em mistura de *n*-butanol / ácido clorídrico (95:5), com concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; e 8,0 µg/mL, para a construção da curva analítica.

Para o preparo dessas soluções, pesou-se, com precisão de 1,0 mg, 2,0 mg do padrão de cloreto de cianidina, transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL e solubilizou-se em solução *n*-butanol / ácido clorídrico (95:5). Uma porção de 2,0 mL dessa solução foi diluída em balão volumétrico de 5,0 mL, fornecendo a solução padrão na concentração de 8 µg/mL. A partir dessa solução, realizou-se a diluição seriada para obtenção das soluções nas concentrações acima descritas, em balão volumétrico. Prosseguiu-se com a leitura da absorbância das soluções em espectrofotômetro UV/VIS, em 540 nm.

Para a determinação da concentração de proantocianidinas no extrato acetona/ água (70:30) de *H. speciosa*, pesaram-se, com precisão de 1,0 mg, porções de 6,0 mg do extrato. O mesmo foi adicionado a um balão de fundo redondo, contendo 40 mL de solução de n-butanol-HCl 37% (95:5), adaptou-se um condensador de refluxo e aqueceu-se esta solução, em banho de óleo, durante duas horas a aproximadamente 130 °C. Resfriou-se e transferiu-se a solução, quantitativamente, para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com a solução de n-butanol-HCl 37% (95:5). Mediu-se a absorvância da solução a 540 nm, empregando-se a solução de n-butanol-HCl 37% (95:5), como branco. Nos casos em que a absorvância foi maior que 0,8 fez-se uma diluição da amostra com n-butanol-HCl 37% (95:5), fazendo-se a devida correção nos cálculos. O experimento foi realizado em duplicata.

O teor de proantocianinas no extrato foi calculado utilizando-se a equação gerada a partir da regressão linear da curva concentração-resposta obtida para o cloreto de cianidina.

4.9 Fracionamento de extrato de *H. speciosa* visando obter frações enriquecidas em proantocianidinas

Tendo em vista a detecção de proantocianidinas no extrato em acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa* e o teor obtido na análise quantitativa, foi realizado o fracionamento do extrato visando obter frações enriquecidas nesses constituintes, a serem posteriormente avaliadas nos ensaios biológicos.

Para tanto, foram empregados dois procedimentos distintos: fracionamento do extrato por partição entre solventes imiscíveis e fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH20. Adicionalmente, a fração em acetato de etila, obtida por partição entre solventes imiscíveis, também foi fracionada em coluna de Sephadex LH20.

Os fracionamentos cromatográficos foram monitorados por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD). As frações foram reunidas de acordo com a semelhança de seus perfis, e então transferidas para frascos previamente pesados e mantidas em dessecador até completa evaporação do solvente. Também foi determinado o perfil destas frações por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-FR).

A caracterização da composição química das frações ricas em proantocianidinas foi feita por cromatografia de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (UPLC-ESI-MS) (item 4.12).

4.9.1 Partição entre solventes imiscíveis

Uma porção de 2,0 g do extrato bruto foi solubilizada em 100 mL de uma solução de água / MeOH (7:3), seguindo-se de particionamento sequencial em funil de separação com *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila (3 × 50 mL cada). Este fracionamento foi realizado com 3 porções de 2 g do extrato e os rendimentos obtidos estão dispostos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Rendimento das frações obtidas por partição do extrato em acetona:água (70:30) de *H. speciosa* entre solventes imiscíveis.

Fração	Massa (mg)	Fração Reunida	Média ± d.p.	Massa reunida (mg)	Rendimento (%)
Hex 1	11,9				
Hex 2	18,3	HEX	20,8 ± 8,4	62,3	1,0
Hex 3	32,1				
DCM 1	81,7	DCM	72,6 ± 9,1	145,3	2,4
DCM 2	63,6				
EtOAc 1	234,6				
EtOAc 2	274,7	EtOAc	340,0 ± 121,8	1.020,0	17,0
EtOAc 3	510,7				
H2O:MeOH1	713,3				
H2O:MeOH2	1235,4	H2O:MeOH	1038,6 ± 231,7	3.115,8	51,9
H2O:MeOH3	1167,1				
TOTAL				4.343,4	72,3

4.9.2 Fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH-20

Uma porção do extrato em acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa* (1 ou 1,5 g) , extrato bruto, foi solubilizada em 5 mL de EtOH (PA) e sonicada em banho de ultrassom por 30 min. A amostra foi então centrifugada a 820 × g, por 10 minutos, e o precipitado foi novamente sonicado por 10 minutos. Este procedimento foi repetido 5 vezes, solubilizando-se, ao fim, considerando-se a

pera de massa, de 850 mg a 1,5 g do extrato em 5 mL. Para melhorar o rendimento, procedeu-se à solubilização forçada antes de aplicar o extrato na coluna. Para tanto, após a solubilização de parte do extrato em EtOH procedia-se com a centrifugação da suspensão a $820 \times g$, recolhia-se o sobrenadante e repunha-se o solvente, repetindo o processo.

A solução resultante (5 mL) foi então aplicada no topo de uma coluna de vidro ($73 \times 3,5$ cm, d.i.) empacotada com Sephadex LH20 (270,10 g).

A coleta das frações foi realizada 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, conforme discriminado nas tabelas 4.3-4.8. A coluna foi recondicionada com EtOH ao fim de cada fracionamento.

O fracionamento cromatográfico foi repetido 4 vezes, com um total de 4,9 g do extrato aplicados na coluna. As frações obtidas foram reunidas de acordo com os seus perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel e HPLC-FR (tabelas 4.2-4.7)

Tabela 4.2: Primeiro fracionamento do extrato em acetona:água (70:30) de *H. speciosa* em coluna de Sephadex LH20.

Fração (TS1-C)	Solvente	Massa (mg)	Rendimento (%)
1	EtOH	416,8	49,0
2	EtOH/Acetona (9:1)	9,5	1,1
3	EtOH/Acetona (7:3)	5,4	0,6
4	EtOH/Acetona (1:1)	5,4	0,6
5	EtOH/Acetona (2:8)	42,0	4,9
6	MeOH/Acetona (1:1)	4,2	0,5
7	MeOH	60,2	7,0
8	Água/Acetona (1:1)	31,5	3,7
TOTAL		575,0	67,6
TOTAL ADMINISTRADO:		850,0	

Tabela 4.3: Segundo fracionamento do extrato em acetona:água (70:30) de *H. speciosa* em coluna de Sephadex LH20.

Fração (TS2-C)	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 ADMINISTRADO:		1000,0	

Tabela 4.4: Terceiro fracionamento do extrato em acetona:água (70:30) de *H. speciosa* em coluna de Sephadex LH20

Fração (TS4-C)	Solvente	Massa (mg)	Rendimento (%)
1	EtOH	810,6	54,0
2	EtOH/Acetona (9:1)	61,2	4,1
3	EtOH/Acetona (7:3)	35,6	2,4
4	EtOH/Acetona (1:1)	42,9	2,9
5	EtOH/Acetona (2:8)	5,9	0,4
6	MeOH/Acetona (1:1)	75,5	5,0
7	MeOH	19	1,3
8	Água/Etanol (1:1)	20,6	1,4
TOTAL		1071,3	71,4
TOTAL ADMINISTRADO:		1500,0	

Tabela 4.5: Quarto fracionamento do extrato em acetona:água (70:30) de *H. speciosa* em coluna de Sephadex LH20

Fração (TS5-C)	Solvente	Massa (mg)	Rendimento (%)
1	EtOH	845,9	56,4
2	EtOH/Acetona (9:1)	34,1	2,3
3	EtOH/Acetona (7:3)	28,8	1,9
4	EtOH/Acetona (1:1)	26,6	1,8
5	EtOH/Acetona (2:8)	97,5	6,5
6	MeOH/Acetona (1:1)	9,6	0,6
7	MeOH	-	-
8	Água/Etanol (1:1)	29,2	1,9
TOTAL		1.071,7	71,5
TOTAL ADMINISTRADO:		1500	

Adicionalmente, a fração em EtOAc, obtida pela partição do extrato entre solventes imiscíveis, também foi fracionada em coluna de Sephadex LH20. Para tanto, aplicou-se à coluna uma porção da fração previamente solubilizada em EtOH e centrifugada a $820 \times g$. Este procedimento foi realizado com duas porções da fração EtOAc (625 mg ou 520 mg) (**tabela 4.6 e 4.7**).

Tabela 4.6: Primeiro fracionamento em coluna de Sephadex LH20 da fração EtOAc, oriunda da partição do extrato em acetona:água de *H. speciosa* entre solventes imiscíveis.

Fração (TSN)	Solvente	Massa (mg)	Rendimento (%)
1a	EtOH	250	40,0
1b	EtOH	63,4	10,1
2	EtOH/Acetona (9:1)	30,2	4,8
3	EtOH/Acetona (7:3)	60	9,6
4	EtOH/Acetona (1:1)	34,3	5,5
5	EtOH/Acetona (2:8)	1,5	0,2
6	MeOH/Acetona (1:1)	15,3	2,5
7	MeOH	4,6	0,7
TOTAL		459,3	73,5
TOTAL ADMINISTRADO:		625	

Tabela 4.7: Segundo fracionamento em coluna de Sephadex LH20 da fração EtOAc, oriunda da partição do extrato em acetona:água de *H. speciosa* entre solventes imiscíveis

Fração (TSN-C)	Solvente	Massa (mg)	Rendimento (%)
1a	EtOH	197,7	38,0
1b	EtOH	54,9	10,6
2	EtOH/Acetona (9:1)	25,0	4,8
3	EtOH/Acetona (7:3)	44,2	8,5
4	EtOH/Acetona (1:1)	27,0	5,2
5	EtOH/Acetona (2:8)	0,1	0,02
6	MeOH/Acetona (1:1)	12,0	2,3
7	MeOH	2,5	0,5
TOTAL		363,4	69,9
TOTAL ADMINISTRADO:		520	

4.10 Análises por UPLC-ESI-MS

As frações obtidas no fracionamento do extrato acetona/água (70:30) de folhas de *H. speciosa* foram analisadas por HPLC-DAD conforme descrito no item 4.7 e aquelas constituídas majoritariamente por proantocianidinas foram selecionadas para caracterização por UPLC acoplada a detector DAD em interface com espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo e fonte de ionização por *electrospray*.

O fluxo utilizado foi de 0,300 mL/min, com volume de injeção de 3,0 µL, mantendo-se a temperatura em 40 °C. As análises foram realizadas em modo exploratório, sendo os íons monitorados no modo de ionização positivo e negativo isoladamente.

As amostras foram pesadas diretamente em tubos plásticos do tipo safe lock e solubilizadas em metanol grau HPLC. Foram empregadas concentrações de 1 mg/mL para as frações. Todas as amostras foram solubilizadas com auxílio de banho de ultrassom, durante 15 minutos, e em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm (8480 x g), por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados usando seringa descartável com agulha, e em seguida, filtrados em unidade filtrante de 0,22 µm PTFE para vials de vidro com tampa, dos quais 3 µL foram injetados de forma automática em sistema de UPLC.

Para obtenção dos perfis cromatográficos, empregou-se coluna de fase reversa (ACQUITY BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm), detecção no DAD com varredura de 200-500 nm, fluxo de 0,3 mL/min e temperatura de 40°C. Foi utilizada eluição em gradiente de acetonitrila grau HPLC e água purificada grau 1, sendo ambos solventes acidificados com 0,1% v/v de ácido fórmico grau HPLC (Quadro 4.1). O ar dos solventes foi retirado através da função degasser do equipamento.

Também foi empregado um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (TQ-D, Waters), com ionização eletrônica em 50 V. A temperatura da fonte foi ajustada em 120°C, enquanto a temperatura e o fluxo do gás de dessolvatação foram mantidos à 400°C e 550 L/h, respectivamente. No modo MS SCAN, foi 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.

Quadro 4.1: Gradiente de eluição empregado para obtenção dos perfis cromatográficos por UPLC-MS

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

* Os eluentes contêm 0,1% HCOOH

4.11 Ensaios de atividade neuroprotetora *in vivo*

Os ensaios de atividade neuroprotetora *in vivo*, descritos a seguir abaixo, foram integralmente executados pelo mestrando no Laboratório de Neurofarmacologia do ICB/UFMG, sob supervisão do Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira.

4.11.1 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 submetido ao CEUA para apreciação (protocolo de aprovação do CEUA/UFMG: 297/2018; reunião do dia 01/10/2018).

4.11.2 Protocolo experimental

O protocolo foi dividido em duas partes. Na primeira parte, tratou-se os animais, *per os*, com o extrato (30 e 100 mg/kg) ou veículo, durante sete dias, com administração em dose única diária, pela manhã, sem restrições de acesso à água e ração. O número de repetições foi de oito animais por grupo (totalizando 64 animais). A massa corporal dos animais foi avaliada diariamente. Entre os dias 4 e 7 de experimento realizou-se a Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO) para avaliar se o extrato induz alguma alteração cognitiva nos animais (KINOSHITA, 2012).

Na segunda parte do protocolo, submeteram-se os animais à cirurgia estereotáxica para a injeção intra-hipocampal, no hipocampo direito, de 0,5 μ L de peptídeo β -amiloide ($A\beta$), 400 pmol, nas coordenadas: anteroposterior = -1,9 mm; látero-lateral = -1,5 mm; e dorsoventral = -2,3 mm, em relação ao bregma. Os animais controle foram submetidos ao mesmo procedimento para a injeção intra-hipocampal de 0,5 μ L de PBS. Realizou-se o procedimento cirúrgico sob anestesia geral, com mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), administrada por via intraperitoneal (ip).

Uma vez que não se observou quaisquer alterações comportamentais induzidas pelo extrato nas doses de 30 e 100 mg/kg, prosseguiu-se com a segunda parte do protocolo. Para tanto, o tratamento com o extrato (10; 30 ou 100 mg/kg) ou veículo, *per os*, foi iniciado um dia após o procedimento cirúrgico e teve duração total de sete dias, sendo administrado, em dose única diária, pela manhã, mantendo-se o mesmo horário em relação à primeira dose e sem restrição de acesso a água e ração.

4.11.3 Preparo e ativação das alíquotas de $A\beta_{1-42}$

A amostra comercial de $A\beta_{1-42}$ (1 mg) 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 -20 °C. Posteriormente 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 $A\beta_{1-42}$.

4.11.4 Cirurgia estereotáxica e injeção intra-hipocampal de A β 1-42

Para a indução da DA, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para administração de 400 pmol de amiloide beta 1-42 (A β ₁₋₄₂).

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 60 minutos antes da estereotaxia com o mesmo veículo utilizado para a solubilização das amostras-teste e pela mesma via (intraperitoneal). O grupo controle positivo para déficit cognitivo induzido por β -amiloide foi obtido pela administração intra-hipocampal de 400 pmol de A β ₁₋₄₂ ativada.

Tanto o 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.

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina 10%, na dose de 100 mg/kg, e xilazina 2%, na dose de 10 mg/kg, por via intraperitoneal. Antes de iniciar o procedimento cirúrgico, foi realizado o teste de reflexo podal para determinar se os camundongos estavam realmente anestesiados. Assim que anestesiados, os animais foram fixados no equipamento estereotáxico e a A β 1-40 ou PBS foi injetado nas coordenadas -1,9 mm anteroposterior (AP); -1,5 mm látero-lateral (LL) 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 3.3.1). As coordenadas foram determinadas de acordo com o atlas Paxinos (figura 3.3.2) (Paxinos e Franklin, 2001). Os animais foram suturados após o procedimento e retornados à caixa para recuperação.

Após 24 horas da cirurgia estereotáxica, os animais foram tratados com veículo ou extrato acetona:água (70:30) de *H. speciosa* nas doses de 30 ou 100 mg/kg.

