



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO - *CAMPUS* UNIVERSITÁRIO DE SINOP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ICS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA
TRABALHO DE CURSO III

MYLENA PARIS

**COLINESTERASES SANGUÍNEAS: SELEÇÃO DE AGENTES
POTENCIALMENTE EFICAZES PARA TRATAMENTO COGNITIVO DO MAL
DE ALZHEIMER**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO - *CAMPUS* UNIVERSITÁRIO DE SINOP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ICS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA
TRABALHO DE CURSO III

MYLENA PARIS

**COLINESTERASES SANGUÍNEAS: SELEÇÃO DE AGENTES
POTENCIALMENTE EFICAZES PARA TRATAMENTO COGNITIVO DO MAL
DE ALZHEIMER**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal de Mato Grosso –
UFMT, *campus* de Sinop, para a
obtenção do título de Farmacêutico, sob
a orientação do Prof. Dr. Guilherme Luz
Emerick

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

P232c Paris, Mylena.
COLINESTERASES SANGUÍNEAS: SELEÇÃO DE
AGENTES POTENCIALMENTE EFICAZES PARA
TRATAMENTO COGNITIVO DO MAL DE ALZHEIMER /
Mylena Paris. -- 2015
52 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Guilherme Luz Emerick.
TCC (graduação em Farmácia) - Universidade Federal
de Mato Grosso, Instituto de Ciências da Saúde, Sinop,
2015.
Inclui bibliografia.

1. Doença de Alzheimer. 2. acetilcolinesterase. 3.
butirilcolinesterase. 4. tratamento cognitivo. 5. produtos

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

MYLENA PARIS

COLINESTERASES SANGUÍNEAS: SELEÇÃO DE AGENTES
POTENCIALMENTE EFICAZES PARA TRATAMENTO COGNITIVO DO MAL
DE ALZHEIMER

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia pela Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, pela comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Guilherme Luz Emerick
Instituto de Ciências da Saúde
UFMT – *Campus* Sinop
(Orientador)



Prof.ª. Dr.ª. Carla Regina Andrighetti
Instituto de Ciências da Saúde
UFMT – *Campus* Sinop
(Membro)



Prof. Dr. Rudy Bonfilio
Instituto de Ciências da Saúde
UFMT – *Campus* Sinop
(Membro)

Sinop, Junho de 2015.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO - *CAMPUS* UNIVERSITÁRIO DE SINOP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ICS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA
TRABALHO DE CURSO III

Dedico este trabalho aos portadores do Mal de Alzheimer e aos seus cuidadores que contribuem e dão apoio para a superação das dificuldades enfrentadas desde o momento do diagnóstico até as etapas mais avançadas da doença.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar em todos os momentos, também pela força concedida, pelas vezes em que me escutou chorando achando que nada daria certo. Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas. Agradeço-te por nunca me deixar esquecer mesmo em meio aos desertos, que esteve sempre comigo! Também pelo fim de mais essa etapa e pelos sonhos que se concretizam.

A minha mãe, Genilde Paris, a qual é meu abrigo seguro, de onde recebi apoio incondicional nessa empreitada. A primeira a sonhar tudo isso, agradeço pela gratidão, amor, carinho, educação, compreensão, oportunidades... você que muitas vezes teve que trabalhar dobrado renunciando seus sonhos em favor dos meus...o meu mais profundo agradecimento.

Ao meu orientador, Guilherme Luz Emerick, o qual se tornou um grande amigo que, com muita sabedoria, me conduziu pelo fascinante caminho da toxicologia até as últimas linhas deste trabalho. Obrigada pela dedicação, competência, ensinamentos, durante toda a realização desta pesquisa. Seus ensinamentos estarão presentes por toda a minha vida.

Agradeço por toda a sua ajuda e confiança, a você todo o meu respeito e admiração.

A Dayana, minha colega de laboratório a qual se tornou uma amiga especial, obrigada por fazer parte desta etapa e por enfrentar todos os obstáculos com muita paciência, alegria, gargalhadas e chás matte!

Um agradecimento especial aos meus queridos amigos Aline Vieira, Alan Blanc, Andressa Guidelli, Daniela Barros, Marina Braz e Rafael Morales, os quais estiveram desde o início comigo, na realização deste trabalho. Obrigada por tudo que pudemos compartilhar: a convivência, as alegrias, as frustrações, as noites sem dormir, as olheiras, as descobertas; enfim, pelo o que aprendemos. Vocês já fazem parte da minha vida, do meu coração!

A Iris L. Buffon, pelo enorme apoio, carinho, pelos sábios conselhos e palavras que me impulsionaram. A você minha eterna gratidão, afeto, respeito e admiração.

A Milene Pascoalão, não apenas pela amizade, mas pela irmandade, companheirismo, pela suavidade, alegria, a qual não mediu esforços para me incentivar em meio à tempestade.

Ao meu namorado, Bernardo Signor, por tudo que és, pelo amor, zelo, carinho, dedicação e compreensão... principalmente me tranquilizando nos momentos difíceis.

Aos meus professores, por todo o conhecimento adquirido durante estes 5 anos. Vocês compartilharam suas experiências de vida e nos deram apoio nas horas mais difíceis dessa caminhada. Sabemos que nossos melhores mestres não foram os que nos ensinaram as respostas, mas, sim, aqueles que nos ensinaram a questionar, a duvidar, a pensar e a sonhar.

Ao CNPq e UFMT pelo apoio a esta pesquisa.

Enfim, a todos que, mesmo não sendo citados aqui, contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste projeto.

Muito obrigada a todos vocês!

A força não provém da
capacidade física. Provém de
uma vontade indomável.
Mahatma Gandhi

RESUMO

PARIS, M. **Colinesterases sanguíneas: seleção de agentes potencialmente eficazes para tratamento cognitivo do Mal de Alzheimer.** 2015. 54p. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia – Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* de Sinop.

A doença de Alzheimer (DA) é a demência mais frequente em todo o mundo. Sua fisiopatologia é complexa e é acarretada por inúmeros fatores. A DA possui caráter crônico, leva a neurodegeneração, e sua progressividade é alta, gerando prejuízos cognitivos e comportamentais aos portadores. Dentre os principais fatores, está o declínio do neurotransmissor acetilcolina no sistema nervoso central. Atualmente, existe apenas tratamento sintomático e cognitivo, por fármacos anticolinesterásicos, sendo poucos aprovados pelo *Food and drug administration* (FDA). Por isso, faz-se necessário a busca por novos e melhores medicamentos para a DA. Desta maneira, este trabalho objetivou avaliar a atividade da acetilcolinesterase (AChE) nos eritrócitos humanos e da butirilcolinesterase (BChE) plasmática após exposição *in vitro* por substâncias de origem natural de plantas brasileiras. Realizou-se a quantificação de proteínas para avaliar a atividade enzimática e foram obtidas três curvas analíticas com a solução padrão de albumina bovina (BSA) a 595 nm. As dosagens das colinesterases foram feitas de acordo com o método que se baseia na reação entre a tiocolina e o ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB). De acordo com a porcentagem da atividade enzimática em função do log da concentração de taxifolina, não foi possível calcular os valores de IC₅₀, de maneira que não houve inibição enzimática significativa. A amentoflavona apresentou maior afinidade para inibir a BChE e boa linearidade, sendo estimada a sua IC₅₀. Na análise do percentual de atividade anticolinesterásica da rutina, não houve inibição enzimática significativa e apresentou baixa linearidade, não sendo possível os cálculos de IC₅₀. As substâncias taxifolina e rutina não foram capazes de inibir AChE e BChE significativamente, não sendo determinadas as suas IC₅₀. Apenas a amentoflavona apresentou atividade inibitória seletiva para BChE.

Palavras-chaves: Doença de Alzheimer, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, tratamento cognitivo, produtos naturais.

ABSTRACT

PARIS.M. **Blood cholinesterase: selection of potentially effective agents for cognitive treatment of Alzheimer's disease.** 2015. 54p. Term paper of Pharmacy - Federal University of Mato Grosso, Sinop Campus.

Alzheimer's disease (AD) is the most common dementia in the world. Its pathophysiology is complex, and is brought about by numerous factors. The DA has chronic character, leads to neurodegeneration, and its progression is high, leading to cognitive impairment and behavioral carriers. Among the main factors is the neurotransmitter acetylcholine decline in the central nervous system. Currently, there is only symptomatic and cognitive treatment, anticholinesterase drugs, few being approved by the Food and Drug Administration (FDA). Therefore, it is necessary to search for new and better drugs for AD. Thus, this study aimed to evaluate the activity of acetylcholinesterase (AChE) in human erythrocytes and butyrylcholinesterase (BChE) plasma after in vitro exposure of substances of natural origin of Brazilian plants. Protein quantification was performed to assess the enzymatic activity curves were obtained with three analytical standard solution of bovine serum albumin (BSA) at 595 nm. The dosage of the cholinesterase were made according to the method based on the reaction between the thiocholine and 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). According to the percentage of the enzyme activity in function of the log concentration of taxifolin it was not possible to calculate the IC₅₀ values, so that no significant enzyme inhibition. The amentoflavone showed greater affinity to inhibit BChE, and good linearity, estimated its IC₅₀. When analyzing the percentage of acetylcholinesterase activity of rutin, no significant enzyme inhibition, and showed low linearity, it is not possible IC₅₀ calculations. The taxifolin substance and rutin were not able to significantly inhibit AChE and BChE, not being determined their IC₅₀. Just amentoflavone showed inhibitory activity towards BChE.