De acordo com o composto administrado 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

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

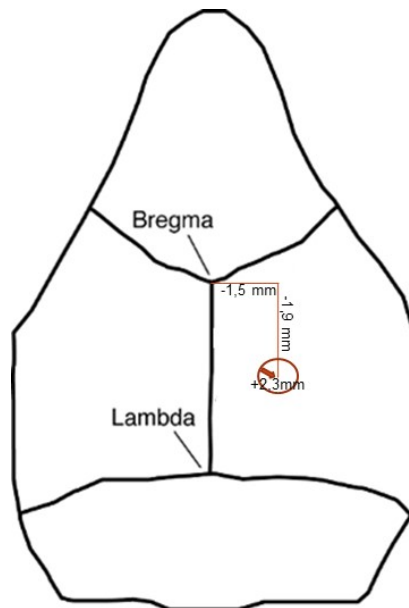
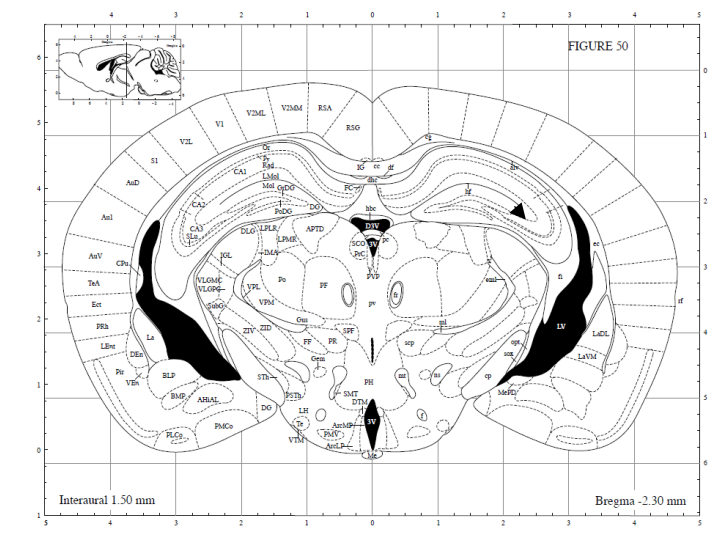


Figura 4.2: Região da injeção intra-hipocampal, segundo o atlas Paxinos. Fonte: *The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (PAXINOS E FRANKLIN, 2001)



4.11.5 Avaliação da memória

Neste trabalho foram utilizados os testes de Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO) e de Medo Condicionado ao Contexto (CURZON *et al.*, 2009).

Para evitar que haja interferência entre os dois testes comportamentais indicados, optamos por realizá-los com grupos de animais distintos.

Imediatamente após os testes, submeteu-se os animais à perfusão transcardíaca para fixação com paraformaldeído 4%, visando a coleta de encéfalos para análises histológicas. Todo o procedimento de eutanásia foi realizado sob anestesia geral [cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), i.p.].

Todos os protocolos comportamentais foram padronizados no Laboratório de Neurofarmacologia da UFMG, coordenado pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, onde estes testes serão realizados. Os experimentos comportamentais foram filmados e os vídeos analisados com auxílio de programa computacional especializado (ANY-Maze Video Tracking™, versão 6.22, ano 2020. Stoelting Co.).

4.11.5.1 Avaliação da capacidade cognitiva através da Tarefa de Reconhecimento de Objetos - TRO

Uma semana após a estereotaxia, os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento de objetos (TRO) para avaliar o nível de perda cognitiva baseada na capacidade de reconhecer objetos não familiares. A TRO é um teste comportamental que busca acessar a memória declarativa dos animais teste. Baseia-se no instinto do animal em explorar por um tempo maior objetos desconhecidos em um ambiente conhecido (KINOSHITA, 2012).

Os animais passaram por três dias de pré-teste e um dia de teste propriamente dito. No primeiro dia, os animais foram habituados em uma caixa de acrílico de dimensões 380 mm de comprimento x 380 mm largura x 150 mm de altura, recoberta com maravalha. Os animais foram mantidos nesse ambiente durante cinco minutos e foi permitido que eles explorassem a caixa como um todo. Foi colocado um camundongo por vez e a caixa era limpa com álcool 70% a cada troca de animal. No segundo dia, foram colocados dois objetos iguais na caixa, em diagonal, com uma distância de 80 mm das paredes. Os animais foram mantidos nesse ambiente por 10 minutos e puderam explorar o ambiente e os objetos livremente. Os procedimentos de limpeza da caixa foram seguidos conforme no dia primeiro e os objetos também eram limpos com álcool 70% entre o teste de um animal e outro. No terceiro dia também foi realizada a ambientação

dos animais na caixa com os mesmos dois objetos iguais, porém agora o tempo de exposição foi de apenas cinco minutos. No quarto dia, um dos objetos foi trocado por um objeto novo, com dimensões próximas, mas com formatos diferentes. Os animais foram expostos a este ambiente por cinco minutos para avaliação da memória declarativa.

Todos os dias do procedimento foram filmados e acompanhados de perto pelo observador, sendo o tempo de exploração dos objetos calculado pelo software *ANY-Maze Video Tracking™*, além de serem computados manualmente com o uso de cronômetros. Considerou-se como interação do animal com o objeto a proximidade do camundongo em relação a este, o toque no objeto e a ação de farejar os mesmos. Deve-se ressaltar que os objetos eram inodoros e feitos do mesmo material.

Os tempos de interação dos animais com cada objeto foram quantificados com auxílio do software *ANY-Maze Video Tracking™*, conforme descrito anteriormente. Os vídeos gravados foram revisados e o tempo de interação com cada objeto confirmado pela determinação manual com cronometragem desses tempos.

Os tempos obtidos foram transformados em índice percentual de reconhecimento do novo objeto, segundo a fórmula:

$$\text{Índice de reconhecimento de objetos} = \frac{\text{Tempo explorando objeto novo}}{\text{Tempo objeto velho} + \text{Tempo objeto novo}}$$

Após a TRO, os animais foram anestesiados conforme protocolo acima descrito, eutanasiados e perfundidos por via transcardíaca com solução de paraformaldeído a 10% e os seus encéfalos foram extraídos para a obtenção de cortes de hipocampo com espessura de 30 μm . Estes cortes foram armazenados em solução crioprotetora e armazenados em freezer a menos 80 °C.

4.11.5.2 Medo condicionado ao contexto

De maneira semelhante ao procedimento adotado na execução da TRO, os animais submetidos à esterotaxia para a injeção intra-hipocampal de $\text{A}\beta_{1-42}$ foram tratados durante uma semana com o extrato e, entre o sexto e sétimo dia

de tratamento, foram desafiados para avaliação do medo condicionado ao contexto (MCC).

MCC é um fenômeno que ocorre naturalmente a partir do momento em que um contexto particular se torna receoso. MCC é utilizado em modelos experimentais quando se associa um estímulo danoso (descarga elétrica, por exemplo) a um estímulo contextual neutro (um sinal sonoro ou um ambiente, por exemplo). Acredita-se que o hipocampo seja responsável pela “criação do contexto” enquanto a amígdala é pela “criação da sensação de medo”. Medo é considerado um estado de consciência consistindo em componentes associativos ou não-associativos causados pela exposição real ou imaginária a uma ameaça. Tendo em vista que medo é uma emoção essencialmente humana, o que se observa em modelos animais é uma interpretação do que seria tal emoção. No aprendizado motivado pelo medo, humanos aprendem a como evitar o medo e animais aprendem a como evitar um estado putativo semelhante ao medo (IZQUIERDO *et al.*, 2016).

Conforme padronizado no Laboratório de Neurofarmacologia, o protocolo do MCC foi executado em dois dias. No primeiro dia os animais foram colocados no interior de uma caixa de choques elétricos e foram ambientados por três minutos. Em seguida, a caixa de choques foi acionada e choques de 0,7 mA, com duração de dois segundos, foram aplicados com intervalos de 30, 60 e 40 segundos, um em relação ao anterior. Imediatamente após o terceiro choque, a fonte elétrica foi desligada e os animais foram mantidos no interior da caixa por mais um minuto. É importante ressaltar que o teste é realizado com um animal por vez. Após o teste, os animais foram retirados da caixa e a mesma era higienizada com álcool 70%.

No segundo dia, os animais eram reintroduzidos na caixa, novamente um por vez, durante cinco minutos. Quantificou-se, então, o tempo de *freezing* de cada animal. Animais saudáveis apresentam tempo de *freezing* em torno de 40 a 50%.

Todos os testes foram filmados e analisados com auxílio do software *ANY-Maze Video Tracking*[™] e conferidos manualmente.

4.12 Análise estatística

Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida por pós-teste de Bonferroni. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7[®] e foram considerados estatisticamente significativos os resultados com valores de p menores que 0,05.

Com a finalidade de garantir que os resultados obtidos através dos testes comportamentais executados neste trabalho, também serão realizados testes t de amostra única, com valor preditivo de 50%. A finalidade deste teste é prever a chance de os resultados obtidos para cada grupo terem sido ao acaso, não possuindo relação direta com melhora ou piora cognitiva. Para tanto, o cálculo foi executado segundo a fórmula abaixo:

$$T_0 = \frac{(\bar{X} - \mu_0)}{\frac{S}{\sqrt{N}}}$$

Onde, \bar{X} = média dos valores amostrais, μ_0 = valor da amostra, S = desvio padrão, e N = número amostral.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

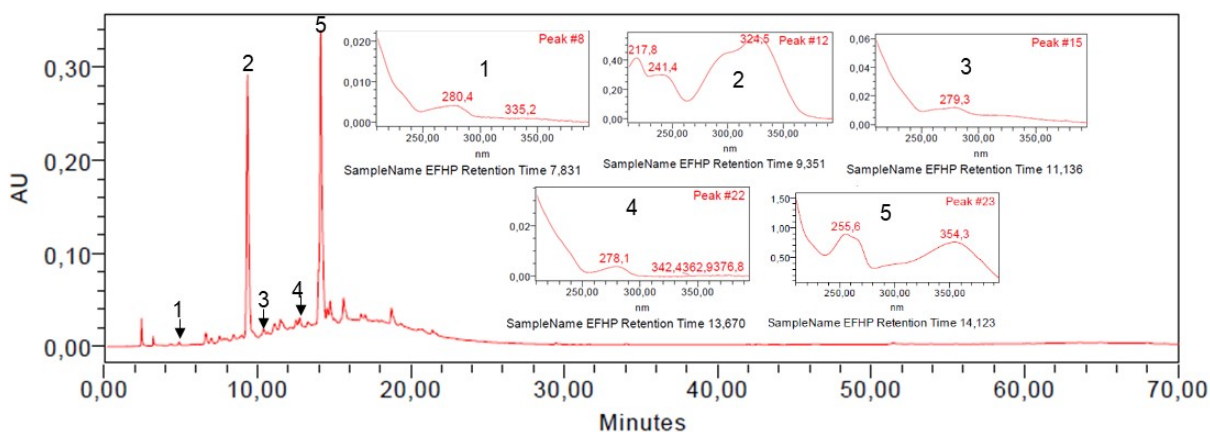
5.1 Caracterização química do extrato de *H. speciosa*

Tendo em vista os relatos na literatura do potencial efeito neuroprotetor de proantocianidinas, foi preparado um extrato em acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa*, objetivando-se obter um extrato enriquecido em substâncias daquela classe, sendo o extrato obtido denominado de HPF1.

A composição química de HPF1 foi inicialmente avaliada por HPLC-FR, utilizando-se eluição com perfil exploratório. Os picos majoritários do cromatograma obtido (**figura 5.1**) apresentaram tempos de retenção (Tr) de 9,3 e 14,1 minutos. Análises dos espectros registrados no DAD para essas substâncias indicaram λ_{\max} em torno de 217, 241 e 324 nm para o constituinte eluído em 9,3 min, valores compatíveis com ácidos orgânicos do tipo C₆-C₃, como ácido clorogênico, confirmado com a injeção de substância de referência (resultados não mostrados). Já a substância com Tr = 14,1 min apresentou λ_{\max} de 255 e 354 nm, compatíveis com um glicosídeo de flavonol, como a rutina (DEHSHAHRI *et al.*, 2012; LV *et al.*, 2015). A análise de rutina (substância de referência) nas mesmas condições confirmou a identificação desse flavonoide, o qual já havia sido previamente relatado para a espécie (SERRA *et al.*, 2005).

O cromatograma da **figura 5.1** também revelou a presença de substâncias com Tr de 7,8; 11,1; 12,7 e 13,6 minutos, que apresentaram espectro de absorção no UV com λ_{\max} de aproximadamente 280 nm, compatíveis com proantocianidinas. Apesar de se objetivar obter um extrato rico em proantocianidinas, a partir da extração com acetona:água (70:30), observa-se que os picos correspondentes a essas substâncias no extrato apresentam baixa intensidade, sugerindo baixo teor de proantocianidinas na matriz.

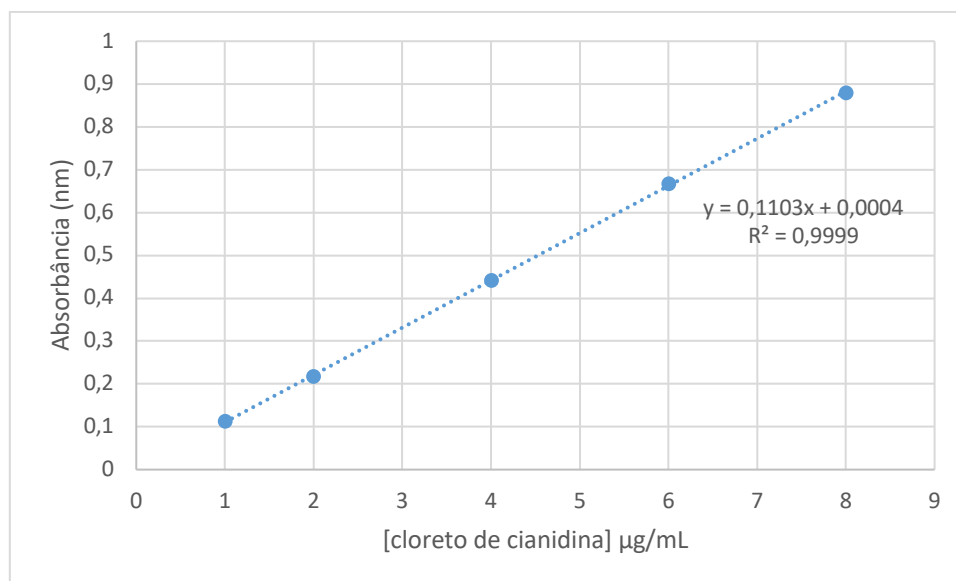
Figura 5.1: Perfil cromatográfico obtido por HPLC-FR para o extrato em acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa*. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental (item 4.8).



5.2 Quantificação de proantocianidinas no extrato acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa* por espectroscopia no UV/VIS

A curva de calibração foi construída a partir da diluição seriada da substância de referência de cloreto de cianidina em solução de *n*-butanol:HCl (95:5) e determinação da absorbância destas soluções por espectroscopia no UV/VIS, nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; e 8,0 µg/mL. A curva obtida está representada a seguir, com a respectiva equação da reta e coeficiente de correlação, conforme item 4.11 (**figura 5.2**). A curva de calibração foi feita em duplicata e obteve-se ajuste satisfatório dos dados ao modelo linear, com um valor de R^2 igual a 0,9999.

Figura 5.2: Curva de concentração-resposta da determinação da absorbância no UV/VIS de solução padrão de cloreto de cianidina.



De acordo com a curva obtida, a concentração de cloreto de cianidina nas soluções amostra foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$C = \frac{abs - 0,0004}{0,1103}$$

Para a quantificação de proantocianidinas no extrato acetona:água de folhas de *H. speciosa*, procedeu-se conforme descrito no item 4.11. Os resultados são mostrados na tabela abaixo (**tabela 5.1**).

Tabela 5.1: Teor de proantocianidinas no extrato acetona:água de folhas de *H. speciosa*, determinado segundo item 4.11.

Absorbância	[cloreto de cianidina] na solução amostra (µg/mL)	Massa de cloreto de cianidina (mg)	Teor de proantocianidinas (%)
0,627	5,68	0,28	4,73
0,57	5,16	0,26	4,30
0,576	5,21	0,26	4,34
0,623	5,64	0,28	4,70
0,608	5,51	0,27	4,60
Média ± Desvio padrão			4,50 ± 0,20

Conclui-se que o extrato obtido apresentou teor de proantocianidinas de 4,5 ± 0,20 % m/m, calculadas como cloreto de cianidina.

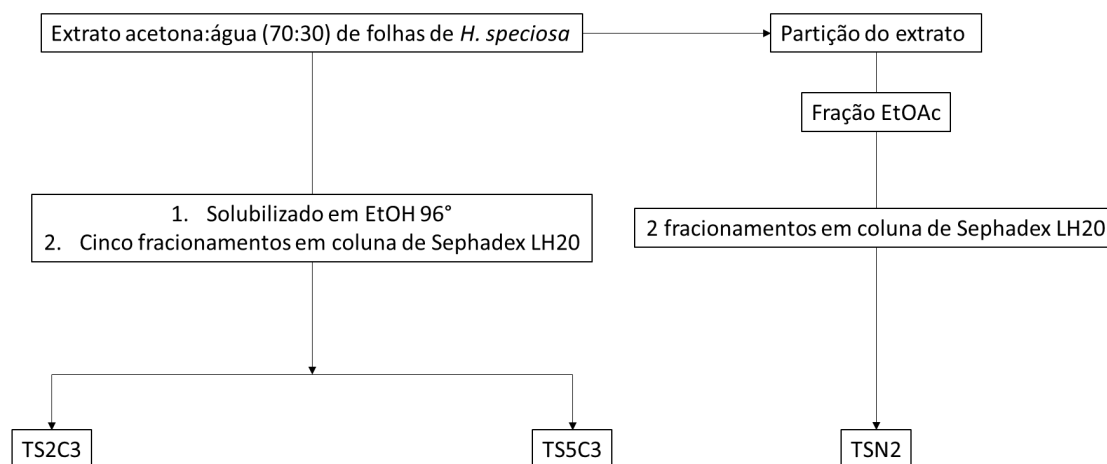
5.3 Fracionamento de HPF1 e obtenção de frações enriquecidas em proantocianidinas

Considerando o teor de proantocianidinas obtido para HPF1 na análise quantitativa, procedeu-se ao fracionamento do extrato visando obter uma fração enriquecida nessas substâncias. Devido à polaridade dos compostos presentes no extrato, o fracionamento foi realizado em coluna de Sephadex LH20, utilizando o método desenvolvido por Campana (2014). Sephadex LH20 é um polímero de polissacarídeo formado por dextrana hidroxipropilada, ligada através de ligações cruzadas. Este polímero forma pequenas esferas porosas, capazes de separar moléculas de uma mistura por mecanismo de exclusão ou filtração molecular (GE HEALTHCARE, 2007). É possível alterar o tamanho do poro do gel de acordo com o solvente empregado e, assim, obter melhor resolução cromatográfica (BRAGA, 2015).

Os fracionamentos em coluna de Sephadex LH20 foram realizados com o extrato HPF1 e, também, com uma fração em acetato de etila, obtida pela partição do extrato entre solventes imiscíveis. Foram realizadas colunas com 4 porções do extrato e com 2 porções da fração EtOAc da partição. O objetivo dessas repetições foi obter a massa das frações para os ensaios biológicos, bem como para sua caracterização química e futuro isolamento dos constituintes.

A origem das frações resultantes dos distintos fracionamentos está representada esquematicamente na **figura 5.3**.

Figura 5.3: Representação esquemática do fracionamento do extrato em acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa*, visando a obtenção de frações enriquecidas em proantocianidinas.



O primeiro fracionamento do extrato em coluna de Sephadex LH20 resultou na obtenção de uma fração enriquecida em proantocianidinas (TS1C3), porém com rendimento bastante baixo (5,4 mg). O baixo rendimento pode ser explicado pela pouca solubilidade do extrato em EtOH, pela baixa concentração de proantocianidinas no extrato, e pela capacidade de adsorção das proantocianidinas em superfícies lisa, como vidro, ou porosas, como o polímero de dextrana empregado no fracionamento (HOLLANDS *et al.*, 2017).

Tendo em vista o ocorrido, adicionou-se uma limpeza da coluna com solução de acetona:água (1:1) visando remover os compostos que pudessem permanecer retidos na coluna após a eluição (KAWAKAMI *et al.*, 2010; SHAY *et al.*, 2017).

Dos quatro fracionamentos do extrato realizados em coluna de Sephadex LH20, foram obtidas 3 frações enriquecidas em proantocianidinas: TS1C3, TS2C3 e TS5C3, com massas de 5,4 mg, 16,9 mg e 28,8 mg, respectivamente. Também foi observado que a eficiência de separação reduzia à medida em que se reutilizava a Sephadex LH20, mesmo com a adição de uma etapa a mais de limpeza. Desta forma, optou-se por não reunir essas frações obtidas.

A análise das frações por CCD demonstrou a presença de uma mancha de coloração vermelha terrosa quando revelada por vanilina sulfúrica (**figura**

5.4). Os perfis cromatográficos obtidos por HPLC-FR para estas frações indicaram a presença de quatro picos majoritários em TS1C3, cinco em TS2C3 e seis em TS5C3, cujos máximo de absorção registrados *on line* pelo detector DAD, em torno de 279-280 nm, são compatíveis com a presença de proantocianidinas (**figura 5.5**) (LV *et al.*, 2015).

Figura 5.4: Cromatograma obtido por CCD de sílica gel para as frações TS1C3, TS2C3 e TS5C3. Condições cromatográficas: eluente *n*-butanol / ácido acético / água (40:10:50); revelador: vanilina sulfúrica, seguido de aquecimento.

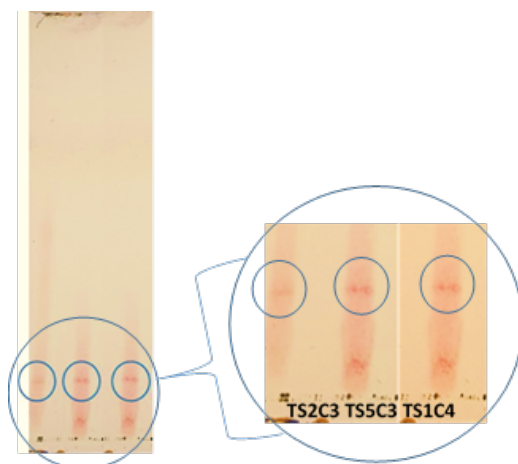
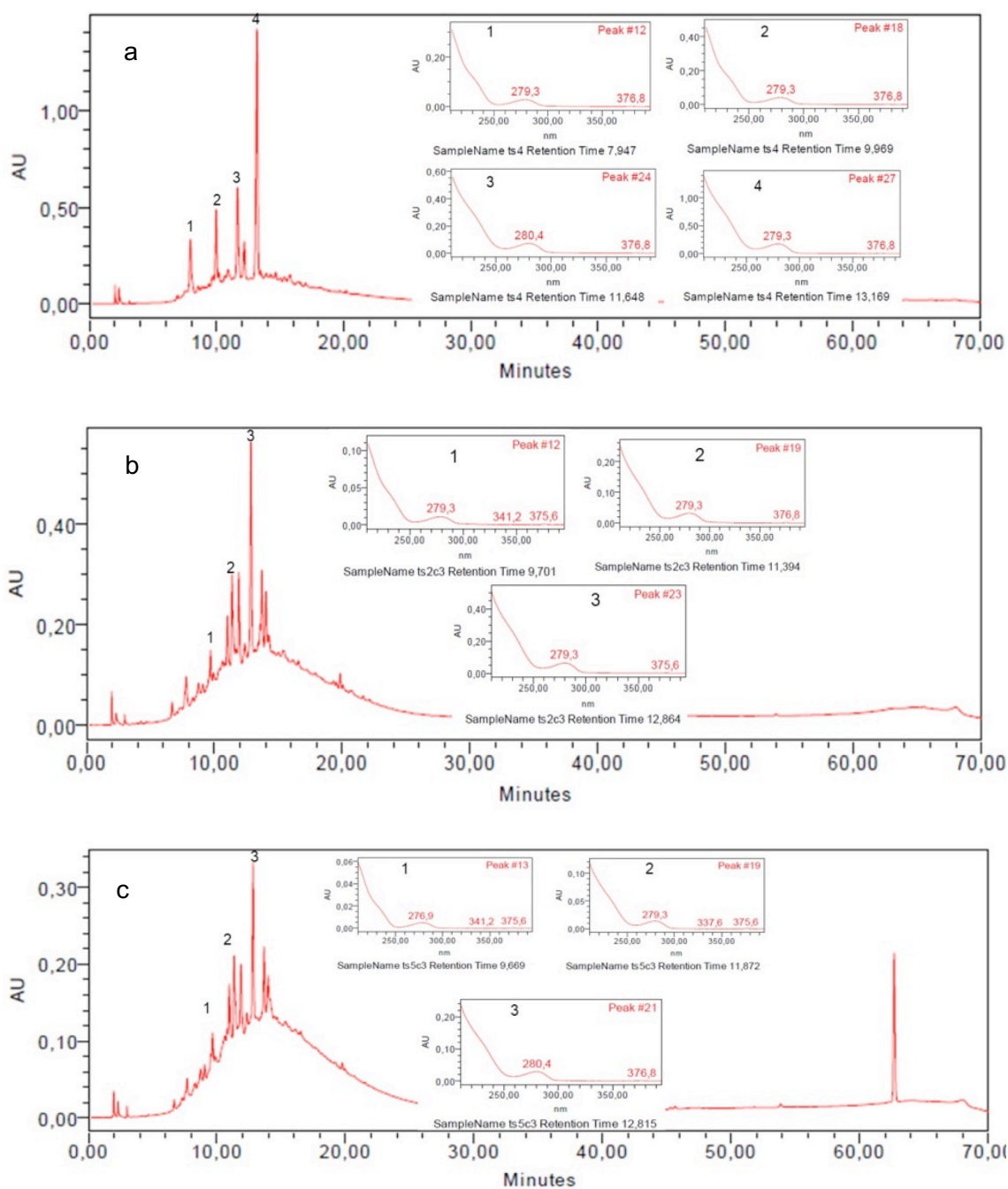


Figura 5.5: Cromatogramas obtidos por HPLC-FR para as frações (a) TS1C, (b) TS2C3 e (c) TS5C3. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.7.

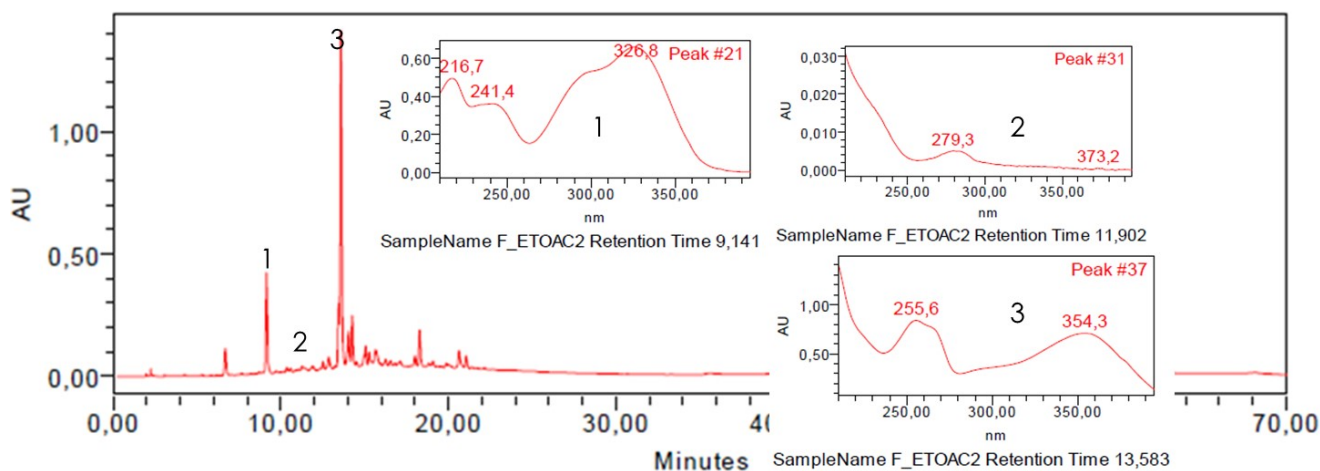


Visando obter maiores massas das frações enriquecidas em proantocianidinas, bem como otimizar o processo de obtenção da fração procedeu-se inicialmente o fracionamento do extrato acetona:água (70:30) de *H. speciosa* por partição sequencial com diferentes solventes orgânicos (*n*-hexano, diclorometano e acetato de etila). O emprego dos solventes hexano e

diclorometano objetivou remover clorofilas e compostos menos polares presentes no extrato.

A partição do extrato de *H. speciosa* entre solventes imiscíveis resultou em uma fração EtOAc com perfil mais simples, na qual se evidenciou a presença de substâncias com máximos de absorção no UV, segundo análises por HPLC-DAD, compatíveis com ácidos orgânicos do tipo C₆-C₃ (216; 241 e 327 nm), flavonoides (rutina; 255 e 354 nm) e proantocianidinas (279 nm) (**figura 5.6**). Apesar de as proantocianidinas não serem os compostos majoritários desta fração, optou-se por realizar seu fracionamento em coluna de Sephadex LH20 devido sua maior simplicidade, em relação ao extrato.

Figura 5.6: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a fração EtOAc, obtida a partir do fracionamento do extrato acetona:água de *H. speciosa* por partição entre solventes imiscíveis. Condições cromatográficas: vide parte experimental item 4.7.

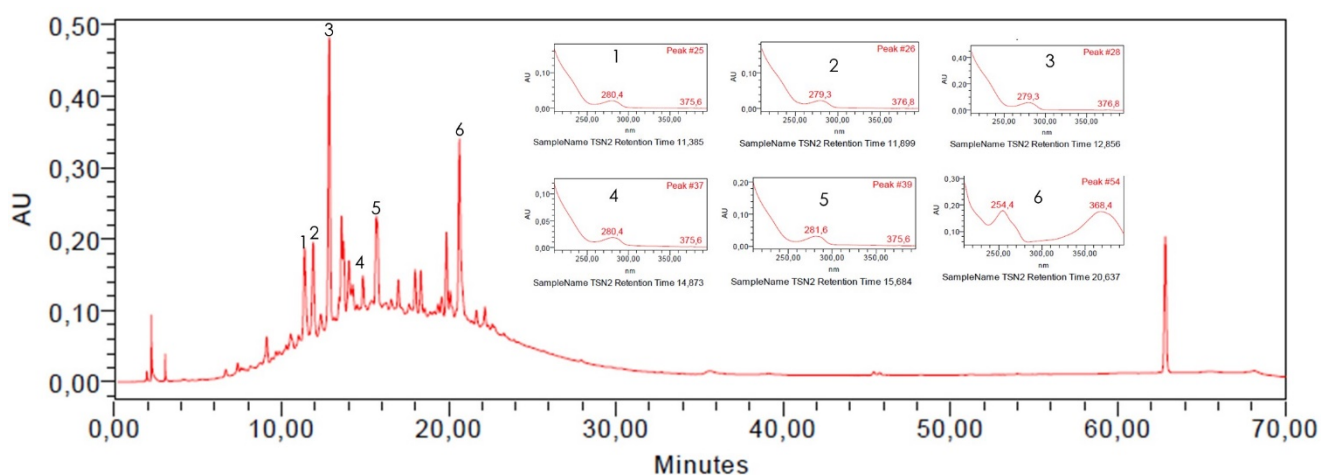


O fracionamento da fração EtOAc em coluna de Sephadex LH20 foi realizado empregando-se as mesmas condições cromatográficas utilizadas para o fracionamento do extrato (Parte Experimental, item 4.6). Neste fracionamento obteve-se a fração TSN2, com massa de 34,2 mg.

A análise de TSN2 por CCD em sílica gel demonstrou a presença de uma mancha vermelha terrosa e a presença de uma leve mancha amarelada

(resultado não mostrado). O perfil cromatográfico obtido por HPLC-FR indicou a presença de vários picos, dos quais 6 foram considerados de maior interesse para este trabalho. Os espectros obtidos pelo DAD para essas substâncias indicaram a presença majoritária de proantocianidinas ($\lambda_{\text{max}} \sim 280 \text{ nm}$; picos 1 a 5). Também foi observado um pico eluído em 20,6 minutos, com espectro indicativo da presença de flavonoide na fração (254 e 368 nm) (**figura 5.7**).

Figura 5.7: Cromatograma obtido por HPLC-FR para a fração TSN2. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.7.



Devido à menor complexidade (observada por análise em UPLC-DAD-ESI-MS/MS) e presença majoritária de proantocianidinas, além da disponibilidade de massa para execução dos ensaios biológicos, selecionou-se a fração TS2C3 para caracterização química, visando identificar as proantocianidinas presentes na fração.