Keywords: Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase cognitive treatment, natural products.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABRAZ – Associação Brasileira de Alzheimer

AChE – Acetilcolinesterase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCh – Acetilcolina

BChE – Butirilcolinesterase

BSA – Soro albumina bovina

CB's – Carbamatos

DA – Doença de Alzheimer

DTNB – Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)

FDA – Food and Drugs Administration

HIV - Anti-imunodeficiência humana

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC50 - Concentração de um composto necessária para inibir a atividade enzimática em 50 por cento

LIPEQ - Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Químicas

NRIOP – Neuropatia retardada induzida por organofosforados

OMS – Organização Mundial da Saúde

OP – organofosforado

PIB – Produto interno bruto

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção de reagentes para preparo de soluções	26
Tabela 2 - Esquema para preparação dos pontos da curva analítica de proteína	27
Tabela 3 - Esquema para preparação das amostras para dosagem de proteína	27
Tabela 4 - Esquema para doseamento da atividade das colinesterases .	28
Tabela 5 - Dados da curva analítica de proteínas feita com o tampão fosfato	31
Tabela 6. Equações da reta de inibição das enzimas AChE e BChE com os respectivos coeficientes regressão	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biossíntese da acetilcolina	19
Figura 2. Preparo de amostras de sangue para dosagem de colinesterases	25
Figura 3 - Curva analítica de proteína feita com tampão fosfato pH 8,0	32
Figura 4 - Porcentagem da atividade da AChE em função do Log da concentração de Taxifolina	32
Figura 5- Porcentagem da atividade da BChE em função do Log da concentração de Taxifolina.	33
Figura 6 - Estrutura química da taxifolina	34
Figura 7 - Gráfico de dose <i>versus</i> resposta para BChE em função do Log da concentração de amentoflavona	35
Figura 8 - Gráfico de dose <i>versus</i> resposta para AchE em função do Log da concentração de amentoflavona	35
Figura 9- Estrutura química geral da amentoflavona	37
Figura 10- Gráfico de dose <i>versus</i> resposta para AChE em função do Log da concentração de rutina	38
Figura 11 - Estrutura da rutina.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Aspectos fisiopatológicos do Mal de Alzheimer	15
2.2 A AChE e BChE como biomarcadores	17
2.3 Agentes anticolinesterásicos como tratamento do Mal de Alzheimer ..	19
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Reagentes e diluições	24
4.2 Coleta e preparo de amostras	24
4.3 Preparo de soluções	25
4.4 Dosagem de proteínas	27
4.5 Procedimento para determinação da atividade das colinesterases	28
4.6 Cálculo da atividade das colinesterases	29
4.7 Análise de dados	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO A	49
ANEXO B	50
ANEXO C	51

1. INTRODUÇÃO

O expressivo aumento da população mundial nos últimos anos vem acompanhado do crescimento da população idosa e isso se deve ao fato do aumento da expectativa de vida, resultado da melhora da qualidade de vida e principalmente do maior acesso à informação, bem como o aumento das tecnologias médicas. De acordo com estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), a parcela da população idosa com 60 anos ou mais de idade terá um aumento significativo: passando de 13,8% em 2020, para 33,7% em 2060, atingindo um aumento de aproximadamente 20 pontos percentuais.

De fato, uma conquista para humanidade, porém, tais dados preocupam e chamam a atenção para o aumento na incidência de doenças relacionadas à demência, as quais estão intimamente ligadas à idade. Além de serem de cunho crônico e incapacitante, são incuráveis e exigem cuidados contínuos ao portador, pois pioram progressivamente (IAB, 2014).

A doença de Alzheimer (DA) é a demência mais frequente e, segundo Herrera et al. (2002), cerca de 55,1% das demências são de DA, sendo prevalentes em mulheres e em indivíduos de baixa escolaridade (12,1%) do que em pessoas com escolaridade de 8 anos ou mais (2%).

As características neuropatológicas da DA são o acúmulo de material fibroso insolúvel, denominados de fibras amilóides celulares, encontradas no sistema nervoso central (BRAAK, 1991); assim como também processos inflamatórios, estresse oxidativo e alterações mitocondriais, observados a nível molecular. Tais alterações afetam principalmente o prosencéfalo basal, o córtex e a amígdala (SINGH *et al.*, 2013).

A DA leva a prejuízos para a cognição, como: alterações de memória, desorientação, perda de raciocínio, concentração, aprendizado, realização de tarefas, julgamento, linguagem e habilidades visuais-espaciais. Ainda, podendo ser acompanhadas por mudanças no comportamento ou na personalidade (ABRAZ, 2014). De acordo com a Associação Americana de Alzheimer (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2014), estima-se que 5,2 milhões de americanos estão vivendo com a DA, sendo que quase dois terços dos portadores são do sexo feminino.

A DA foi descoberta há cerca de 100 anos, classificada como uma doença neurodegenerativa, na qual seu tratamento está fundamentado a 3 fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA). São eles inibidores da colinesterase, a donepezila, rivastigmina e a galantamina. Atuando na diminuição e alívio dos sintomas, porém ineficazes para a regressão do desenvolvimento da doença.

A fisiopatologia da doença envolve principalmente a diminuição da liberação do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica, ou ainda, a causa do déficit da neurotransmissão colinérgica pode estar ligada ao aumento da atividade das colinesterases (SINGH *et al.*, 2013). No sistema nervoso central (SNC), a degradação da acetilcolina após a sua ação nos receptores é realizada por duas colinesterases, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE). A inibição concomitante destas duas esterases por fármacos podem aumentar o sucesso do tratamento (GIACOBINI, 2004). Assim, faz-se necessário buscar novas alternativas terapêuticas com intuito de aliviar os sinais e sintomas da DA e a utilização de recursos de origem natural se torna uma ferramenta importante neste processo de seleção de novos agentes terapêuticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos fisiopatológicos do Mal de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa, de grande impacto sócio-econômico, responsável por cerca de 50-60% do número total de casos de demência dentre pessoas acima dos 65 anos (ANAND *et al.*, 2014). Embora a prevalência e incidência variem entre estudos populacionais, essas taxas aumentam significativamente com a idade. De acordo com VIEGAS Jr *et al.*, (2004), esta patologia afeta cerca de 1,5% da população em idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 e 39% acima dos 90 anos, acometendo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo. Estima-se que será ainda maior o crescimento de casos dessa demência, onde serão atingidos cerca de 14 milhões de pessoas nos próximos 50 anos.

Pesquisas ainda revelam que a recorrência da doença irá multiplicar a cada 5 anos, após os 65 anos de idade (SERENIKI *et al.*, 2008).

Ademais, nos Estados Unidos, o país mais industrializado do mundo, calcula-se que cerca de 4 milhões de americanos possuem idades maiores que 85 anos, sendo uma população de faixa etária que mais cresce. Contudo, considera-se que metade desta população será acometida por DA. Ainda, estima-se que o custo anual do tratamento de um paciente com DA leve é de US\$ 18.408,00, US\$ 30.096,00 para DA moderada e US\$ 36.132,00 para um paciente com DA severa (VIEGAS Jr *et al.*, 2004).

Portanto, DA pode ser considerada um desafio crescente para a saúde pública e esse quadro permanecerá inalterado se novas pesquisas e o desenvolvimento de tratamentos de prevenção, reversão ou retardo da progressão e do aparecimento da doença não forem desenvolvidos (RANGEL *et al.*, 2012).

O desenvolvimento progressivo da doença se relaciona diretamente com os fatores ambientais, como o estilo de vida; e genéticos do indivíduo, de modo que alguns podem ser modificados; porém, outros são imutáveis. Além destes, são considerados fatores de risco: hipertensão, diabetes, obesidade, tabagismo e sedentarismo.

Segundo o patologista descobridor da doença, o alemão Alois Alzheimer, esse processo de degeneração progressiva das funções psicomotoras e cognitivas, possui duração de 8,5 a 10 anos, considerando desde o início dos primeiros sintomas até a morte do indivíduo (CHAVES, 2013). Todo o processo da doença resulta em perda da função neuronal e dano sináptico, com subsequente comprometimento da memória, da coordenação motora e do raciocínio; além de perda da capacidade cognitiva e demência (VIEGAS Jr *et al.*, 2004).

A doença se caracteriza microscopicamente pelo depósito de proteínas beta-amilóides, ou melhor, placas amilóides e proteínas neurofibrilares, nas quais estão diretamente associadas à progressiva perda de capacidade cognitiva, juntamente com a regressão da memória e perda da capacidade de aprendizagem. Tais consequências são respostas ao déficit colinérgico gerado por essa patologia (ANAND *et al.*, 2014).

A nível celular, DA é associada principalmente à redução das taxas de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica das células nervosas, assim resulta na diminuição da neurotransmissão de ACh e também provoca o déficit em outros neurotransmissores como, dopamina, noradrenalina, serotonina, glutamato e leve redução da substância P (GIACOBINI, 2004).

A hipótese colinérgica é a única prova encontrada a respeito da redução cognitiva da DA, portanto, o desenvolvimento terapêutico para o tratamento da doença é baseado nesta teoria. A inibição das enzimas que degradam a acetilcolina, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), tem se tornado a melhor estratégia terapêutica para a DA. Essa estratégia promove aumento das concentrações do neurotransmissor nas sinapses nervosas, sendo possível a ligação da acetilcolina nos receptores nicotínicos e muscarínicos, diminuindo os sintomas da doença (SERENIKI, 2008).

Embora seja conhecida há vários anos, a DA possui apenas três medicamentos eficazes aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA). São os inibidores da acetilcolinesterase (rivastigmina, galantamina, donepezila) que apenas fornecem o tratamento sintomático, alterando as funções colinérgicas e, assim, não levam a cura da doença. Ainda, em muitos casos que há o tratamento com estes três inibidores de colinesterase, não há resposta adequada do paciente e a descoberta de novas substâncias capazes de melhorar os sinais da DA se torna cada vez mais necessária (GIACOBINI, 2004).

2.2 A AChE e BChE como biomarcadores

O conhecimento da atividade enzimática trouxe ao mundo científico a possibilidade de desenvolver ensaios de análise quantitativa de sua atividade, através de simples métodos analíticos (SCHEFFER, 2004). Atuando como biomarcadores, as enzimas são ferramentas importantes nos ensaios de rotina de monitoramento biológico (EMERICK, 2012).

Constituintes de tecidos específicos, as enzimas geralmente estão presentes na corrente sanguínea. As colinesterases são enzimas que estão presentes no sangue e são conhecidas como AChE, ou colinesterase eritrocitária e BChE ou colinesterase plasmática (SCHEFFER, 2004). São

geralmente utilizadas como biomarcadores para avaliar os efeitos inibitórios da exposição de indivíduos a praguicidas organofosforados e/ou carbamatos (EMERICK, 2012).

Desta forma, a avaliação de potencial tóxico do praguicida se baseia no monitoramento de AChE para a síndrome colinérgica, e para marcador de exposição faz-se análise da BChE, uma vez que a diminuição dos níveis desta esterase pode permanecer por trinta dias no plasma, e de AChE, por até noventa dias nos eritrócitos após a exposição.

A AChE e a BChE são enzimas genética, estrutural e cineticamente distintas, diferindo também em sua localização no organismo. A AChE está presente na fenda sináptica em sua forma solúvel e nas membranas de maneira ligada (GROSSBERG, 2003). A maior capacidade de hidrolisar a butirilcolina é propriedade da BChE, e está demasiadamente distribuída em órgãos como o fígado e no plasma, atuando no metabolismo de várias substâncias anestésicas. A AChE está presente nos eritrócitos, nas terminações nervosas e em órgãos como pulmão e baço; sua principal função é degradar a acetilcolina, devido a sua alta especificidade e afinidade (BERNARDI et al., 2010). Emerick (2012) relata que, com apenas 10% de inibição enzimática, já é possível observar o aparecimento de sintomas brandos, como: náuseas, fraquezas musculares, mal-estar e cólicas; dispensando tratamento antidotal com atropina e pralidoxima. Na medida em que aumenta a inibição enzimática, os sintomas se tornam cada vez mais exacerbados, ao passo que, a inibição de cerca de 80% da AChE já é possível relatar a ocorrência de insuficiência respiratória, paralisia, convulsões e coma, podendo o indivíduo ir a óbito se o tratamento antidotal (com atropina e pralidoxima) não for imediatamente realizado.

A biossíntese do neurotransmissor colinérgico, a acetilcolina (ACh), é realizada em condições normais, a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA) e colina, pela ação catalítica da enzima colina-acetiltransferase (Esquema 1).

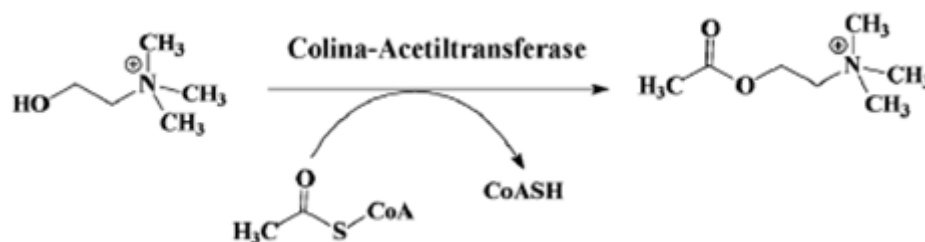


Figura 1. Biossíntese da acetilcolina (Fonte: VIEGAS Jr. et al, 2004).

A ACh está presente nas junções neuromusculares e são liberadas após a despolarização no terminal neuronal, através da difusão das vesículas pela membrana celular, onde o neurotransmissor é liberado. Enquanto permanece na fenda, a ACh se liga aos receptores nicotínicos e muscarínicos, ativando-os. Sua atividade é regulada pela sua permanência nas sinapses. A AChE é a enzima responsável por regular as funções da ACh, exercendo a hidrólise catalítica do neurotransmissor, transformando-o novamente em colina, sua molécula precursora (RIBEIRO, 2007).

Contudo, quando a enzima é inibida, a acetilcolina permanece nas sinapses exercendo seu efeito. Atualmente, o método de inibição enzimática da colinesterase, é utilizado para o tratamento terapêutico da DA, aumentando a ação através da indução da resistência da acetilcolina nos receptores colinérgicos.

Existem métodos eficazes para se avaliar a atividade das colinesterases plasmáticas e eritrocitárias. Dentre eles, o método descrito por Ellman *et al.* (1961) é o mais empregado, no qual se realiza espectrofotometricamente a dosagem de atividade colinesterásica. Baseia-se no princípio da reação entre o ácido 5,5-*ditio-bis*(2-nitrobenzóico) (DTNB) e os grupos sulfidril liberados pela hidrólise da acetiltiocolina pela AChE. A medição é realizada pelo espectrofotômetro devido à formação da cor amarelada a 412 nm (TRYFONOS *et al.*, 2009).

2.3 Agentes anticolinesterásicos como tratamento do Mal de Alzheimer

De acordo com SINGH *et al.*, (2013) o uso de anticolinesterásicos teve início do período de guerra, quando foram estudados e fabricados como poderosas e venenosas armas químicas, utilizadas tanto no ataque quanto na

defesa durante a Segunda Guerra Mundial. Os organofosforados (OPs) e carbamatos (CBs) foram descobertos e desenvolvidos por químicos alemães, no qual se mostraram eficazes através da sua ação inibitória da acetilcolinesterase.

Logo, estes compostos foram reproduzidos pelos britânicos e posteriormente, sua tecnologia adaptada e melhorada pelos americanos. No pós-guerra, em consequência ao crescimento populacional e a escassez de alimentos, houve a necessidade do aumento da produção de alimentos, gerando a necessidade da utilização de tais compostos químicos para a proteção e o controle de pragas das lavouras (e que até os dias atuais continua intensa e crescente).

A maioria dos praguicidas inibidores de AChE, estão divididos em duas distintas categorias, OP e CBs. Os OP causam a inibição irreversível da enzima e podem levar ao envelhecimento enzimático, no qual é impossível de se recuperar a enzima. Ao passo que, a inibição reversível, ou seja, inibição temporária da AChE é causada pelos anticolinesterásicos derivados do ácido carbâmico (COSTA, 2008). Ademais, a descoberta dos inibidores colinesterásicos trouxe um avanço valioso para clínica médica, de modo que propiciou o desenvolvimento e o uso de maneira controlada de fármacos para o tratamento e controle de doenças que envolvem a deficiência de transmissão da acetilcolina, como a DA.

Os atuais fármacos anticolinesterásicos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) - como a tacrina, rivastigmina, donepezila e galantamina - através de seu mecanismo, aumentam a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores muscarínicos e nicotínicos cerebrais.

A respeito do fármaco tacrina, VIEGAS Jr *et al.*, (2004) descreve:

“A tacrina (THA, Cognex®) foi o primeiro fármaco sintético aprovado pelo FDA (“Food and Drug Administration”) nos Estados Unidos para uso terapêutico, demonstrando efeito moderado, mas significativo no alívio dos sintomas de DA de intensidade, média e leve. Entretanto, sua aplicação tem sido limitada devido aos sérios efeitos colaterais, como a hepatotoxicidade, que têm forçado os pacientes a descontinuarem o tratamento.”

SERENIKI *et al.*, (2008) afirma que a rivastigmina (Exelon®) é atualmente o medicamento mais utilizado, uma vez que apresentou inibição tanto da AChE quanto da BChE, assim, demonstrando seletividade e eficácia para o aumento de acetilcolina na fenda sináptica. A respeito da donepezila (Aricept®), o autor cita que é um composto sintético, inibidor seletivo da AChE. Este fármaco demonstrou significativos 38% de melhora das funções cognitivas em pacientes que foram submetidos ao período de um ano de tratamento, sendo os resultados comparados ao grupo que recebeu placebo.

O fármaco (Reminyl®), composto pela galantamina, um alcalóide isolado de várias espécies vegetais da família Amaryllidaceae, esta substância de origem natural dispõe de dois mecanismos de ação. Além do efeito anticolinesterásico, possui a propriedade de modular alostericamente os receptores nicotínicos, os quais demonstram ser importantes no controle do humor e da memória. Deste modo, a galantamina além de atuar melhorando as funções cognitivas, também beneficia a melhora da memória e o humor do portador de DA. Assim, além da administração de anticolinesterásicos, o uso de agonistas nicotínicos vem sendo caracterizada como uma segunda estratégia para a melhora dos sintomas dessa patologia (VIEGAS Jr *et al.*, 2004).

A variedade de estruturas e moléculas dos fármacos anticolinesterásicos já existentes aliada à possibilidade de se explorar novos e distintos mecanismos de ação, impulsionou a busca por novos candidatos a fármacos de origem natural no tratamento da DA, cuja a biodiversidade tornou-se alvo desses estudos.