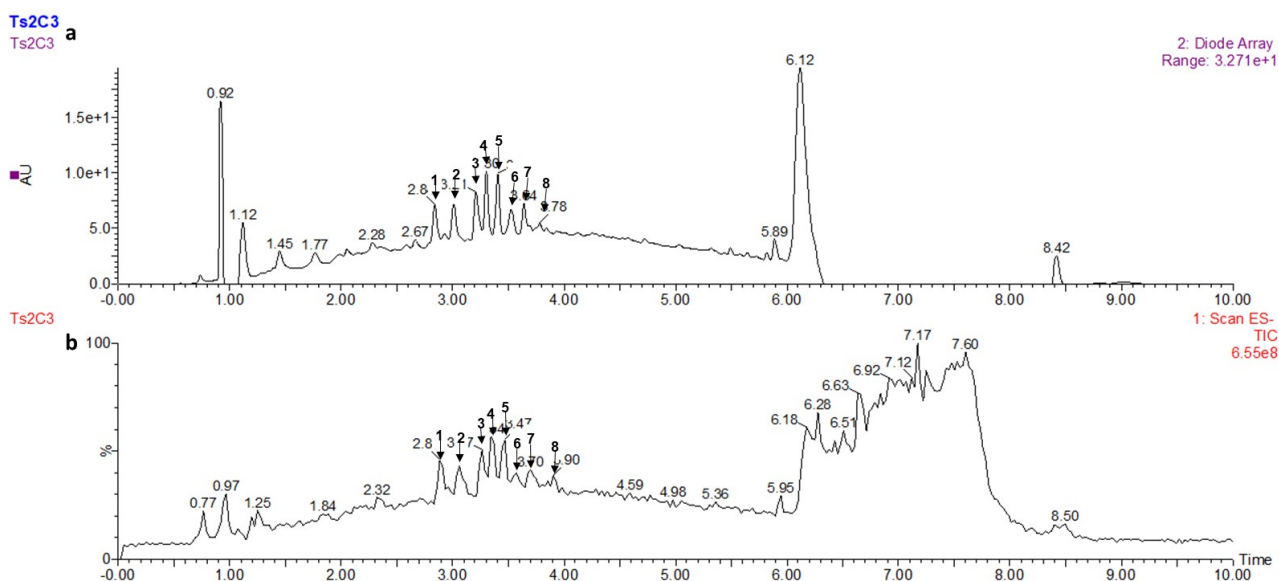
5.4 Caracterização química da fração TS2C3

A caracterização química de proantocianidinas é desafiadora devido à complexidade resultante da variabilidade estrutural das unidades de flavan-3-ol constituintes, diferentes sítios de ligação entre as unidades, possibilidade de isomeria, e número de unidades monoméricas. O emprego de cromatografia líquida de alta (HPLC) e ultra-eficiência (UPLC) é de grande auxílio na separação, e conseqüentemente na identificação de oligômeros. O uso de espectroscopia de massas com diversas fontes de ionização, como a ionização por *electrospray*, é de grande auxílio na determinação da massa de

proantocinidinas, porém não permite determinar inequivocamente a identidade química das moléculas. Isto deve-se, principalmente, ao fato de as subunidades formadoras, por exemplo a catequina e epicatequina, possuírem epímeros, ou seja, diastereoisômeros que se diferem apenas pela configuração do estereocentro, e, portanto, apresentarem a mesma massa. Assim, não é possível determinar se a molécula é composta de subunidades de catequina e/ou epicatequina, por exemplo, mesmo empregando-se a espectroscopia de massas sequencial (MS/MS) (HAYASAKA *et al.*, 2003).

Com o objetivo de caracterizar a composição química da fração TS2C3, foi realizada uma análise por UPLC-DAD-ESI-MS sendo obtidos os perfis cromatográficos com detecção no DAD em 210 nm e de íons totais (TIC) no modo negativo (figura 5.8).

Figura 5.8: Cromatogramas obtidos por UPLC-FR para a fração TS2C3. Condições cromatográficas: conforme PARTE EXPERIMENTAL (item 4.12).



Observação: (a) detecção no DAD em 210 nm; (b) íons totais (TIC) no modo negativo de ionização (ESI). Pico: 1 (Tr = 2,84 min); 2 (Tr = 3,01 min); 3 (Tr = 3,21 min); 4 (Tr = 3,30 min); 5 (Tr = 3,41 min); 6 (Tr = 3,53 min); 7 (Tr = 3,64 min); e 8 (Tr = 3,78 min).

Os cromatogramas revelaram a presença de oito picos principais. A partir destes resultados foram identificados os Tr, os máximos de absorção no UV e os íons base desprotonados para cada um destes picos. Em seguida, realizou-se espectrometria de massas sequencial para a obtenção dos íons filhos dos íons base de interesse. Os resultados obtidos foram então comparados aos

dados relatados na literatura para substâncias descritas para a espécie *H. speciosa*. Os dados espectrométricos obtidos estão dispostos na tabela 5.2.

Tabela 5.2: Dados obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS para proantocianidinas da fração TS2C3 do extrato acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa*

Pico	Tr (min)	UV-VIS ($\lambda_{\text{máx}}$)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íons filhos (m/z)	MM (g/mol)	Substância sugerida	Referência
1	2,84	279	739	571, 527, 450, 435, 339*, 289	740	Proantocianidina dimérica do tipo B C-hexosídica	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2007
2	3,01	279	739	570, 451, 436, 339*, 289, 177	740	Proantocianidina dimérica do tipo B C-hexosídica	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2007
3	3,21	279	739	450, 408, 339*, 289, 287, 177	740	Proantocianidina dimérica do tipo B C-hexosídica	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2007
4	3,30	279	739	629*, 587, 502, 339, 289, 246	740	Proantocianidina dimérica do tipo B C-hexosídica	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2007
5	3,41	275, 365	609	-	610	Rutina	BASTOS <i>et al.</i> , 2017
6	3,53	279	1027	337*, 289, 161	1028	Proantocianidina trimérica C-hexosídica	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2007
7	3,64	279	1027	329, 126*	1028	Proantocianidina trimérica C-hexosídica	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2007
8	3,78	279	739; 1027	-	-	-	-

Observação: Tr = tempo de retenção; $\lambda_{\text{máx}}$ = máximo de absorção no UV; [M-H]⁻ = íon base desprotonado; MM = massa molar; m/z = relação massa / carga, * = íon base da fragmentação.

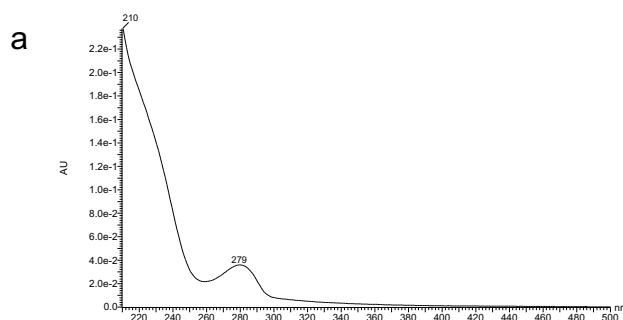
Os picos de 1 a 4 e de 6 a 8 apresentaram espectro de varredura no UV com $\lambda_{\text{máx}}$ em 279 nm (figura 5.9 a), sugerindo tratar-se de proantocianidinas (LV *et al.*, 2015).

Os espectros de massas em varredura no modo de ionização negativo, obtidos para os picos 1 (Tr = 2,84 min), 2 (Tr = 3.01 min), 3 (Tr = 3,21 min) e 4 (Tr = 3,30 min), forneceram o íon desprotonado em m/z 739 [M-H]⁻ (figura 5.9 b - e). Essa massa é compatível com proantocianidinas diméricas hexosídicas. Quando fragmentados, os íons observados nos picos 1, 2 e 3 produziram o íon filho com m/z 339 [M-290-110-H]⁻, correspondente à quebra da ligação interflavonas, com perda de uma subunidade de epi- ou catequina (M-290-H) e perda sequencial de uma unidade catecol (110 Da) (Figura 5.13). Também foi

observado o íon filho correspondente ao monômero epi- ou catequina em m/z 289 $[M-450-H]^-$ (**figura 5.10 a – d**). Adicionalmente, foi observado o íon filho em m/z 287 $[M-452-H]^-$, devido à quebra da ligação interflavona e à oxidação de uma subunidade de epi- ou catequina quando foi realizada a fragmentação do íon em m/z 739 $[M-H]^-$ proveniente do pico 3 (**figura 5.10 c**). Neste ponto é importante ressaltar que a quiralidade do carbono C3 nas unidades de *flavan-3-ol* não pode ser diferenciada por espectrometria de massas. Com base nas perdas e fragmentações observadas conclui-se que o íon em m/z 739 $[M-H]^-$ dos picos 1 ($Tr = 2,84$ min), 2 ($Tr = 3,01$ min), 3 ($Tr = 3,21$ min) é compatível com hexosídeos de proantocianidinas diméricas, provavelmente um C-hexosídeo devido à não observação de fragmentos com m/z 577 $[M-162-H]^-$ que representaria a clivagem da ligação C-O de um O-heterosídeo (RODRIGUES *et al.*, 2007).

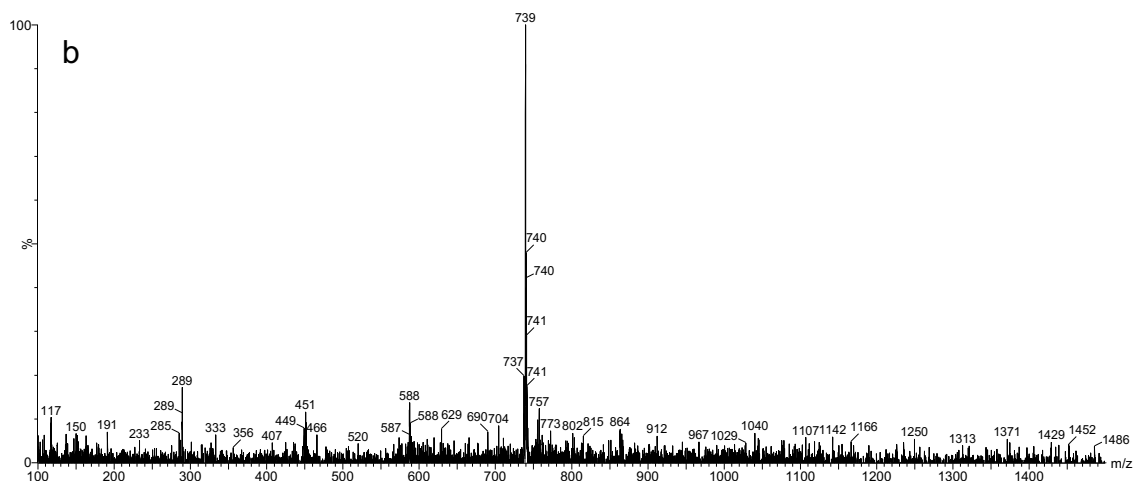
O pico 4 ($Tr = 3,30$ min), quando fragmentado, produziu o íon base em m/z 629 $[M-110-H]^-$, formado devido à perda de um resíduo catecol. A fragmentação do íon desprotonado com m/z 739 $[M-H]^-$ do pico 4 também produziu um íon filho em m/z 587 $[M-152-H]^-$, provavelmente devido a fragmentação com perda do anel B, com clivagem nas posições 1 e 3 (**figura 5.13**). Também foi gerado o íon em m/z 339 $[M-290-110-H]^-$, formado devido à perda sequencial de uma subunidade de epi- ou catequina m/z 289 $[M-290-H]^-$ e de um catecol (110 Da), conforme visto anteriormente (**figura 5.10 d**) (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Figura 5.9: Espectro no UV e espectro de massas no modo negativo de ionização para os picos 1 ($Tr = 2,84$ min), 2 ($Tr = 3,01$ min), 3 ($Tr = 3,21$ min) e 4 ($Tr = 3,30$ min).

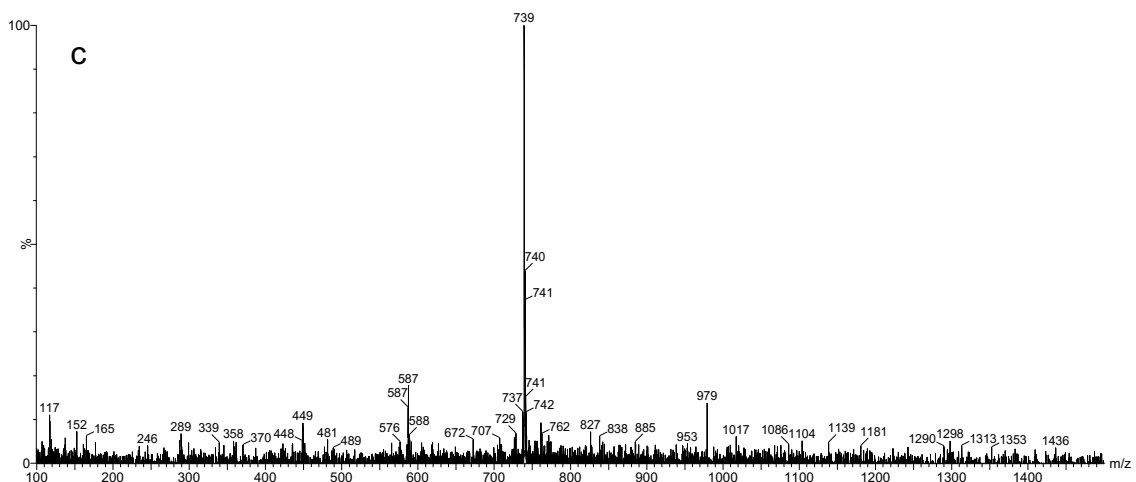


Continua abaixo

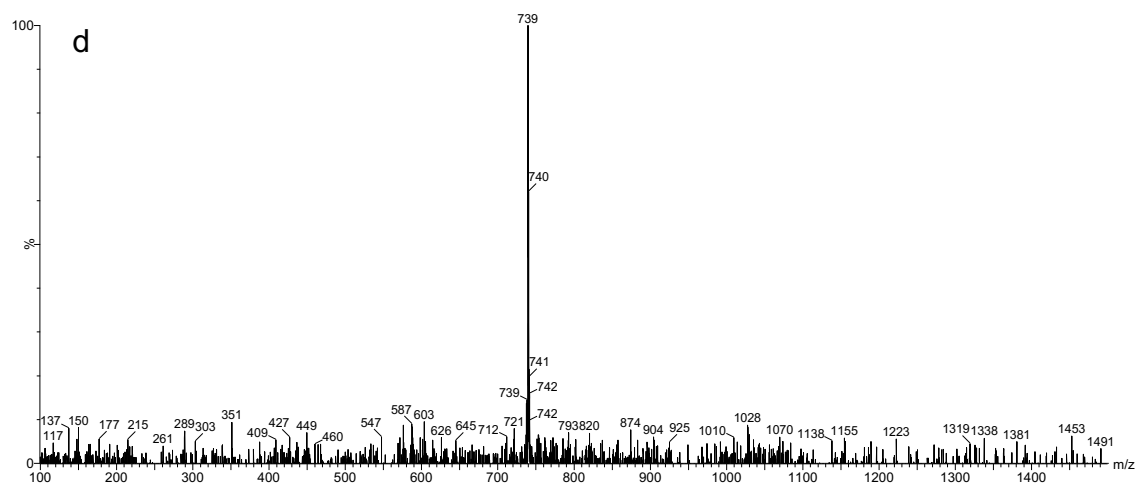
2.88 minutos



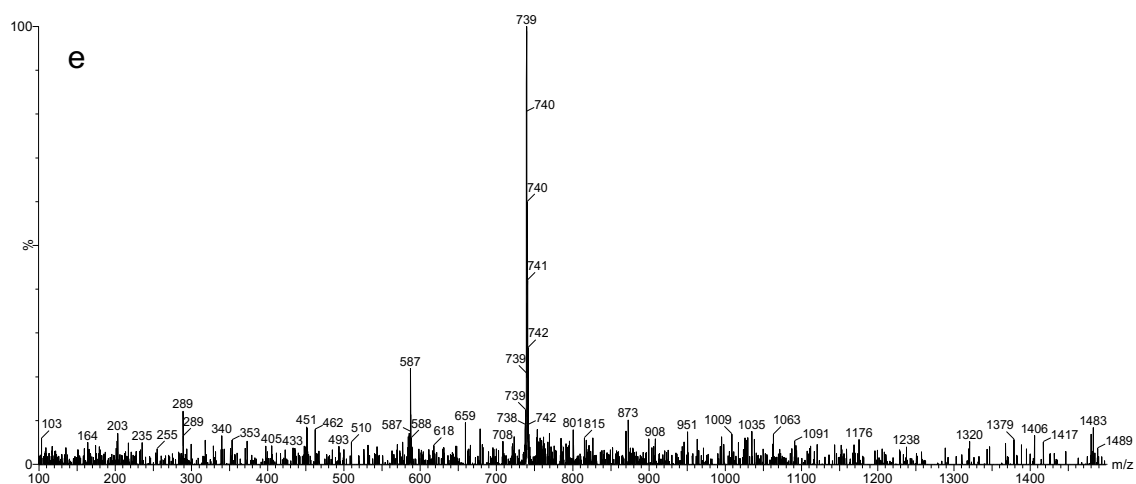
3.06 minutos



3.27 minutos



3.34 minutos

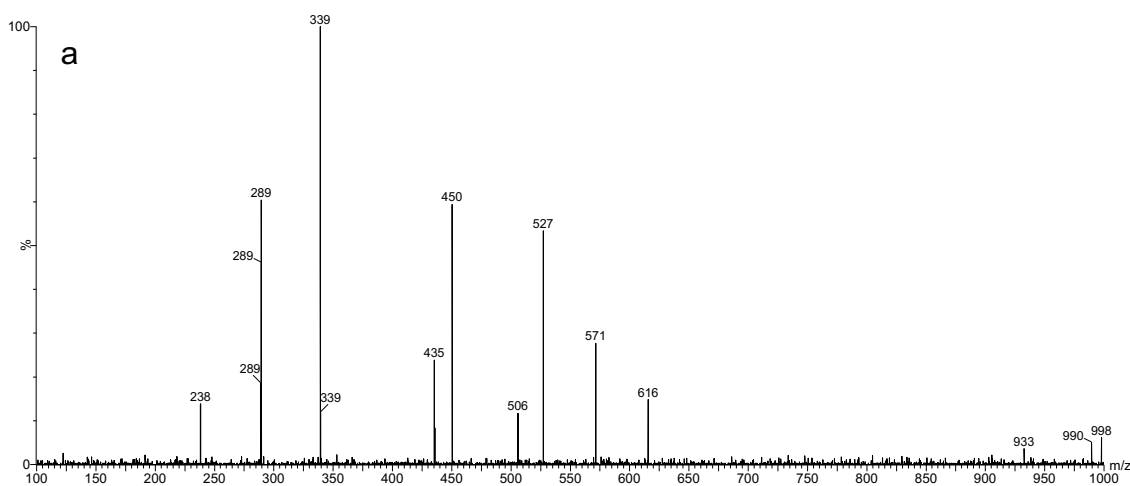


Observação: (a) espectro no UV obtido por detecção no DAD representativo para os picos 1, 2, 3 e 4; espectro de massas no modo negativo de ionização (ESI). (b) Pico: 1 (Tr = 2,84 min); (c) 2 (Tr = 3,01 min); (d) 3 (Tr = 3,21 min); (e) 4 (Tr = 3,30 min);

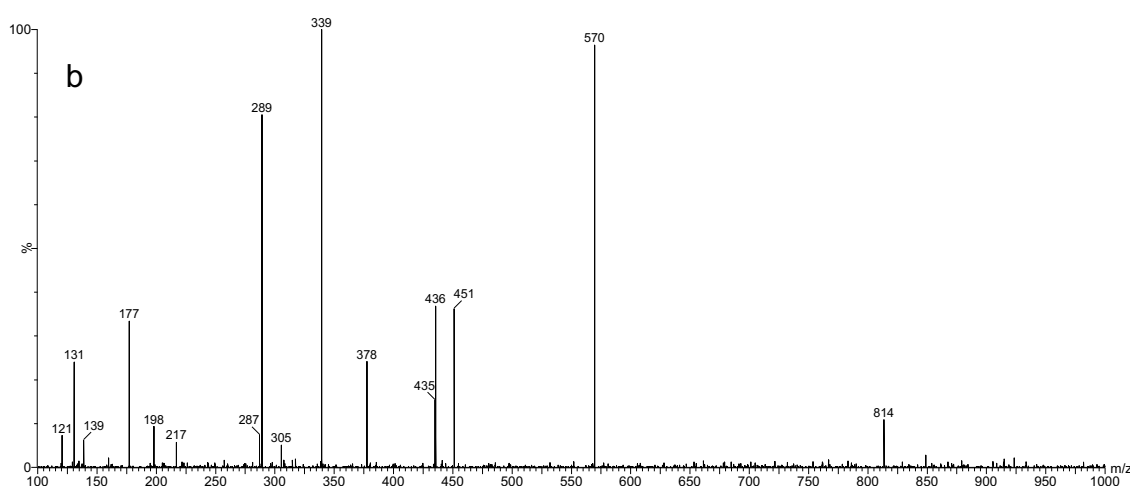
Os picos 6 (Tr = 3,53 min) e 7 (Tr = 3,64 min), conforme descrito anteriormente, também apresentaram espectro no DAD com $\lambda_{m\acute{a}x}$ em 279 nm. Estes picos apresentaram íon base em m/z 1027 $[M-H]^-$ (figura 5.11 a – b). Quando fragmentado, o íon em m/z 1027 $[M-H]^-$ do pico 6 (Tr = 3,53 min) gerou o íon base em m/z 337 $[M-H]^-$ (figura 5.12 a). Este íon pode ser gerado pelo mesmo mecanismo descrito para o íon em m/z 339 $[M-H]^-$, com uma oxidação adicional em uma das hidroxilas. A fragmentação do íon em m/z 1027 $[M-H]^-$ do pico 7 (Tr = 3,64 min) levou à formação do íon base em m/z 126 $[M-H]^-$, provavelmente devido à fragmentação de uma subunidade de epi- ou catequina. Proantocianidinas triméricas com massa de 1028 g/mol já foram descritas para extratos de caule de *H. speciosa* (RODRIGUES et al., 2007).

Figura 5.10: Espectro de massas para os íons filhos de 739 m/z $[M-H]^-$ dos picos 1 (Tr = 2,84 min), 2 (Tr = 3.01 min), 3 (Tr = 3,21 min) e 4 (Tr = 3,30 min).

2.88 minutos

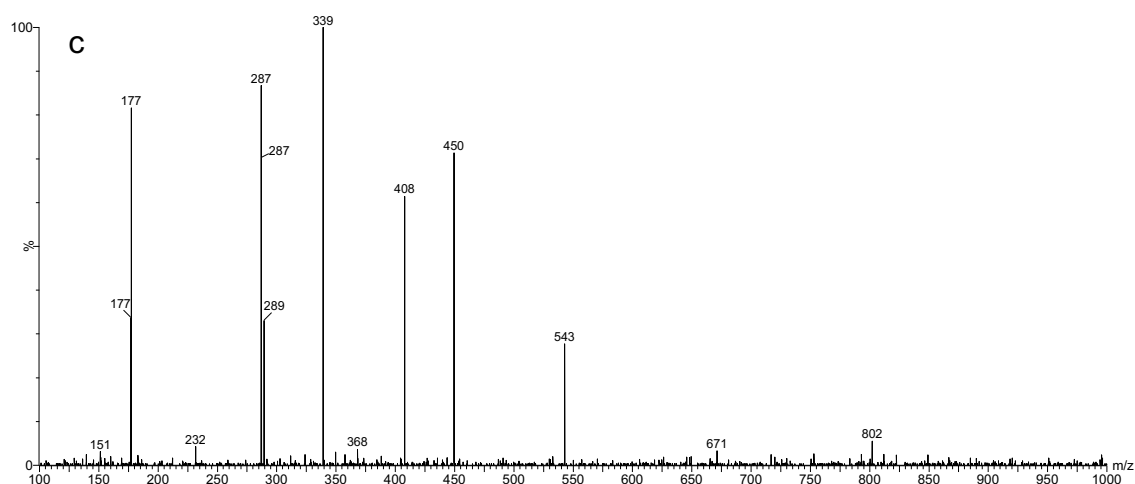


3.06 Minutos

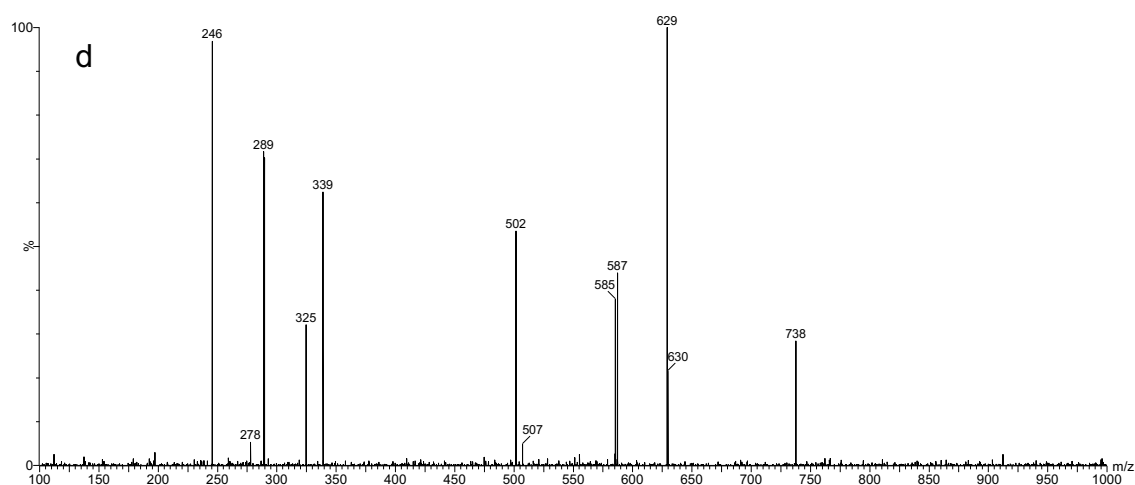


Continua abaixo

3.27 Minutos



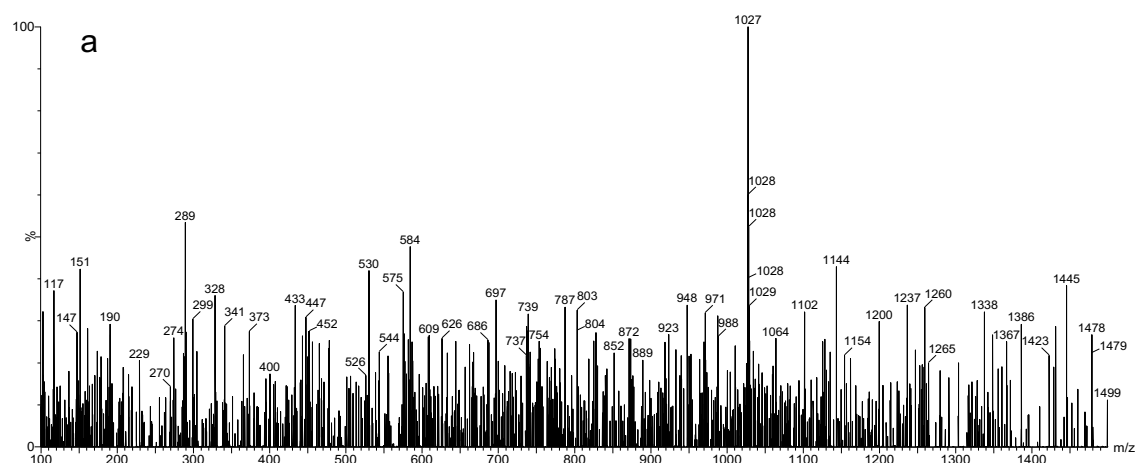
3.34 Minutos



Observação: espectro de massas no modo negativo de ionização (ESI⁻) para os íons filhos de 739 m/z [M-H]⁻ dos picos (a) 1 (Tr = 2,84 min); (b) 2 (Tr = 3,01 min); (c) 3 (Tr = 3,21 min); (d) 4 (Tr = 3,30 min).

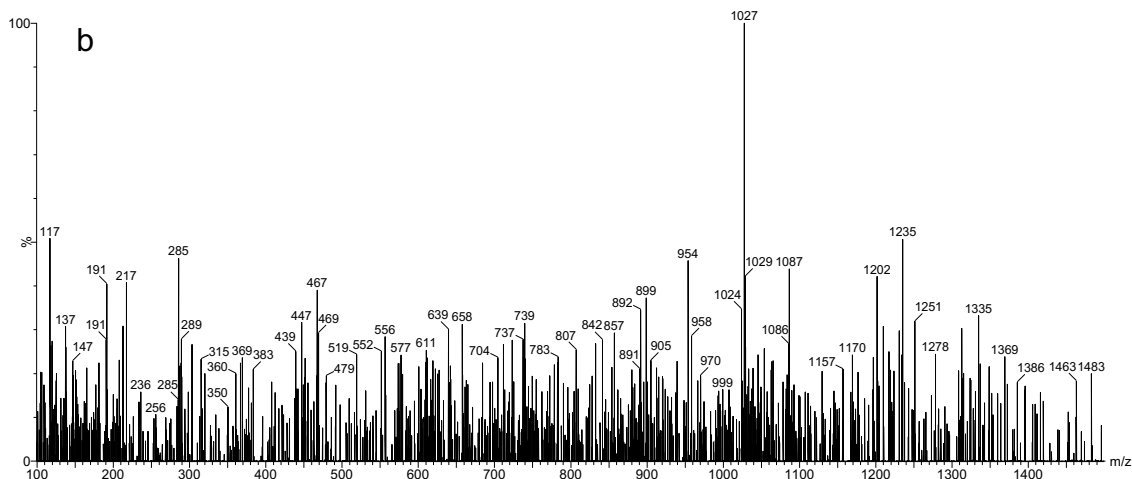
Figura 5.11: Espectro de massas no modo negativo de ionização para os picos 6 (Tr = 3,53 min) e 7 (Tr = 3,64 min).

3.60 Minutos



Continua abaixo

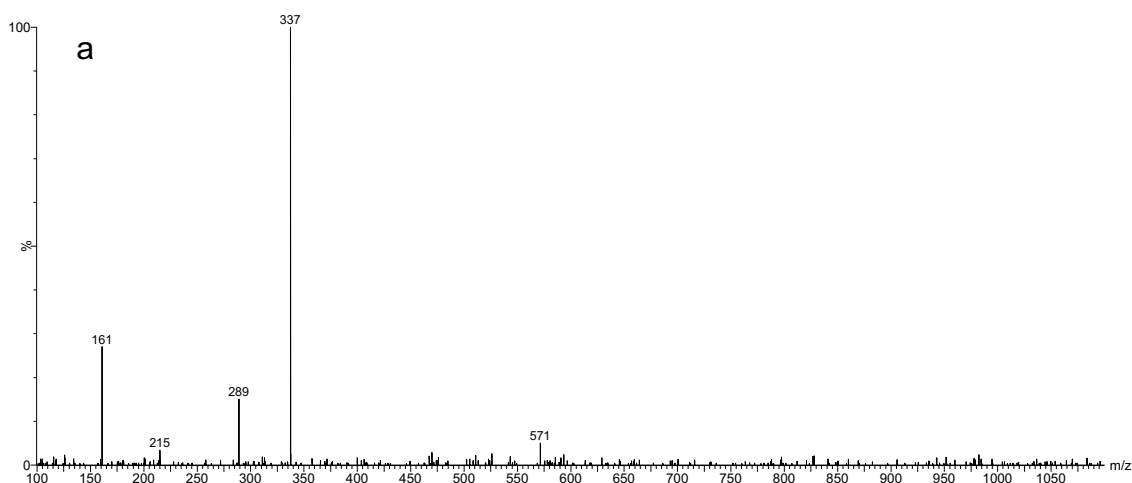
3.70 Minutos



Observação: espectro de massas no modo negativo de ionização (ESI). (a) 6 (Tr = 3,53 min) e (b) 7 (Tr = 3,64 min).

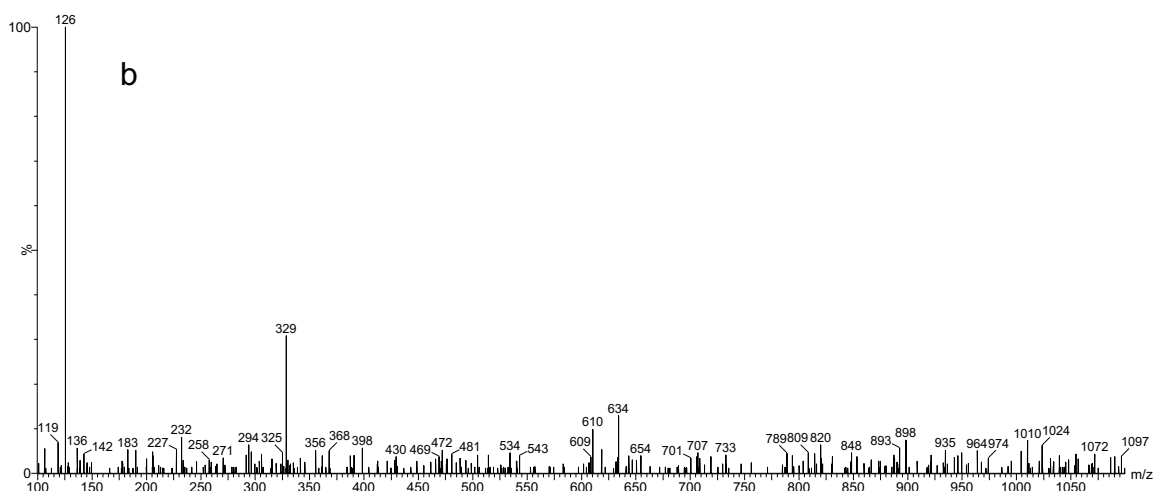
Figura 5.12: Espectro de massas para os íons filhos de 1027 m/z $[M-H]^-$ dos picos (a) 6 (Tr = 3,53 min) e (b) 7 (Tr = 3,64 min).