A biodiversidade brasileira é uma fonte inestimável de substâncias biologicamente ativas (BARREIRO, 2009). Sua definição de variedade e variabilidade está fundamentada nos organismos vivos presentes em sua fauna e flora, e de suas complexidades, onde podem gerar uma imensa gama de produtos de grande importância econômica e de enorme riqueza biológica, podendo fornecer subsídios para a produção de novos fármacos (SIMÕES *et al.*, 2007).

O Brasil apresenta seis biomas terrestres, são eles: a Amazônia, a Caatinga, o Cerrado, a Mata Atlântica, o Pantanal e os Pampas. Aproximadamente 0,5% das cerca de 300.000 espécies de plantas endêmicas

conhecidas mundialmente, se encontram no Cerrado e na Mata Atlântica (ZERAIK, BOLZANI, 2014). A riqueza e a biodiversidade existente no Brasil podem fornecer uma enorme variedade química e estrutural, nos quais a viabilidade dos estudos fotoquímicos tornou possível a investigação de uma gama de espécies de microrganismos, animais e vegetais.

Assim, de acordo com o exposto, faz-se necessária a exploração da biodiversidade, bem como o estudo e o desenvolvimento. Além disso, a identificação da atividade biológica para fim da descoberta de novos fármacos anticolinesterásicos de origem natural que sejam seletivos, potentes e de baixo perfil de toxicidade, promissores para o tratamento da DA.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a atividade da acetilcolinesterase nos eritrócitos humanos e da butirilcolinesterase plasmática após exposição por substâncias bioativas de plantas brasileiras.

3.2 Objetivos específicos

Para atingir tal objetivo foram realizadas as seguintes estratégias:

- 1) Padronizar a atividade da AChE nos eritrócitos e da butirilcolinesterase em plasma humano.
- 2) Calcular as concentrações inibitórias 50% (IC_{50}) da rutina, taxifolina e amentoflavona sobre AChE e BChE em humanos.
- 3) Calcular a relação IC_{50} BChE/ IC_{50} AchE comparando com as razões de substâncias já utilizadas na terapêutica do Alzheimer

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e diluições

Foram utilizadas substâncias bioativas isoladas de extratos de plantas brasileiras, que foram cedidas pelo Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Químicas (LIPEQ) da UFMT – Sinop.

Os ativos, rutina, taxifolina e amentolavona, foram utilizadas nas concentrações iniciais, respectivamente: 125 µg/mL, 500 µg/mL e 500 µg/mL. As diluições foram feitas na proporção 1:2.

4.2 Coleta e preparo de amostras

Inicialmente foram coletados 2 mL de sangue venoso de voluntários humanos em seringas de 3 mL e o sangue foi transferido rapidamente para tubos contendo 0,2 mL de heparina (25.000 UI/5 mL). Em seguida foi realizada a separação do plasma utilizando centrífuga a 2.500 rpm por 10 min. Para a dosagem da butirilcolinesterase (BChE), foi necessária a diluição do plasma em água destilada (100 µL de plasma em 14,3 mL de água).

Para a dosagem da atividade da acetilcolinesterase (AChE), nos eritrócitos humanos foram necessários 2 mL de sangue total já retirados o plasma (2.500 rpm por 10 min). Em seguida, os eritrócitos foram lavados duas vezes com 4,5 mL de solução salina onde foi utilizado o mesmo ciclo de centrifugação para a separação do plasma. Posteriormente, foi necessário diluir 1/600 (100 µL de eritrócitos em 60 mL de água) em água o concentrado de eritrócitos, e então proceder as análises.

As duas amostras foram utilizadas para a análise enzimática. Também, foi necessário guardar volume para dosagens de proteínas como descrito por Bradford (1976). As amostras foram preparadas conforme está descrito na Figura 2. Estes procedimentos receberam parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP e que atende pelo protocolo CEP/FCF/CAr 09/2009 parecer número 31/2009 (ANEXO A).

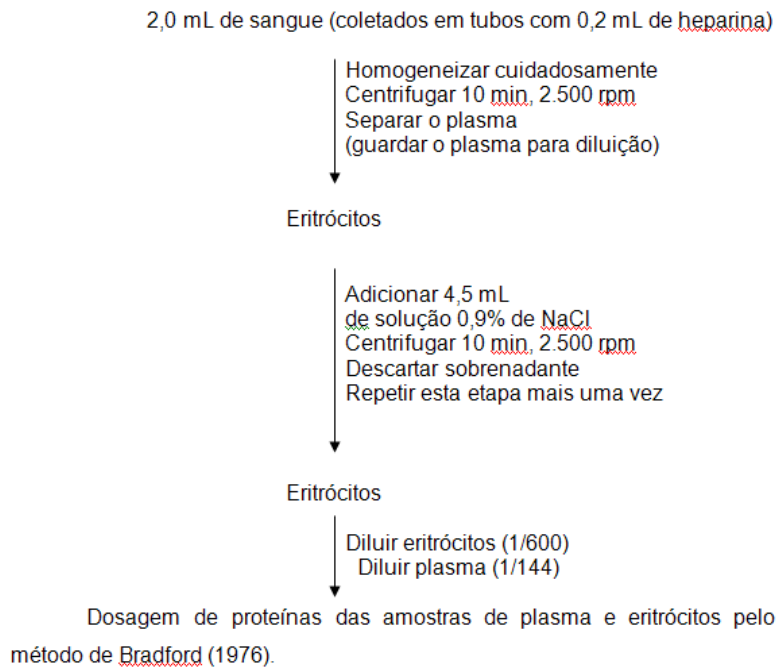


Figura 2. Preparo de amostras de sangue para dosagem de colinesterases.

4.3. Preparo de soluções

Para iniciar as dosagens de proteínas nos eritrócitos e no plasma, além de determinar a atividade da BChE plasmática e da AChE eritrocitária, foi necessário o preparo das seguintes soluções:

1) Tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2 a 25°C:

8,77 g de cloreto de sódio

21,3 g de fosfato bibásico de sódio

HCl (6 N) qsp.....pH 7,2 a 25°C

Água qsp.....1000,0 mL

2) Solução de Azul Brilhante para determinação de proteínas:

100,0 mg de *Coomassie Brilliant Blue* G-250 foram diluídos em 50,0 mL de álcool etílico 95%. Acrescentou-se 100,0 mL de ácido fosfórico 85% que foi diluído para 1000,0 mL de água destilada.

3) Solução padrão de soro albumina bovina (BSA) (500µg/mL):

5,0 mg de BSA foi dissolvido em 10,0 mL de água destilada contendo 0,05 mg de azida sódica.

4) Solução salina 0,9%:

4,5 g de NaCl foi dissolvido em 500 mL de água.

5) Tampão fosfato (0,1 M de fosfato de sódio, pH 8,0 e pH 7,0):

1ª) Preparou-se 100 mL de uma solução 12,0 g/L de fosfato monobásico de sódio (0,1M) em água.

-1,2 g fosfato monobásico de sódio;

H₂O qsp100 mL

2ª) Foi preparado 1000 mL de uma solução 14,2 g/L de fosfato dibásico de sódio em H₂O.

Pesando 14,2 g de fosfato dibásico de sódio;

H₂O qsp1000 mL

Estas soluções foram misturadas na proporção de 55 partes da 1ª com 945 partes da 2ª para obter o tampão de pH 8,0; e na proporção de 39 partes da 1ª com 61 partes da 2ª para obtenção do tampão de pH 7,0.

pH 8,0: foram preparados 900 mL.

pH 7,0: foram preparados 100 mL.

Tabela 1: Proporção de reagentes para preparo de soluções.

Solução	900 mL Tampão pH 8,0	100 mL Tampão pH 7,0
Fosfato monobásico 12 g/L	49,5 mL	39 mL
Fosfato dibásico 14,2 g/L	850,5 mL	61 mL

6) Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB 10,3 mM):

- Foi pesado 0,082 g DTNB

- Tampão fosfato pH 7,0 qsp.....20 mL.

7) Acetilcolina (ACh 10,7 mM):

- Foi pesado 0,031 g de ATCh
- Tampão fosfato pH 8,0 qsp.....10 mL.
- Foi preparada no momento da análise.

4.4 Dosagem de Proteínas

Foi realizada uma curva analítica de proteínas no tampão fosfato pH 8,0 ,utilizando a solução de soro albumina bovina (BSA) (a partir de uma solução estoque de 500 µg/mL), como padrão. A preparação da curva de dosagem de proteínas foi feita como descrito por Bradford (1976). A Tabela 2 mostra a composição dos reagentes de cada ponto da curva.

Tabela 2: Esquema para preparação dos pontos da curva analítica de proteína.

Ponto da curva	BSA (500 µg/mL)	Tampão	Sol. Brilhante Blue
Branco	-----	100 µL	4,9 mL
1	10 µL (5 µg)	90 µL	4,9 mL
2	20 µL (10 µg)	80 µL	4,9 mL
3	50 µL (25 µg)	50 µL	4,9 mL
4	80 µL (40 µg)	20 µL	4,9 mL
5	100 µL (50 µg)	0	4,9 mL

A leitura foi realizada em triplicata no espectrofotômetro UV/VIS a 595 nm após 5 minutos de reação. Para dosagem de proteínas nas amostras, foi utilizado o esquema descrito pela Tabela 3.

Tabela 3: Esquema para preparação das amostras para dosagem de proteína.