3.53 Minutos



Continua abaixo

3.70 Minutos

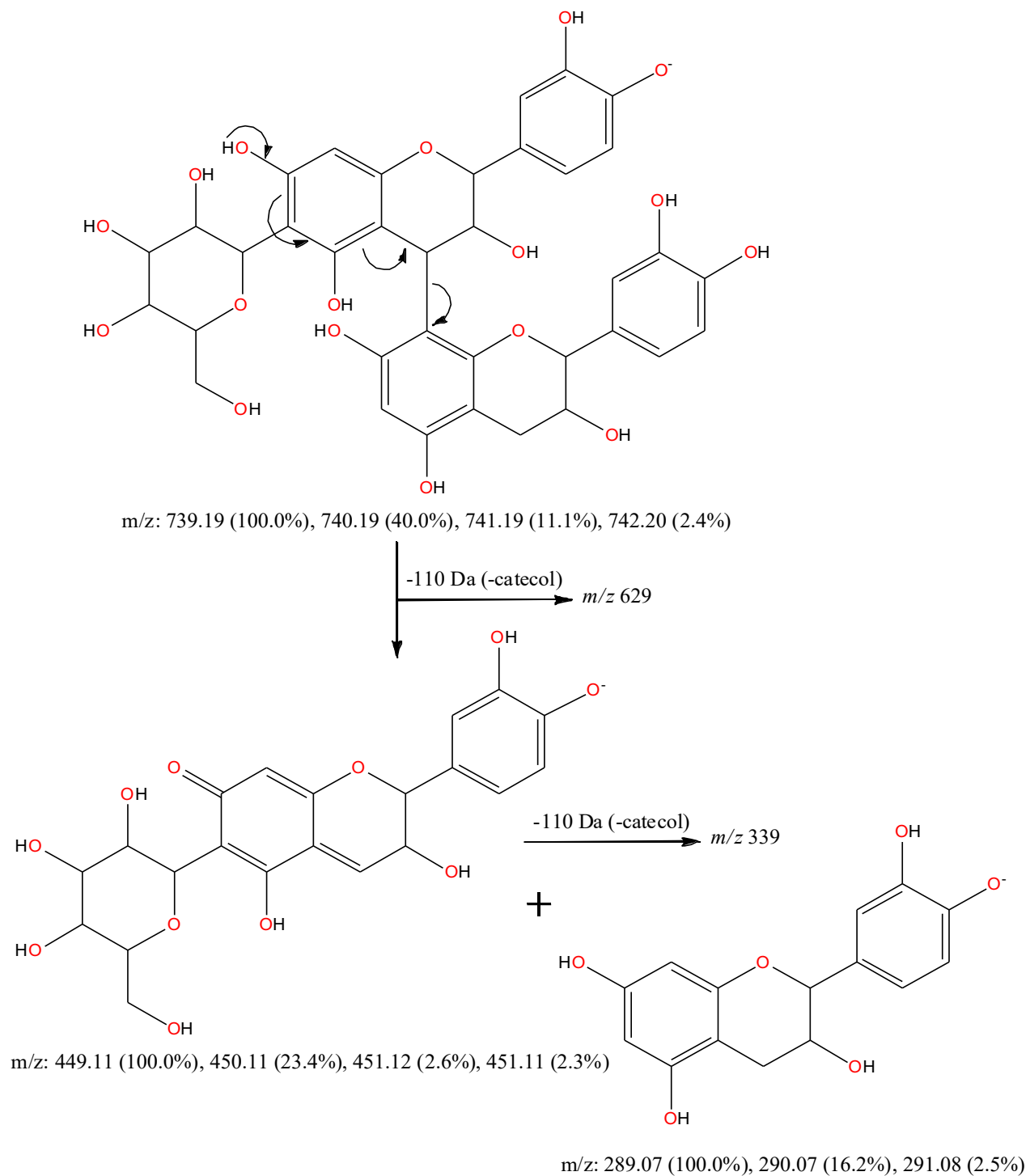


Observação: espectro de massas no modo negativo de ionização (ESI⁻) para os íons filhos de 1027 m/z [M-H]⁻ dos picos (a) 6 (Tr = 3,53 min) e (b) 7 (Tr = 3,64 min).

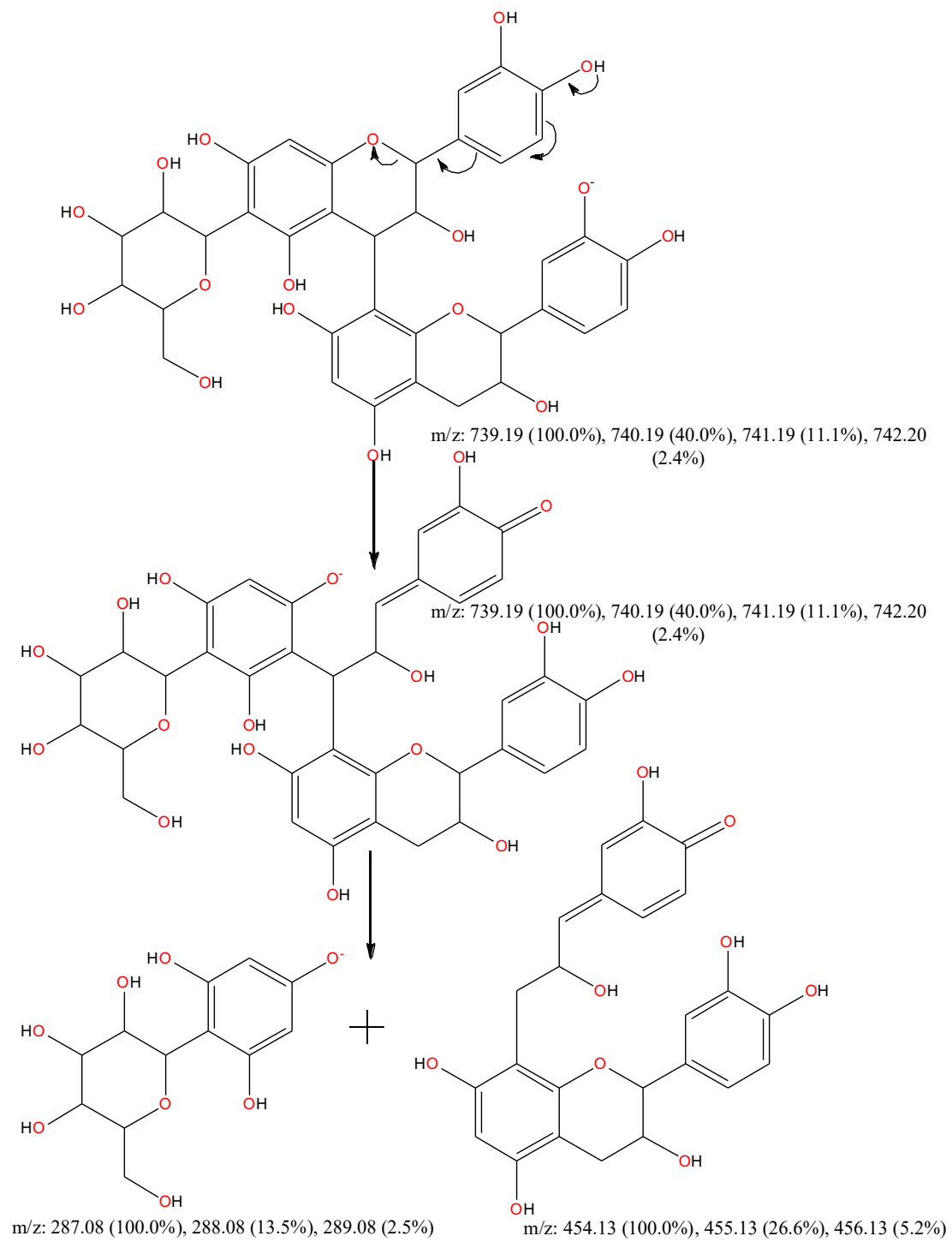
Rodrigues e colaboradores (2007) descreveram a presença de séries homólogas de proantocianidinas separadas por 288 unidades de massa. Os principais íons encontrados foram aqueles em m/z 289, 577, 865, 1153, 1441 e 1729, correspondendo às moléculas desprotonadas de monômero, dímero, trímero, tetrâmero,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

Com base nos dados apresentados neste trabalho, é possível dizer que obteve-se uma fração enriquecida em dímeros e trímeros de hexosídeos de proantocianidinas. Na figura 5.13 são mostradas propostas de fragmentação para os íons com m/z destacados. Está foi a primeira descrição da ocorrência e identificação, ainda que parcial, de proantocianidinas em folhas de *H. speciosa*.

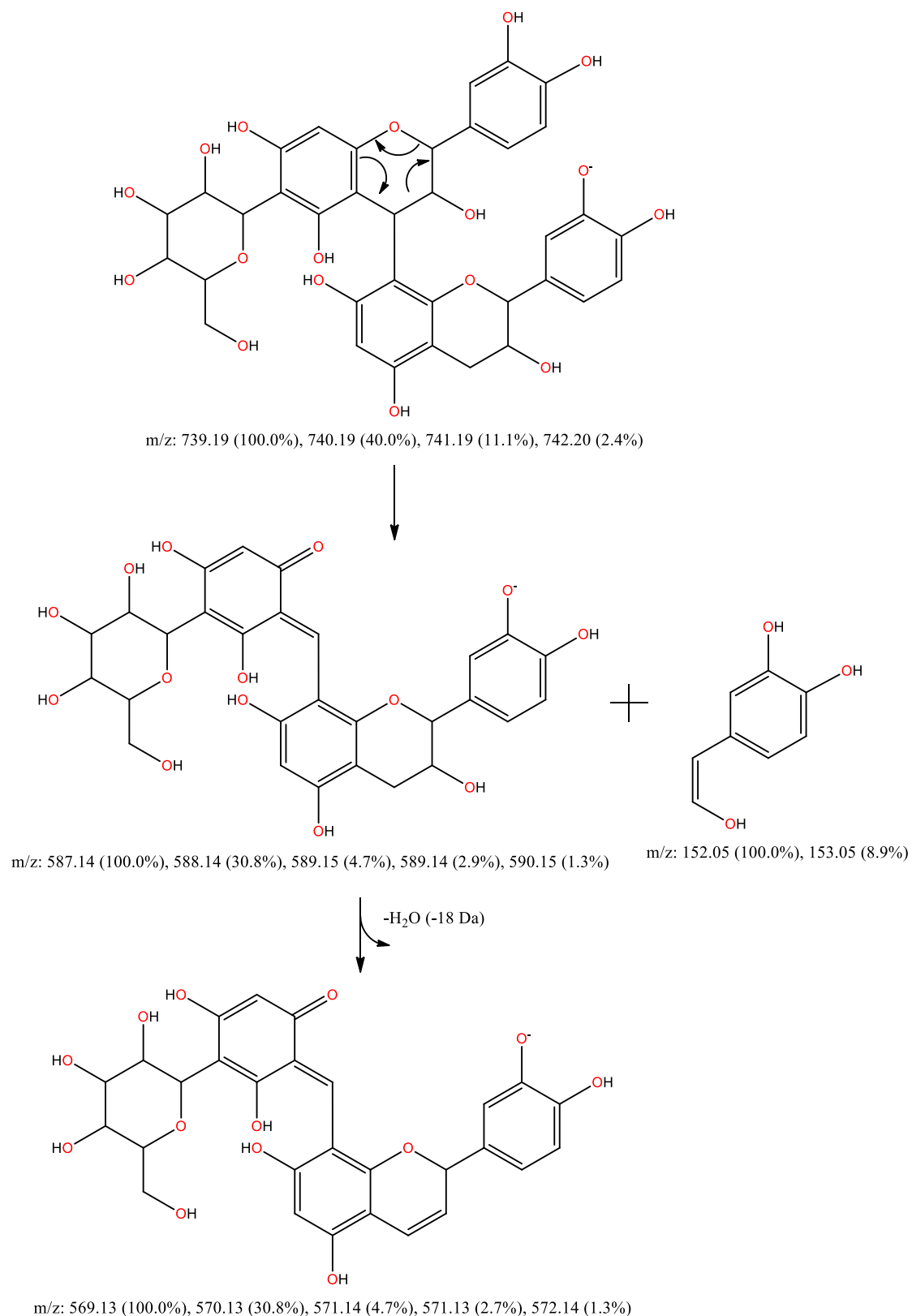
Figura 5.13: Propostas de fragmentação e prováveis estruturas dos íons obtidos pela espectrometria de massas sequencial.



Continua abaixo



Continua abaixo



Observação: mostrada a razão m/z para cada fragmento destacado, com as respectivas probabilidades de detecção de cada possível valor de m/z para um mesmo fragmento. Abordagem adotada devido ao uso de espectrômetro de massas de baixa resolução.

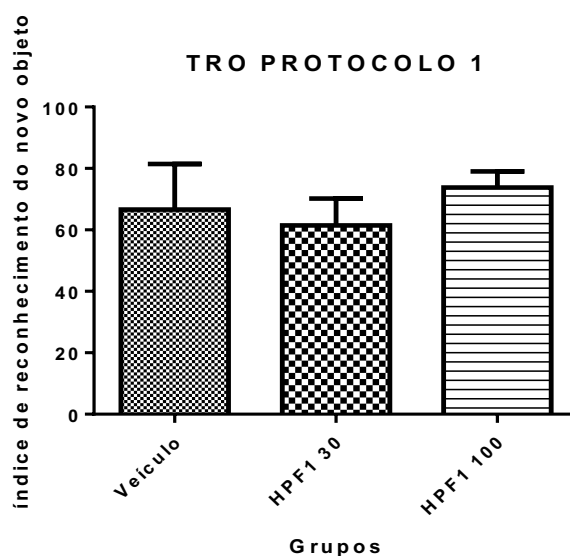
5.3 Avaliação do efeito do extrato de *H. speciosa* na função cognitiva de camundongos

Tendo em vista que estudos epidemiológicos demonstraram que a hipertensão é um fator de risco para o desencadeamento da DA (MARFANY *et al.*, 2018), no presente trabalho investigou-se o potencial neuroprotetor de extrato de *H. speciosa*, espécie cuja atividade anti-hipertensiva foi previamente descrita por nosso grupo de pesquisa. Diversas proantocianidinas possuem atividade neuroprotetora e compostos dessa classe ocorrem em *H. speciosa*. Assim, para realização dos ensaios foi obtido um extrato de folhas de *H. speciosa* em acetona:água (70:30).

Inicialmente avaliamos o efeito do extrato em acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa* (HPF1) em modelos comportamentais em camundongos, para averiguar se o mesmo causaria alterações cognitivas visando, dessa forma, garantir que os resultados obtidos posteriormente no modelo de DA estivessem diretamente relacionados ao potencial farmacológico do mesmo. Os ensaios foram realizados sobre a cognição de camundongos na Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO), conforme descrito no item 4.12.

O extrato HPF1, avaliado nas doses de 30 e 100 mg/Kg p.o. não induziu nenhuma alteração comportamental nos camundongos na TRO, apresentando índice de reconhecimento do objeto novo superior a 60%. Além disso, não foi observada diferença estatística entre os índices de reconhecimento dos animais tratados com o extrato e o dos animais tratados apenas como veículo (**figura 5.14**).

Figura 5.14: Percentual de reconhecimento do objeto novo na TRO por camundongos tratados com extrato acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa* (HPF1). Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. $p > 0,05$ para os grupos tratados com o extrato em comparação com o grupo tratado com o veículo. Número amostral, $n = 9$ para todos os grupos. Grupo veículo tratado com solução salina de CMC a 0,5% (m/v).



Observação: índice de reconhecimento do objeto novo por grupo (média \pm desvio padrão): veículo (67,52 \pm 13,96, $n = 9$); HFP1 30 mg/kg (60,66 \pm 7,74, $n = 9$); e HFP1 100 mg/kg (74,42 \pm 4,62, $n = 9$).

Para confirmar que estes resultados não foram obtidos ao acaso, realizou-se teste t de *Student* de amostra única. A estatística do teste demonstrou haver diferença destes índices de reconhecimento do valor hipotético de 50%, evidenciando que os resultados não foram obtidos ao acaso.

Tendo em vista que os resultados do tratamento com o extrato de *H. speciosa*, nas doses de 30 e 100 mg/kg, não causaram alteração cognitiva nos camundongos, prosseguiu-se o estudo da atividade neuroprotetora deste extrato em modelo murino de DA.