	BSA (500 µg/mL)	Amostra	Tampão	Sol. Brilhante Blue
Branco	-----	-----	100 µL	4,9 mL
Padrão	40 µL	-----	60 µL	4,9 mL
Amostra	-----	40 µL	60 µL	4,9 mL

Tampão utilizado: Colinesterases – Tampão fosfato pH 8,0

A leitura foi realizada em duplicata no espectrofotômetro a 595 nm após 5 minutos de reação.

4.5 Procedimento para determinação da atividade das colinesterases

As dosagens das colinesterases foram feitas como descrito por Ellman *et al.* (1961) com algumas modificações. Tornou-se necessário dosear a quantidade de proteína no plasma e nos eritrócitos para a obtenção da atividade em grama de proteína. A avaliação da atividade enzimática foi realizada conforme descrito na Tabela 4:

Tabela 4: Esquema de doseamento da atividade das colinesterases.

Reagente	Volume de Reagente		
	IC ₅₀	Colinesterases	Branco
Tampão fosfato pH 8,0	1650 µL	1875 µL	1875 µL
DTNB	75 µL	75 µL	75 µL
Amostra	225 µL	225 µL	-----
H ₂ O	-----	-----	225 µL
Inibidor	225 µL	-----	-----
ATCh	225 µL	225 µL	225 µL
Volume Total	2400 µL	2400 µL	2400 µL

Obs: Para determinação da IC₅₀ foram adicionados 225 µL do inibidor (6 concentrações diferentes em água) que ficou por 15 minutos em contato com a amostra antes do início das leituras. Após a adição da acetiltiocolina (ATCh), foi iniciado o programa cinético do espectrofotômetro, com 4 leituras a 450 nm, iniciando-se em 0s e com intervalos de 1 min entre cada leitura.

4.6 Cálculo da atividade das colinesterases

As leituras das amostras foram feitas em triplicata e a média de cada amostra foi dada em Abs/min. Para converção da atividade das colinesterases para $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$, foi feito como descrito pela equação 1:

$$\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mL} = \frac{A.V_{tr}.10^6.1}{\varepsilon.V_a.T} \quad (1)$$

Sendo que:

A = absorbância/min

ε = coeficiente de extinção molar

VTR = volume total da reação (mL)

Va = volume de amostra (mL)

T = Tempo de reação (1 minuto)

10^6 = fator de transformação de mol para μmol

1 = 1 cm de passo óptico

Dividindo o resultado da equação 1 pela concentração de proteínas da amostra em g/mL, foi obtida a atividade da enzima em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteínas.

4.7 Análise de dados

A IC_{50} das enzimas foi calculada utilizando a equação da reta do percentual da atividade da colinesterase *versus* log concentração de inibidor, e o coeficiente de regressão destas retas foram calculados utilizando o método dos quadrados mínimos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Sabe-se que os produtos de origem natural sempre estiveram presentes em todas as civilizações e em todos os tempos (Cardoso, 2009). A análise do desenvolvimento das diferentes civilizações demonstra grande riqueza no que tange exemplos do uso dos recursos naturais na medicina, tais como o alívio da dor, controle de pragas e tratamentos (Viegas Jr, et al. 2006).

Os estudos químicos e farmacológicos direcionados a produtos naturais possuem enorme importância para o conhecimento acadêmico, como também econômico e social (Cardoso, 2009). Os estudos de plantas comumente utilizadas pela população e encontradas na natureza, levaram a elucidação de suas estruturas químicas e subsidiou estudos fitoquímicos das diversas substâncias, as quais foram adicionadas aos compêndios oficiais (as farmacopeias). Dessa forma foram introduzidas na terapêutica e utilizadas como medicamentos (Viegas Jr, et al. 2006).

Calixto (2003) ressalta que cerca de um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, apesar de que apenas 10% da biodiversidade mundial tenha sido estudada. Existem muitos metabólitos isolados e caracterizados, os quais ainda não sofreram avaliação quanto a sua ação biológica. Estes metabólitos isolados podem ser potenciais para o desenvolvimento de novos medicamentos para o uso na terapêutica de várias doenças que assolam a população e que ainda não possuem tratamentos eficazes.

A DA é uma doença crônica e se caracteriza pelo potencial neurodegenerativo e alta progressividade, levando à perda da cognição e a mudança comportamental devido ao déficit colinérgico no SNC (Grossberg, 2003). Segundo Viegas Júnior (2003), a DA representa um grande impacto socioeconômico mundial, pois é responsável por cerca de 50-60% do número total de casos de demência dentre pessoas acima dos 65 anos, atingindo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo.

De acordo com a *Alzheimer's Associations*, cerca de 5,3 milhões de americanos de todas as idades foram diagnosticados com a doença de Alzheimer em 2015. Dados obtidos ressaltam que, com o crescimento populacional do país, a proporção de pessoas com DA aumentará

proporcionalmente, estimando-se um crescimento de 40%, ou seja, cerca de 13,5 milhões no ano de 2050. Além disso, vem se tornando a causa mais comum de morte entre pessoas de 65 anos ou mais (ALZHEIMER'S ASSOCIATIONS, 2015). Atualmente, não bastasse a inexistência de cura para a DA, o tratamento ainda é bem restrito; muito em virtude de haver apenas medicamentos que auxiliam na diminuição dos sintomas cognitivos, como os anticolinesterásicos, de modo que apenas 3 são aprovados pelo FDA (SMALL et al., 2011).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou a busca por substâncias com potencial anticolinesterásico que sejam promissoras para o tratamento cognitivo da DA. Onde foi avaliada a atividade da acetilcolinesterase nos eritrócitos humanos e a butirilcolinesterase plasmática, após exposição *in vitro* por extratos naturais de plantas brasileiras (GIACOBINI, 2004).

Para a avaliação da atividade enzimática foi necessário a construção de três curvas analíticas com a solução de albumina bovina (BSA), a partir de uma solução estoque (500 µg/mL) (BRADFORD, 1976). A equação da reta obtida foi $y = 0,0134x - 0,0145$ e o R obtido foi de 0,9929 (Figura 1). Onde, posteriormente foram comparados com os resultados obtidos das amostras.

Tabela 5: Dados da curva analítica de proteínas feita com o tampão fosfato.

QUANTIDADE DE PROTEÍNA (µG)	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
5	0,0707	0,0015
10	0,1300	0,0028
25	0,2777	0,0204
40	0,5000	0,1000
50	0,6873	0,0431

Cada leitura foi realizada em triplicata no comprimento de onda de 595 nm.

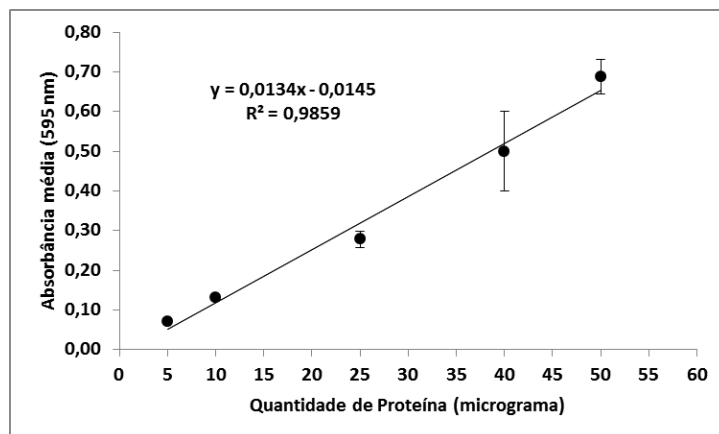


Figura 3: Curva analítica de proteína feita com tampão fosfato pH 8,0.

De acordo com os dados apresentados na Figura 3, estes demonstram que o método de determinação de proteínas apresentou linearidade aceitável - de acordo com os requisitos exigidos pela Resolução número 899, de 29 de Maio de 2003 (ANVISA, 2003).

Após a obtenção da curva analítica de proteínas, foram realizadas as análises das colinesterases no intuito de se obter os valores da IC50 das enzimas humanas AChE e BChE. Desta maneira, obtiveram-se as curvas de porcentagem de atividade *versus* concentração de Taxifolina, representadas nas Figuras 4 e 5.

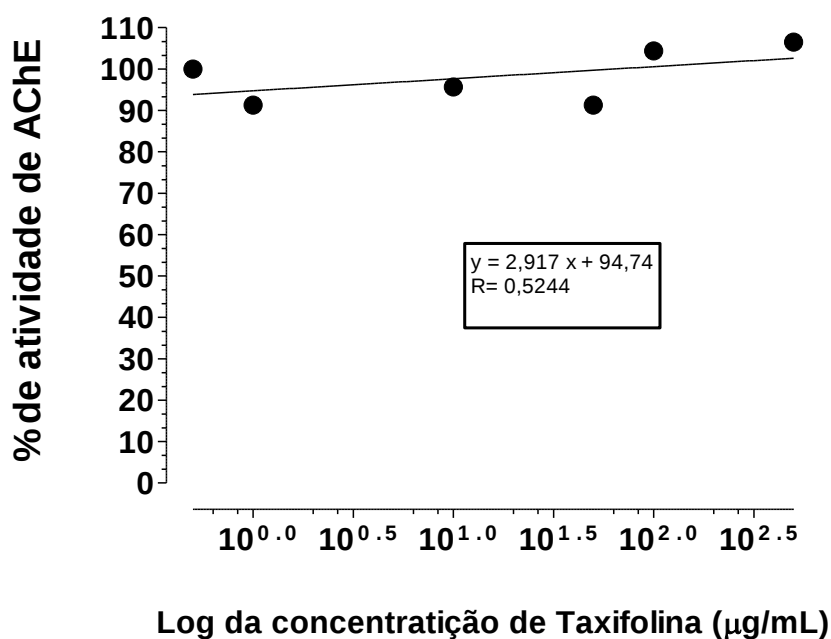


Figura 4: Porcentagem da atividade da AChE em função do Log da concentração de Taxifolina.