5.4 Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato de *H. speciosa* em modelo murino de doença de Alzheimer na TRO

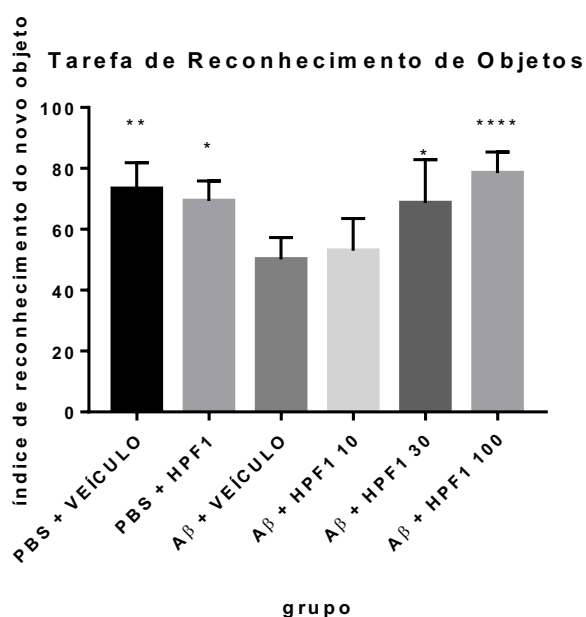
O potencial efeito neuroprotetor do extrato em acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa* (HPF1) foi avaliado *in vivo* em modelo de dano patológico induzido por A β , um modelo validado de doença de Alzheimer. Como veículo empregou-se uma suspensão de CMC a 0,5% m/v em salina, a qual promoveu a formação de uma suspensão homogênea do extrato. O extrato, administrado por gavagem, foi avaliado nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg. Como controles do experimento, foram utilizados dois grupos submetidos à estereotaxia para a injeção de PBS no hipocampo, um deles tratado apenas com veículo (controle positivo) e o outro tratado com HPF1 na dose de 30 mg/kg (controle de toxicidade), além de um grupo submetido à estereotaxia para a injeção de A β e tratado apenas com veículo (controle negativo). Os resultados são apresentados como índice de reconhecimento do objeto novo, correspondendo à porcentagem do tempo em que o animal passou interagindo com o objeto novo em relação ao tempo total de interação com os dois objetos. Este é um modelo agudo de dano patológico induzido por A β , sendo observada perda cognitiva, além de neuroinflamação e morte celular na região afetada (CHEN et al., 2010; PASSOS et al., 2010).

A TRO é uma abordagem útil para acessar o status cognitivo de camundongos. A TRO é baseada no comportamento exploratório espontâneo, com a vantagem de não exigir o fornecimento de nenhuma punição ou recompensa. Quando roedores são expostos a um objeto familiar, ao mesmo tempo que a um objeto novo, eles tendem a explorar por mais tempo o objeto novo. Este maior interesse pelo objeto novo indica que uma representação do objeto antigo (familiar) existe na memória do animal e isto compreende a base para o uso da TRO em estudos da memória (BENGOETXEA et al., 2015).

Os resultados obtidos, representados graficamente na **figura 5.15**, indicam que a injeção intra-hipocampal de A β_{1-42} foi capaz de induzir perda cognitiva nos camundongos ($50,1 \pm 7,2\%$, $n = 10$) quando comparado ao grupo controle PBS + veículo ($73,3 \pm 8,5\%$, $n = 9$) ($p < 0,01$). Este resultado é

compatível com dados descritos na literatura para este modelo de DA (LECANU *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2013). O déficit cognitivo induzido por A β ₁₋₄₂ foi revertido pelo tratamento dos camundongos com HPF1 nas doses de 30 (68,6 \pm 14,2%, n = 8) e 100 mg/kg (78,4 \pm 7,0%, n = 9) (**figura 5.15**).

Figura 5.15: Efeito do extrato de folhas de *H. speciosa* sobre a cognição de camundongos em modelo murino de DA, avaliado por meio da tarefa de reconhecimento de objetos. Os animais foram submetidos à estereotaxia para injeção intra-hipocampal de PBS ou A β ₁₋₄₂. Os resultados representam a média \pm desvio-padrão de, pelos menos, 9 animais para cada grupo. As médias foram analisadas por ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde *p < 0,05; **p < 0,01; e ****p < 0,0001.



Não há relatos na literatura de estudos realizados com extratos ou produtos isolados de *H. speciosa* em modelo de doença de Alzheimer, bem como estudos relacionados à neuroproteção. Por outro lado, estudos relatam o potencial neuroprotetor de diversos produtos naturais que também são encontrados em *H. speciosa*. Quercetina é uma das substâncias associadas ao efeito antioxidante, e o consequente efeito neuroprotetor, de extratos de *Ginkgo biloba* (SHI *et al.*, 2009). A quercetina, em baixa dose, apresenta efeito inibitório da formação de fibrilas de A β e prevenção da oxidação da glutathiona (ANSARI

et al., 2009). Rutina e quercetina foram avaliadas quanto aos seus potenciais antiamiloidogênicos, demonstrando capacidade de inibição da formação de fibrilas e desagregação das mesmas (JIMENEZ-ALIAGA, 2011).

Em um estudo realizado por Lee (2010), o tratamento de camundongos SAMP8, um modelo de senescência acelerada, com um *pool* proantocianidinas oligoméricas, na dose de 50 mg/kg; *per os*, durante 7 dias, melhorou a perda cognitiva na TRO. Outro exemplo que pode ser citado, o tratamento de camundongos com extrato de *Cynamorium songaricum* (extrato rico em ácidos orgânicos, triterpenos, sacarídeos e flavonoides), nas doses de 40 e 100 mg/kg, p.o., durante 21 dias, melhorou a perda cognitiva induzida por 5-bromodeoxyridina na TRO (YOO *et al.*, 2014).

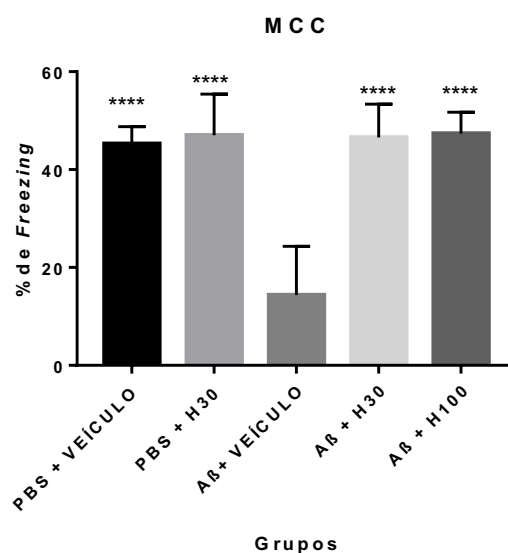
O extrato HPF1 reverteu significativamente a perda cognitiva induzida por injeção intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$, de acordo com os resultados apresentados na **figura 5.15**. A fim de comprovar o potencial farmacológico do extrato no tratamento da DA, foi realizado o ensaio do medo condicionado ao contexto como segundo teste comportamental e os resultados estão descrito no item 5.5, a seguir.

5.5 Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa* em modelo murino de doença de Alzheimer – MCC

Dando prosseguimento à avaliação do potencial neuroprotetor do extrato acetona:água (70:30) de *H. speciosa* (HFP1), procedeu-se com o paradigma do medo condicionado ao contexto. Os mesmos grupos experimentais descritos anteriormente para a tarefa de reconhecimento de objetos foram utilizados neste teste, porém não foram utilizados os mesmos animais da TRO para se evitar que houvesse algum tipo de interferência. Os resultados foram descritos em termos de porcentagem de tempo de *freezing* em relação ao tempo total de teste (5 minutos). *Freezing* pode ser uma resposta condicionada ao medo gerado por alguma condição, como uma descarga elétrica, onde animais submetidos a essa condição (“choque”) tendem a permanecer por mais tempo em *freezing* do que os não submetidos (FANSELOW, 1980). O paradigma do MCC pode ser associado ao aprendizado, tendo em vista que animais tendem a aprender como evitar situações que gerem dor (IZQUIERDO *et al.*, 2016).

Neste experimento observou-se que a injeção intra-hipocampal de A β ₁₋₄₂ é capaz de induzir perda cognitiva nos camundongos ($14,37 \pm 8,45\%$, $n = 10$) quando comparado ao grupo controle PBS + veículo ($45,27 \pm 3,53\%$, $n = 9$), sendo perda cognitiva entendida como menor tempo de *freezing* dos animais. Este resultado é compatível com o que vem sendo descrito na literatura sobre este teste comportamental (SAURA *et al.*, 2005; O'LEARY *et al.*, 2018). O déficit cognitivo induzido por A β ₁₋₄₂ foi revertido pelo tratamento dos camundongos com HPF1 nas doses de 30 ($46,55 \pm 6,81\%$, $n = 9$) e 100 mg/kg ($47,37 \pm 4,34\%$, $n = 9$) (figura 5.16).

Figura 5.16: Efeito do extrato de folhas de *H. speciosa* sobre a cognição de camundongos em modelo murino de DA, avaliado por meio do paradigma do medo condicionado ao contexto. Os animais foram submetidos à estereotaxia para injeção intra-hipocampal de PBS ou A β ₁₋₄₂. Os resultados representam a média \pm desvio-padrão de, pelos menos, 9 animais para cada grupo. As médias foram analisadas por ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde **** $p < 0,0001$.



Conforme descrito anteriormente, não existem estudos sobre a atividade neuroprotetora da *H. speciosa*. No entanto, camundongos C57Bl/6 tratados com extrato enriquecido em polifenóis de chá verde (*Camellia sinensis*), na dose de 25 mg/kg, *per os*, por 7 dias, demonstraram maior tempo de *freezing* do que os

não tratados, em modelo de dano cognitivo induzido por isoflurano (SONG *et al.*, 2019).

Os resultados apresentados pelos dois testes comportamentais realizados indicam que o extrato HPF1 reverteu significativamente a perda cognitiva induzida por injeção intra-hipocampal de A β ₁₋₄₂ nas doses de 30 e 100 mg/kg (**figura 5.15 e 5.16**).

Em um estudo realizado por Yimam e colaboradores (2016), os autores demonstraram que o tratamento de ratos transgênicos Fischer 344, *per os*, com extratos de *Scutellaria baicalensis* e *Acacia catechu*, ricos em compostos polifenólicos, nas doses de 7 e 34 mg/kg, por 11 semanas, melhorou significativamente a capacidade cognitiva destes animais, quando testados em testes comportamentais, como o labirinto aquático de Morris, o medo condicionado ao contexto e a tarefa de reconhecimento de objetos. Estudo clínico realizado neste mesmo trabalho demonstrou que humanos saudáveis, tratados com os mesmos extratos na dose de 300 mg/dia, *per os*, por 11 semanas, demonstraram maior agilidade em processar informações complexas relativas à execução de tarefas computacionais, quando comparados ao grupo placebo.

Conforme citado anteriormente, diversos metabólitos secundários já descritos para o extrato de *H. speciosa* apresentaram efeito benéfico em modelo de Alzheimer, como a quercetina (ANSARI *et al.*, 2009), a rutina (JIMENEZ-ALIAGA, 2011) e proantocianidinas (WANG *et al.*, 2012). Tendo em vista os resultados apresentados nos testes comportamentais empregados, tanto na TRO quanto na MCC, o extrato HPF1 mostrou-se capaz de reverter o dano cognitivo induzido por A β ₁₋₄₂.

Para o prosseguimento dos estudos, os encéfalos dos camundongos utilizados neste trabalho foram removidos e mantidos em freezer à -80°C para futuras análises bioquímicas e histológicas. Propõe-se realizar testes de viabilidade celular, por técnica de NISSL, avaliar a neuroinflamação, por IBA-1 e morte neuronal, por FluoroJade-C.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo fitoquímico de *H. speciosa* levou à obtenção de uma fração enriquecida em proantocianidinas, cujos resultados iniciais indicam tratar-se de proantocianidias diméricas e triméricas associadas a um resíduo de hexose ou desoxihexose. O extrato acetona:água (70:30) de folhas de *H. speciosa* demonstrou promissora atividade neuroprotetora *in vivo*, nas doses de 30 e 100 mg/kg, em modelo murino de DA induzida por injeção intra-hipocampal de A β ₁₋₄₂. Este efeito foi evidenciado por dois testes comportamentais distintos que visam acessar a capacidade cognitiva dos camundongos, a TRO e o MCC. Também não foi observado efeito tóxico ou que comprometesse de alguma forma a cognição destes animais.

Ainda são necessários novos estudos para verificar se esta melhora cognitiva pode ser confirmada por dados histológicos, através de testes que demonstrem os efeitos do tratamento destes animais sobre a morte e viabilidade celular e sobre a neuroinflamação no hipocampo. Também são necessários outros experimentos, como a ressonância magnética nuclear, para confirmar a identidade química das moléculas que constituem a fração enriquecida em proantocianidinas além da avaliação dessa fração e seus constituintes isolados em modelo de DA.

REFERÊNCIAS

- AHMAD *et al.*. Therapeutic Study of Phytochemicals Against Cancer and Alzheimer's Disease Management. **Current Drug Metabolism**. V. 21. 2020
- ALLAHYARI *et al.*. Triggering Reactive Gliosis In Vivo by a Forebrain Stab Injury. **Journal of Visualized Experiments**. V. 100. 2015.
- ALLAHYARI *et al.*. Triggering Reactive Gliosis *In Vivo* by a Forebrain Stab Injury. **J. Vis. Exp.** V. 100. 2015.
- ALZHEIMER, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde [On a peculiar, severe disease process of the cerebral cortex]. *Allg Z Psychiat*; 1907, 64: 146–148. Traduzido para o inglês em: MARTIN STRASSNIG, MD; and MARY GANGULI, MD, MPH About a Peculiar Disease of the Cerebral Cortex: Alzheimer's Original Case. **Psychiatry**, p. 30-33, 2005.
- AMADORO *et al.*. N-terminal tau truncation in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD): Developing a novel diagnostic and therapeutic approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 3. 2019.
- ANDREASSON *et al.*. Targeting innate immunity for neurodegenerative disorders of the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**. V. 138, p. 653-693. 2016.
- ANSARI *et al.*. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta (1-42): relevance to Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**. V. 20, n. 4, p. 269-75. 2009.
- ANSARI *et al.*. Protective Effect of Quercetin in Primary Neurons Against A β (1-42): Relevance to Alzheimer's Disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**. V. 20, P. 269-275. 2009
- APRAHAMIAN *et al.*. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. **Revista Brasileira Clínica Médica**. v. 21, p. 2655-2658. 2011..
- BAHAR *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**. v. 11, p. 2605-2619. 2017.

BARROS, I.M.C. *Contribuição ao estudo químico e biológico de Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae)*. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, 2008. 194p.

BASTOS *et al.*. Identification of Phenolic Compounds from *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) Leaves by UHPLC Orbitrap-HRMS. **Molecules**. V. 22, n. 143. 2017.

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.

BENAVIDES *et al.*. Catechin derivatives in *Jatropha macrantha* stems: Characterisation and LC/ESI/MS/MS quali-quantitative analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 40, n.3, p. 639–647. 2006.

BENGOETXEA *et al.*. Object recognition test for studying cognitive impairments in animal models of Alzheimer's disease. **Frontiers in Bioscience**. V. 7, p. 10-29. 2015.

BOLOGNESI, M. L. *et al.*. Multitargeted drugs discovery: Balancing anti-amyloid and anticholinesterase capacity in a single chemical entity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 21, p. 2655-2658. 2011.

BOMBARDI DUARTE, *et al.*. Literature Evidence and ARRIVE Assessment on Neuroprotective Effects of Flavonols in Neurodegenerative Diseases' Models. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**. V. 17, n. 1, p. 34–42. 2017.

BOSTANCIKLIOĞLU. An update on the interactions between Alzheimer's disease, autophagy and inflammation. **Gene**. V. 705, p. 157–166. 2019.

BRAGA, E. U. Estudo Fitoquímico de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. 2015. 57p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. Universidade Federal da Bahia.

BRASIL, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Demográfico. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Alzheimer. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**. Brasília, 2013.

CALLEMIEN *et al.*. Use of RP-HPLC-ESI(-)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. V. 66, v. 2, p. 109–115. 2008.

CAMPANA, P. R. V. Espécies vegetais e produtos naturais com potencial atividade antiartrítica: fitoquímica e atividade anti-TNF- α de *Mansoa hirsuta* e *Ouratea semiserrata*. 2014. 266p. Tese de doutorado (Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

CASTRO-GOMEZ *et al.*. Neuroinflammation as motor of Alzheimer's disease. **Nervenarzt**. V. 90, n. 9, p. 898–906. 2019.

CAZARIM *et al.*. Perspectives for treating Alzheimer's disease: a review on promising pharmacological substances. **Sao Paulo Med J**. v 134, n 4, p 342-354. 2016.

CHAAYA *et al.*. An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. V. 92, p. 43-54. 2018.