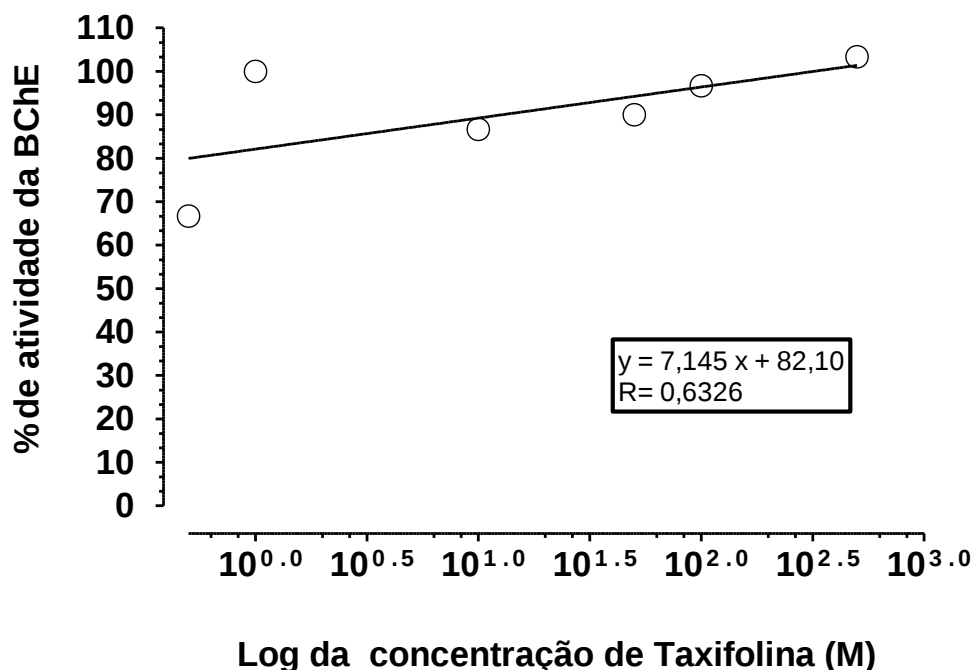


Figura 5: Porcentagem da atividade da BChE em função do Log da concentração de Taxifolina.

De acordo com a Tabela 6 e Figuras 4 e 5, as curvas da porcentagem da atividade enzimática em função do log da concentração de taxifolina, demonstraram que não foi possível calcular os valores de IC₅₀, uma vez que nas concentrações testadas não houve inibição enzimática significativa. Para aumentar a concentração de taxifolina, seria necessário utilizar solventes apolares, pois a taxifolina é pouco solúvel em água. No entanto, porcentagens acima de 1% de solventes orgânicos podem induzir efeitos tóxicos para as enzimas avaliadas (EHRICH et al., 1997).

Tabela 6. Equações da reta de inibição das enzimas AChE e BChE com os respectivos coeficientes regressão.

Inibidor	Enzima	Equação da Reta	R
Taxifolina	AChE	$y = 2,917 x + 94,74$	0,5251
Taxifolina	BChE	$y = 7,145 x + 82,10$	0,6326

A taxifolina (Figura 4) é um flavonóide comumente presente na maioria das espécies de plantas a qual, além das atividades antirradicais e

químio preventivas, apresentou atividade antifúngica e anticolinesterásica (VIEIRA JUNIOR, 2010). Esta diferença de resultado com os dados do presente trabalho pode ser explicada pela metodologia utilizada pelos autores, que foi baseada na cromatografia em camada delgada e não em avaliação bioquímica (MARSTON *et al.*, 2002).

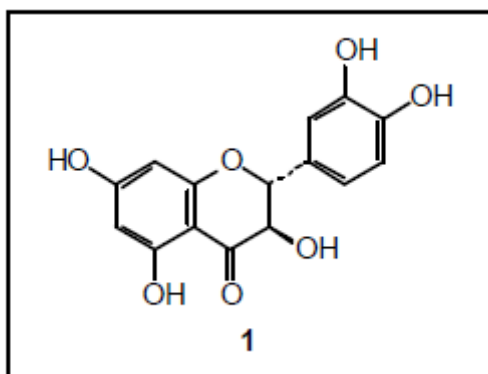


Figura 6. Estrutura química da taxifolina (Fonte: VIEIRA JUNIOR, 2010).

Grossberg (2003) cita que uma das principais consequências do mal de Alzheimer é a perda da capacidade cognitiva em função do déficit do neurotransmissor acetilcolina. Dito isso, uma das estratégias atuais mais aceitas para o tratamento da DA é o uso de agentes anticolinesterásicos capazes de aumentar a concentração do neurotransmissor nos receptores nicotínicos e muscarínicos, aumentando assim a sua disponibilidade nas terminações nervosas.

Após a realização das análises e a obtenção dos dados de concentração, dentre os compostos de origem naturais testados para a inibição enzimática, tanto da acetilcolinesterase em eritrócitos humanos quanto da butirilcolinesterase plasmática, a amentoflavona apresentou maior afinidade para inibir a BChE.

A Figura 7 demonstra o potencial inibitório da amentoflavona para a atividade da BChE em diferentes concentrações, o qual apresentou coeficiente de regressão linear $> 0,95$, sendo possível estimar a IC_{50} da amentoflavona através de curvas semi-log. Ao comparar com a curva de inibição da AChE (Figura 8) identificou-se que não houve linearidade, podendo concluir que a substância apresenta baixo poder de inibição para a esterase eritrocitária nas condições avaliadas.

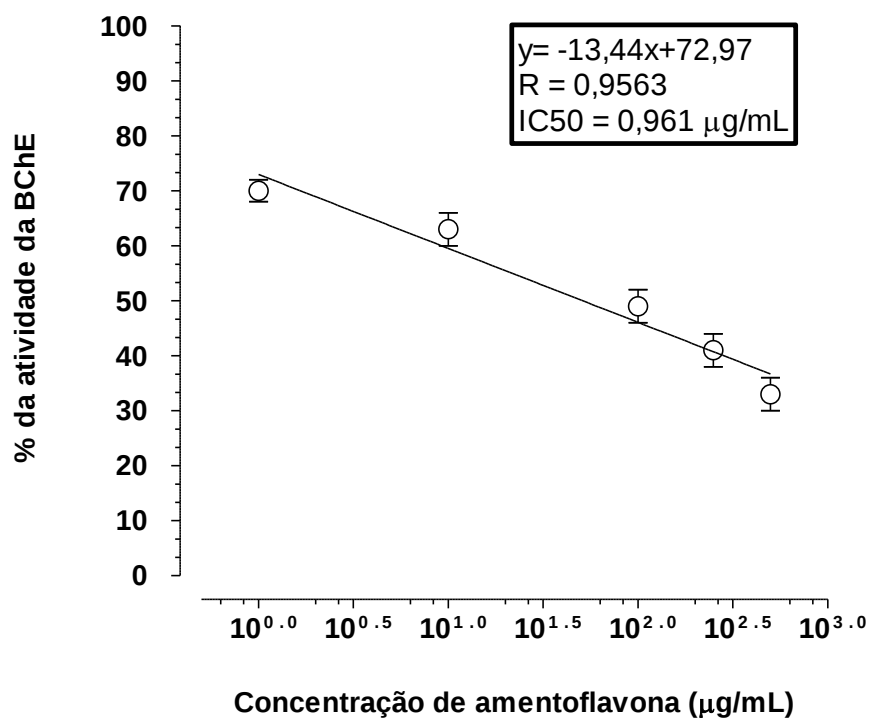


Figura 7. Gráfico de concentração *versus* resposta para BChE em função do log da concentração de amentoflavona.

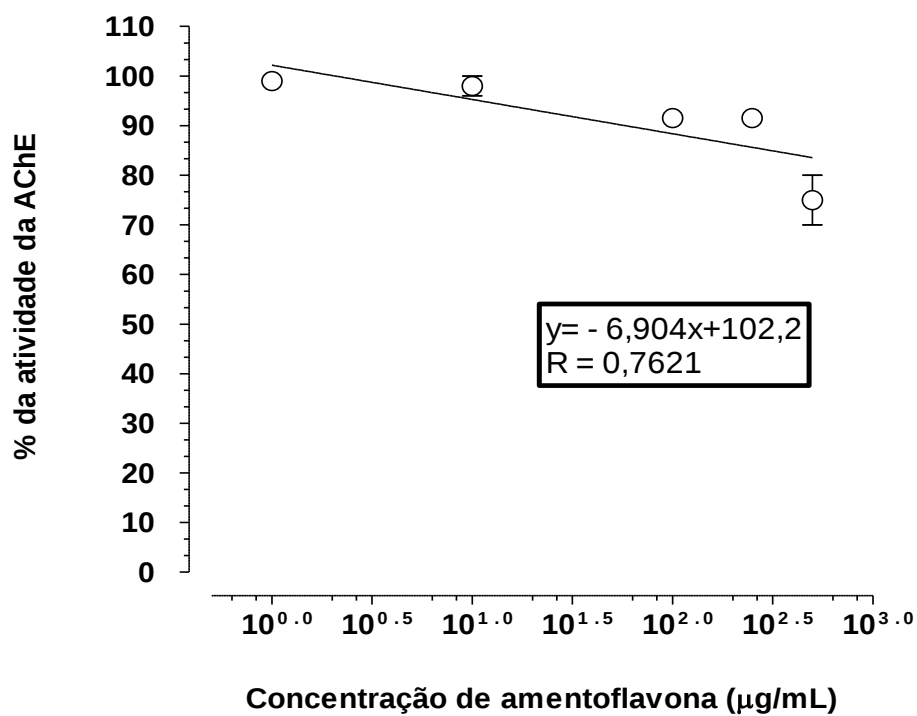


Figura 8. Gráfico de dose *versus* resposta para AchE em função do log da concentração de amentoflavona.

De acordo com Suzuki *et al.* (1999) a amentoflavona é um biflavonoide comumente encontrado em espécies do gênero *Hypericum* e *Clusiaceae*, onde constatou-se que apresenta atividade anti-imunodeficiência humana (HIV); além de se apresentar eficaz em processos de redução da peroxidação lipídica, mecanismo no qual diminui a formação de radicais livres danosos a membrana celular. Apesar de suas propriedades ainda não estarem concretamente definidas, outros estudos demonstraram que a amentoflavona possui importantes potenciais farmacológicos, tais como: ação analgésica, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antinocepsiva, antioxidante, antiparasitária, antiviral, antitumoral, citotóxica, imunomoduladora e hipolipidêmica - os quais a maioria apresentou resultados promissores (Ferreira *et al.* 2012).

Os biflavonóides constituem uma classe de flavonóides diméricos, ligados por uma C-O-C ou uma ligação C-C, envolvendo os anéis A, B ou C de seus monômeros. Os grupos de biflavonóides são classificados de acordo com a ligação entre os átomos de carbono de cada unidade flavônica. A amentoflavona apresenta-se ligada a C-3'→C-8''' entre os anéis A e B (flavona-flavona), podendo ocorrer prenilações em C-6'', originando as amentoflavonas preniladas (SUZART *et al.*, 2007). Além disso, difere-se dos outros biflavonóides por possuir um átomo de hidrogênio ligado em R₁, R₂ e R₃ (Ferreira *et al.* 1999).

Pressupõe-se que tais características estruturais podem ser atribuídas à sua atividade seletiva para inibir BChE, uma vez que podem ser possíveis sítios de interação com a enzima, assim como também a sua conformação pode estar relacionada à interação com o sítio enzimático. Segundo um estudo realizado por Freitas *et al.* (2009) as diferenças de seletividade entre AChE e BChE podem ser explicadas pelas suas estruturas, consequência dos diferentes aminoácidos presentes em cada um dos sítios de ligação e está diretamente ligada à acomodação e seletividade dos diferentes inibidores destas estas esterases. Tem sido demonstrado que, mesmo com 54% de semelhança estrutural, a BChE apresenta cavidade de ligação maior do que a AChE (SHENOUDA *et al.*, 2009).

Ainda conforme Freitas, *et al.* (2009), a redução da atividade da acetilcolinesterase leva a uma elevação da atividade da butirilcolinesterase nas

sinapses nervosas. Deste modo, propõe-se que a hidrólise de ACh seja controlada por esta enzima durante o desenvolvimento da DA, atuando de maneira compensatória.

Bono (2014) ressalta que a BChE é a principal colinesterase envolvida na hidrólise da acetilcolina plasmática e atua de forma secundária na hidrólise desse neurotransmissor no sistema nervoso central. Atualmente, existem dois fármacos com maior afinidade pela AChE, a donepezila e a galantamina, e apenas um capaz de inibir ambas as enzimas de maneira igualitária, a rivastigmina. Neste contexto, pode-se dizer que a produção de fármacos com dupla ação (inibir AChE e BChE) podem agir de maneira sinérgica, elevando os benefícios do tratamento sintomático da DA.

Em contrapartida, ainda não existem estudos descritos na literatura que possam demonstrar relação estrutura atividade entre biflavonóides como a amentoflavona (Figura 9). Sem dúvida, outros estudos adicionais (*in vitro* e *in vivo*) são fundamentais para o esclarecimento dos resultados obtidos.

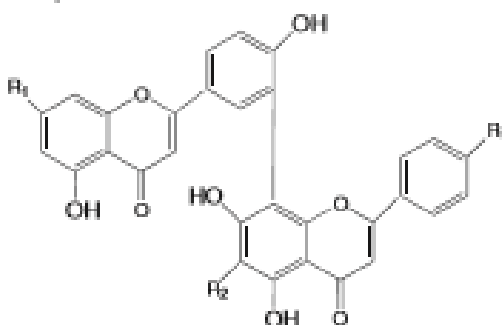


Figura 9. Estrutura química geral da amentoflavona (Fonte: FERREIRA et al., 2012).

Também, foi avaliado o potencial anticolinesterásico da rutina (Figura 10), que vem se destacando por apresentar importantes atividades farmacológicas. Pedriali (2005) explica que a rutina é um flavonol glicosídico pertencente a uma importante classe de flavonóides, extensamente encontrados na natureza. Este composto apresenta grande importância terapêutica devido a ação antiradicalar característica de compostos polifenólicos, além de possuir propriedade protetora através do aumento/normatização da permeabilidade, aliado à resistência dos capilares sanguíneos e vasos linfáticos.

Várias outras atividades da rutina foram identificadas, tais como: eficiência no tratamento contra *Cândida albicans*, ação antihiperlipidêmica, efeito anticonvulsivante em ratos, supressão da imunidade celular, atividade anticarcinogênica e efeito antiinflamatório (BECHO, et al. 2009) .

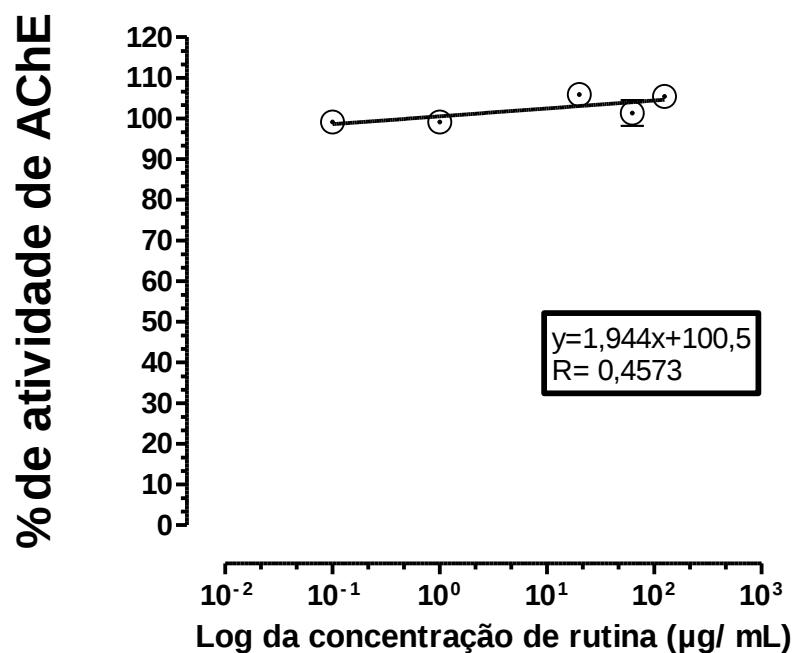


Figura 10. Gráfico de dose *versus* resposta para AChE em função do log da concentração da rutina.

Na análise da curva de percentual de atividade anticolinesterásica obtida da rutina (Figura 10), demonstra que não houve inibição enzimática significativa, ademais, obteve-se baixa linearidade, impossibilitando a realização dos cálculos de IC₅₀. A baixa inibição enzimática pode estar relacionada à fraca solubilidade do ativo em água, a qual dificultou a análise. Fator que também pode estar associado à baixa concentração utilizada.

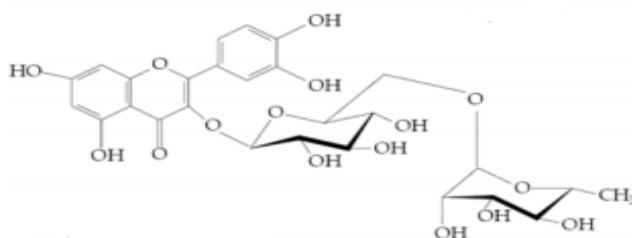


Figura 11. Estrutura da rutina. (Fonte: BECHO et al., 2009)

De acordo com PEDRIALLI (2005), em geral os flavonóides apresentam solubilidade em meio aquoso e etanólico, devido suas ligações glicosídicas e o maior número de hidroxilas livres. Poucos grupos são parcialmente solúveis em água, como a rutina. O mesmo PEDRIALLI demonstrou que para o aumento da solubilização e interação com o solvente, é necessária a adição de grupamentos polares como os sulfatos e carboxilatos em seus açúcares, propiciando assim, ligações de hidrogênio. Ao passo que, o aumento da proporção hidroalcolica pode inviabilizar a análise enzimática.

A intenção deste trabalho era de calcular as razões $IC_{50} \text{ BChE} / IC_{50} \text{ AChE}$ (GIACOBINI, 2004) para os compostos avaliados para então comparar com os fármacos já aprovados pelo FDA como a rivastigmina (razão = 1,1). No entanto, nenhuma das substâncias avaliadas possibilitou o cálculo desta razão e a baixa solubilidade destes compostos em meio aquoso foi uma grande limitação.