CHAI *et al.*. P-glycoprotein: A role in the export of amyloid- β in Alzheimer's disease? **The FEBS Journal**. P. 1–14. 2019.

CHEN *et al.*. DMXB (GTS-21) Ameliorates the Cognitive Deficits in Beta Amyloid_{25–35} - Injected Mice Through Preventing the Dysfunction of Alpha₇ Nicotinic Receptor. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 8, p. 1784–1794, 2010.

ČOLOVIĆ *et al.*. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**. v 11, p 315-335. 2013.

CORTÉS *et al.*. Behavioral and Neuropsychiatric Disorders in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**. V. 63, n 3, p. 899–910. 2018.

COSTA *et al.*. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the cerrado, Brazil. **Phytotherapy Research**, v.22, p.705-707, 2008.

CURZON *et al.*. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 2.

DAJAS. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 143, n. 2. 2012.

DAS *et al.*. Potential therapeutic roles of retinoids for prevention of neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**. V. 14, n. 11, p. 1880–1892. 2019.

DECZKOWSKA *et al.*. Disease-associated microglia: a universal immune sensor of neurodegeneration. **Cell**. V. 173, p. 1073-1081. 2018.

DEHSHAHRI *et al.*, 2012 Antioxidant activity of methanolic leaf extract of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. **Research in Pharmaceutical Sciences**. V. 7, n. 2, p. 111-118. 2012.

DESCAMPS *et al.*. A β PP-selective BACE inhibitors (ASBI): Novel class of therapeutic agents for Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 37, n. 2, p. 343–355. 2013.

DESPLATS *et al.*. Microglial memory of early life stress and inflammation: susceptibility to neurodegeneration in adulthood. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. September), p. 0–1. 2019.

DIAS, K. S. T. e VIEGAS JUNIOR, C. Multi-Target Directed Drugs: A Modern Approach for Design of New Drugs for the treatment of Alzheimer's Disease. **Current Neuropharmacology**. v 12, p 239-255. 2014.

DONG *et al.*. Preparation of A-type proanthocyanidin dimers from peanut skins and persimmon pulp and comparison of the antioxidant activity of A-type and B-type dimers. **Fitoterapia**. v. 91, p. 128–139. 2013.

DONG. Protective effect of proanthocyanidins in cadmium induced neurotoxicity in mice, *Drug Research*. V. 65, p. 555–560. 2015.

DUBOISA *et al.*. Timely diagnosis for alzheimer's disease: A literature review on benefits and challenges. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 49, n. 3, p. 617–631. 2016.

ENDRINGER *et al.*. NF- κ B inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 1064–1069. 2009.

ENDRINGER, D. C. (2007). Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer. 2007. 259 p.

FERNÁNDEZ-MORALES *et al.*. Stabilizers of neuronal and mitochondrial calcium cycling as a strategy for developing a medicine for Alzheimer's disease. **ACS Chemical Neuroscience**. V. 3, p. 873–883. 2012.

FERREIRA *et al.*. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancorniaspeciosavia* phosphatidylinositol-3-kinase. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n.1, p.161-164. 2007b.

FERREIRA *et al.*. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancorniaspeciosain* rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**,v.14, p.473-478. 2007a.

GAN *et al.*. Separation and preparation of 6-gingerol from molecular distillation residue of Yunnan ginger rhizomes by high-speed counter-current chromatography and the antioxidant activity of ginger oils in vitro. **Journal of Chromatography B**. V. 1011, p. 99–107. 2016.

GE HEALTHCARE. Sephadex LH-20. Data file 18-1107-22 AB. Suécia. Elanders Östervåla, 2007

GIL-CHÁVEZ *et al.*. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. Compr. **Reviews in Food Science and Food Safety**. V. 12, p. 5–23. 2013.

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

GONG *et al.*. Ameliorative effect of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive impairment and brain aging induced by D-galactose, **Exp. Gerontol.** 74 (2016) 21–28.

GREENBERG *et al.*. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease - one peptide, two pathways. **Nature Reviews. Neurology**. v. 16. 2019.

GUNN *et al.*. Amyloid- β peptide A β 3pE-42 induces lipid peroxidation, membrane permeabilization, and calcium influx in neurons. **Journal of Biological Chemistry**. V. 291, p. 6134–6145. 2016.

GUO *et al.*. Cranberry extract standardized for proanthocyanidins alleviates β -amyloid peptide toxicity by improving proteostasis through HSF-1 in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences**. V. 71, p. 1564–1573. 2015.

HAHR. Physiology of the Alzheimer's disease. **Medical Hypotheses**. V. 85, n. 6, p. 944–946. 2015.

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.

Hancornia in **Flora Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB15558>. Acesso em: 10/02/2020.

HAYASAKA *et al.*. Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. V. 17, n. 1, p. 9–16. 2003.

HOLLANDS *et al.*. Development, validation and evaluation of an analytical method for the determination of monomeric and oligomeric procyanidins in apple extracts. **Journal of Chromatography A**. v. 28, n. 1495, p. 46-56. 2017

HORVATH *et al.*. Quantitative review finds no evidence of cognitive effects in healthy populations from single-session transcranial direct current stimulation (tDCS). **Brain Stimulation**. v. 8, n. 3, p. 535–550. 2015.

HUANG *et al.*. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. **Journal of Biomedical Science**. V. 27, n. 1. 2020.

IAHTISHAM-UL-HAQ *et al.*. Health benefits of anthocyanins in black carrot (*Daucus carota*), in: M.R. Goyal, H.A.R. Suleria (Eds.), *Human Health Benefits of Plant Bioactive Compounds: Potentials and Prospects*. **Apple Academic Press**. 2019.

IHARA *et al.*. Relative neuron loss in hippocampal sclerosis of aging and Alzheimer disease. **Annals of Neurology**. p. 1–13. 2018.

ITTNER *et al.*. Dendritic Tau in Alzheimer's Disease. **Neuron**. V. 99, n.1, p. 13–27. 2018.

IZQUIERDO *et al.*. Fear memory. **Physiological Reviews**. V. 96, p. 695–750. 2016.

JANG *et al.*. Barrel topology of Alzheimer's β -amyloid ion channels. **Journal of Molecular Biology**. V. 404, p. 917–934. 2010.

JIMENEZ-ALIAGA *et al.*. Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APP_{swe} cells. **Life Sciences**. V. 89, p. 25-26. 2011.

JOCHEMSEN *et al.*. Arterial stiffness and progression of structural brain changes The SMART-MR study. **Neurology**. V. 84, n. 5, p. 448–55. 2015.

JOE *et al.*. Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: clinical management and prevention. **British Medical Journal (Clinical research ed.)**. V. 367. 2019.

JTARASOFF-CONWAY *et al.*. Clearance systems in the brain - Implications for Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**. v. 11, n. 8, p. 457–470. 2015.

KAWAKAMI *et al.*. (*Diospyros kaki*) and their α -amylase inhibitory activity. Bioscience. **Biotechnology and Biochemistry**. v.74, n.7, p. 1380-1385. 2010.

KIM *et al.*. A Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease Focused on Immune-inflammatory Modulation. **Dementia and Neurocognitive Disorders**. V. 18, n. 2, p. 33. 2010.

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.

KLEIN *et al.*. Ação hipoglicemiante da *Hancornia* sp em diabetes induzido por aloxana. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14,

Florianópolis. Resumos...Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, p.133. 1996.

KY *et al.*. Tannins, in: B. Caballero, P.M. Finglas, F. Toldrá (Eds.), **Encyclopedia of and Health**, Academic Press, Oxford, 2016, pp. 247–255.

LAZZARI *et al.*. A β 42 oligomers selectively disrupt neuronal calcium release. **Neurobiology of Aging**. 36, 877–885. 2015.

LECANU *et al.*. Modeling Alzheimer ' s disease with non-transgenic rat models, **Alzheimer's Research & Therapy**. V. 5, n. 3, p. 17. 2013.

LEDERMAN *et al.*. Mangaba (*Hancorniaspeciosa* Gomez). Jaboticabal: Funep, 2000, 35 p. **Série Frutas Nativas**, 2.

LEE *et al.*. Oligomeric proanthocyanidins improve memory and enhance phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 in senescence-accelerated mouse prone/8. **British Journal of Nutrition**. V. 103, n. 4, p. 479–489. 2010.

LI *et al.*. Manual annotation combined with untargeted metabolomics for chemical characterization and discrimination of two major *Crataegus* species based on liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 460628. 2019.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. Screening farmacológico de plantas medicinais utilizadas popularmente com antiinflamatória. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis. Resumos...Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, p. 89. 1996.

LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T. *Screening*farmacológico de plantas medicinais utilizadas popularmente como antiinflamatória. In: *SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, 14, Florianópolis. Resumos...Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, p.89, 1996 *apud* ENDRINGER, D. C. **Química e atividades biológicas de *Hancorniaspeciosa* Gomes (*Apocynaceae*): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer**.Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 260 p.

LIU *et al.*. A role for leucoanthocyanidin reductase in the extension of proanthocyanidins. **Nature Plants**. V. 2. 2016.

LIU *et al.*. The Ambiguous Relationship of Oxidative Stress, Tau Hyperphosphorylation, and Autophagy Dysfunction in Alzheimer's disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2015.

LV, *et al.*. Identification of proanthocyanidins from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and their antioxidant activity. **Plos One**. v. 10, n. 3. 2015.

MA *et al.*. Therapeutic Effects of Natural Drugs on Alzheimer's Disease. **Frontiers in Pharmacology**. V. 10, December. 2019.

MARFANY, A. *et al.*. High blood pressure, Alzheimer disease and antihypertensive treatment. **Panminerva Medica**, v. 60, n. 1, p. 8-16, 2018.

MARINHO *et al.*. The latex obtained from *Hancorniaspeciosa*Gomes possesses anti-inflammatory activity. **JournalofEthnopharmacology**. v. 135, p. 530-537. 2011.

MASIKE *et al.*. Detailed Phenolic Characterization of Protea Pure and Hybrid Cultivars by Liquid Chromatography–Ion Mobility–High Resolution Mass Spectrometry (LC-IM-HR-MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 68, n. 2, p. 485-502. 2020.

MENDIOLA-PRECOMA *et al.*. Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, 2016, 1–17. 2016.

MICHELL-ROBINSON *et al.*. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. **Brain**. V. 138, p. 1138-1159. 2015.

MIRAGLIA *et al.*. Searching for signs of aging and dementia in EEG through network analysis. **Behavioural Brain Research**. v. 317, p. 292–300. 2017

MOKHTAR, S. H. *et al.*. The Beta-Amyloid Protein of Alzheimer's Disease: Communication Breakdown by Modifying the Neuronal Cytoskeleton. *International Journal of Alzheimer's Disease*. **Neurotoxicity Research**, v.23, n. 2, p. 131-144, 2013.

MORAES, *et al.*. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120, p. 161-168. 2008.

MORALES *et al.*. Extraction of bioactive compounds against cardiovascular diseases from *Lentinula edodes* using a sequential extraction method. **Biotechnology Progress**. V. 34, p. 746–755. 2018.

MULLANE *et al.*. Preclinical Models of Alzheimer's Disease: Relevance and Translational Validity. **Current Protocols in Pharmacology**. V. 84, n. 1, p. 1–28. 2019.

NASERI *et al.*. The complexity of tau in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**. V. 705, p. 183–194. 2019.

NAZIR *et al.*. Phytochemical analysis, molecular docking and anti-amnesic effects of methanolic extract of *Silybum marianum* (L.) Gaertn seeds in scopolamine induced memory impairment in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 210, p. 198–208. 2018.

NEWMAN *et al.*. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**. V. 79, p. 629–661. 2016.

O'BRYANT *et al.*. Blood-based biomarkers in Alzheimer disease: Current state of the science and a novel collaborative paradigm for advancing from discovery to clinic. **Alzheimer's & Dementia**. v. 13, n. 1, p. 45–58. 2017.

OBOH *et al.*. Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats' brain-in vitro. **Neurochemical Research**. V. 38, n. 2, p. 413–419. 2013.

OMAR *et al.*. The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**. V. 47, p. 1–20. 2017.

PARODI *et al.*. Amyloid causes depletion of synaptic vesicles leading to neurotransmission failure. **Journal of Biological Chemistry**. V. 285, p. 2506–2514. 2010.

RAUF, *et al.*. Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. v. 116, February. 2019.

RAVISHANKAR *et al.*. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. V. 45, p. 2821–2831. 2013.

REISS *et al.*. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**. V. 29, n. 6, p. 613–627. 2018.

ROBINETTE *et al.*. NMR in metabolomics and natural products research: Two sides of the same coin. **Accounts of Chemical Research**. V. 45, p. 288–297. 2012.

RÖSCH *et al.*. Antioxidant gallic catechins, dimeric and trimeric proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace. **European Food Research and Technology**. V. 219, n. 6, p. 605–613. 2004.

SALAM *et al.*. Methods in the Extraction and Chemical Analysis of Medicinal Plants. In *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology*; Albuquerque, U.P., de Lucena, R.F.P., Cruz da Cunha, L.V.F., Alves, R.R.N., Eds.; Springer: New York, NY, USA. p. 257–283. 2019.

SCOSSA *et al.*. The Integration of Metabolomics and Next-Generation Sequencing Data to Elucidate the Pathways of Natural Product Metabolism in Medicinal Plants. **Planta Medica**. v. 84, p. 855–873. 2018.

SENGOKU. Aging and Alzheimer's disease pathology. **Neuropathology**. 2019

SHARMA *et al.*. Synergistic Anti-Cancer Effects of Grape Seed Extract and Conventional Cytotoxic Agent Doxorubicin Against Human Breast Carcinoma Cells. **Breast Cancer Research and Treatment**. V. 85, p 1–12. 2004.

SHI *et al.*. Protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against beta-amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. **Chemico-Biological Interactions**. V. 181, n. 1, p. 115–23. 2009.

SHIEH *et al.*. Alzheimer's Disease and Diabetes: Insulin Signaling as the Bridge Linking Two Pathologies. **Molecular Neurobiology**. 2020

SILVA, *et al.*. Alzheimer's disease: Risk factors and potentially protective measures. **Journal of Biomedical Science**. V. 26, n. 1, p. 1–11. 2019

SKIRYCZ *et al.*. Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A Modern Eldorado? **Trends in Biotechnology**. V. 34, p. 781–790. 2016.

SONG *et al.*. Ginsenoside Rg1 attenuates okadaic acid induced spatial memory impairment by the GSK3 β /tau signaling pathway and the A β formation prevention in rats. **European Journal of Pharmacology**. V. 710, p. 29–38. 2013.

STRATHEARN *et al.*. Neuroprotective effects of anthocyanin and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. **Brain Research**. V. 1555, p. 60–77. 2014.

THOMFORD *et al.*. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 19. 2018.

TREVISAN *et al.*. Theories of aging and the prevalence of Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2019.

van der KANT *et al.*. Amyloid- β -independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**. V. 21, p. 1–15. 2019.

WANG *et al.*. Brain-targeted proanthocyanidin metabolites for Alzheimer's disease treatment. **The Journal of Neuroscience**. V. 32, p. 5144–5150. 2012.

WEBERS *et al.*. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. **Immunology and Cell Biology**. P. 1–14. 2019.

WILLIAMS *et al.*. Membrane Technology for the Improved Separation of Bioactive Compounds. **Procedia Engineering**. V. 44, p. 2112–2114. 2012.

WU *et al.*. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 52, n. 26, p. 7846–7856. 2004

XU *et al.*. Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain A β accumulation and memory deficits. **Molecular Neurodegeneration**. v. 10, n. 1, p. 58–74. 2015.

YAMAZAKI *et al.*. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. **Nature Reviews Neurology**. V. 15, n. 9, p. 501–518. 2019.

YOKOZAWA *et al.*. Role of oligomeric proanthocyanidins derived from an extract of persimmon fruits in the oxidative stress-related aging process. **Molecules**. V. 19, n. 5, p. 6707–6726. 2014.

YOO *et al.*. Cynomorium songaricum extract enhances novel object recognition, cell proliferation and neuroblast differentiation in the mice via improving hippocampal environment. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. V. 14, p. 1–8. 2014.

YOSHIOKA *et al.*. Development of an analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee beverages and dark beer using novel high-sensitivity technique of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. V. 126, p. 126–130. 2018.

ZARE-SHAHABADI *et al.*. Autophagy in Alzheimer's Disease. **Reviews in the Neurosciences**. V. 26, n. 4, p. 385–395. 2016.

ZHANG *et al.*. Chemical constituents and their acetyl cholinesterase inhibitory and antioxidant activities from leaves of *Acanthopanax henryi*: Potential complementary source against Alzheimer's disease. **Archives of Pharmacal Research**. V. 37, n. 5, p. 606–616. 2014.