6. CONCLUSÃO

Dentre os testes realizados com substâncias isoladas de extratos de plantas, o biflavonóide amentoflavona foi o único a apresentar inibição significativa para a colinesterase plasmática humana *in vitro*. A taxifolina e a rutina não apresentaram efeitos satisfatórios para inibir AChE e BChE. Para tal, acreditou-se que tais resultados estejam relacionados à baixa solubilidade destes flavonóides nas soluções aquosas, bem como as baixas concentrações utilizadas nos testes *in vitro*.

Obteve-se apenas a IC₅₀ da BChE testada com amentoflavona. A rutina e taxifolina, por não apresentarem efeitos inibitórios significativos para ambas as enzimas não foi possível estimar suas IC₅₀.

Em virtude da não obtenção das concentrações inibitórias, a razão IC₅₀ da BChE/ IC₅₀ da AchE das substâncias bioativas não puderam ser obtidas, desta forma, comparação com a rivastigmina - fármaco mais utilizado na terapêutica do Mal de Alzheimer atualmente, não pode ser realizada. O próximo passo para este estudo seria: solucionar problemas de solubilidade das substâncias testadas e ainda, selecionar mais moléculas de origem natural com atividade anticolinesterásica e a posterior administração em modelos animais para avaliação de estratégias de tratamento para a DA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAZ – Associação Brasileira de Alzheimer. **Sobre Alzheimer: Fatores de Risco**. Disponível em <<http://www.abraz.org.br/sobre-alzheimer/fatores-de-risco>>. Acesso em: 5 de ago. 2014.

ALZHEIMER ASSOCIATIONS. **Fatos e números da doença de alzheimer em 2015**. Disponível em <<https://www.alz.org/facts/overview.asp>> Acesso em 01 Jun. 2015.

Associação Americana de Alzheimer – ALZ. Fatos e Figuras: Estatísticas da doença de Alzheimer 2014. **Alzheimer's e demência**. v.10, ed. 2. Disponível em:<http://www.alz.org/alzheimers_disease_facts_and_figures.asp#prevalenc> . Acesso em: 29 de Jul. 2014.

BECHO, J. R. M., et al. **RUTINA – ESTRUTURA, METABOLISMO E POTENCIAL FARMACOLÓGICO**. Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, v. 1, n. 1, p. 21 - 25, 2009.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. Indústria Agroquímica, perfil. **Fórum de Competitividade, diálogo para o desenvolvimento**. Brasília, 2007b. Impresso.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agronegócio. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 03 jul. 2014

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathol**, v. 82, p. 239 – 259, 1991.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, p 679-688, 2009.

BONO, G. F. **INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A BUTIRILCOLINESTERASE E A DOENÇA DE ALZHEIMER**. Dissertação (mestrado em genética). Universidade Federal do Paraná- UFPR. Curitiba, 2014.

CARDOSO, C. R. P. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE PLANTAS PERTENCENTES AO CERRADO BRASILEIRO E SEUS COMPOSTOS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO**. Tese (doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia). Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Araraquara, 2009.

CHAVES, B. A.T. Flavonoide Morina: avaliação *in vitro* do sistema de oxidação e implicações da doença de Alzheimer. **Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALE. Centro de ciências da saúde**. Itajaí. 2013. Disponível em: <<http://siaibib01.univali.br/pdf/Bruna%20Alayde%20Tridapalli%20Chaves.pdf>>. Acesso em: 3 de jul. 2014.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – CEPEA. Relatório PIBAGRO Brasil. **GDP Agribussines**. Brasil. Dez. 2013. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea_PIB_BR_dez13.pdf>. Acesso em: 19 de jul. 2014.

ECOAGRO. Agronegócio no Brasil. Disponível em: <<http://www.ecoagro.agr.br/agronegocio.php>>. Acesso em: 21 de jul. 2014>.

EHRICH, M., CORRELL, L., VERONESI, B. Acetylcholinesterase and neuropathy target esterase inhibitions in neuroblastoma cells to distinguish organophosphorus compounds causing acute and delayed neurotoxicity. **Fundam. Appl. Toxicol.** V.38, p.55–63, 1997.

EMERICK, G. L.; et al. Comparative in vitro study of the inhibition of human and hen esterases by methamidophos enantiomers. **Toxicology**, v. 292, n. 2-3, p.145-150, 2012a.

EMERICK, G. L.; et al. Semipreparative enantioseparation of methamidophos by hplc-uv and preliminary in vitro study of butyrylcholinesterase inhibition. **Environ. Toxicol. Chem.**, vol. 31, n. 2, p. 239-245, 2012b.

EMERICK, G. L.; PECCININI, R. G.; OLIVEIRA, G. H. Organophosphorus-induced delayed neuropathy: a simple and efficient therapeutic strategy. **Toxicol. Lett.**, v. 192, p. 238-244, 2010.

ELLMAN, G. L.; et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v.7, p.88-95, 1961.

FERREIRA, Rafaela Oliveira; CARVALHO, Mário Geraldo de; SILVA, Tania Maria Sarmiento da. Ocorrência de biflavonoides em Clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 35, n. 11, p. 2271-2277, 2012 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012001100035&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 Mai. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012001100035>.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K.; J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, v 66, p 137, 1999

FREITAS, Humberto F.; PAZ, Odailson S.; CASTILHO, Marcelo S.. Estudos de QSAR 3D para um conjunto de inibidores de butirilcolinesterase humana. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 32, n. 8, p. 2114-2121, 2009 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000800024&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 06 Jun. 2015.

GASQUES, J. G.; et al. Desempenho e crescimento do agronegócio no Brasil. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – Ipea**. Brasília, Fev. 2004.

Disponível em: <<http://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/2701>> . Acesso em 31 jul. 2014.

GROSSBERG, G. T. Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Getting On and Staying On. **Current therapeutic research**, v. 64, n. 4, abr. 2003.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 433–440, 2004.

HERRERA, EJ; CARAMELLI, P; SILVEIRA, AAS; NITRINI, R. **Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population**. Alzheimer Dis Assoc Disord, v.16, n.2, p. 103-8, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Síntese de Indicadores Sociais: Uma análise das condições de vida da população brasileira**. Rio de Janeiro – RJ. Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. n. 32, 2013.

MARQUES, T. H. C., et al. **ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA E PERFIL QUÍMICO DE UMA FRAÇÃO CROMATOGRÁFICA ATIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES *Bellis perennis* L. (Asteraceae)**. Quimica Nova, Vol. 36, No. 4, 549-553, 2013. Disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol36No4_549_11-AR12594.pdf> Acesso em 29 Mai. 2015.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Informação Científica e Tecnológica. 2014.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em 20 Mai. 2015.

NASCIMENTO, L. A. S., et al. **Biflavones and triterpenoids isolated from *Ouratea castaneifolia* (DC.) Engl., Ochnaceae**. Revista Brasileira de Farmacognosia ed. 19, v.4, p. 823-827, Out./Dez. 2009

OIT. Agricultura e setores baseados em recursos biológicos. Enciclopedia de Saúde e Segurança do Trabalho. pp. 64.2-64.77. vol. III, parte X, capítulo 64. 2011. Disponível em <www.mtas.es/Publica/enciclo/default.htm>. Acesso em 31 de jul. 2014

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação das suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005, 127 p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Estado de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-farmacêutica. São Paulo.

PERES, F.; ROZEMBERG, B.; ALVES, S.R.; MOREIRA, J.C.; OLIVEIRA-SILVA, J.J. Pesticide use reporting in a rural area of Rio de Janeiro State, Brazil. **RevSaúde Pública**, v.35, 564-570, 2001.

PIRES, D. X.; CALDAS, E. D.; RECENA M. C. P. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, no.3, p.804-814, Jun. 2005a.

PIRES, D. X.; CALDAS, E. D.; RECENA, M. C. P. Uso de agrotóxicos e suicídios no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21(2), p.598-605, mar-abr, 2005b.

RANGEL F.; et al. Inflamação e mal de alzheimer: possível papel da doença periodontal. **Rev. Periodontia**, v. 22, p. 41-46, jun. 2012.

RIBEIRO, A. C. C.; MELLA, E. A. C. Intoxicação ocupacional por organofosforados – a importância da dosagem de colinesterase. **Iniciação Científica**. Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, v. 09, n.02, p. 125-134, Jul./Dez. 2007.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev. Psiquiatr.** Rio Grande do Sul, v. 30, 2008

SIMÕES, C. M. O et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: **Editora da UFRGS**, 2007. 13 p.

SINGH, M.; KAUR, M.; KUKREJA, H.; CHUGH, R.; SILAKARI, O.; SINGH, D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.70, p.165-188, 2013.

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. Casos registrados de intoxicação e/ou envenenamento - 2011. **FIOCRUZ**. Brasil. 2014. Disponível em:
<http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=386>.
Acesso em: 27. Jul. 2014.

SILVA, M. S.; et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciênc. saúde coletiva**. v.10, n.4, Rio de Janeiro out./dez. 2005.

SHENOUDA J, GREEN P, SULTATOS L. An evaluation of the inhibition of human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase by the organophosphate chlorpyrifos oxon. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** V.241, p.135–142, 2009.

SUZART, Luciano R. et al . Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). **Quím. Nova**, São Paulo , v. 30, n. 4, p. 984-987, Aug. 2007 .

Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000400038&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 Mai. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000400038>.

SUZUKI, A., et al. Properties of amentoflavone, a potent caffeine-like Ca²⁺ releaser in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **European Journal of Pharmacology**. vol. 372, p. 97–102, Mai. 1999.

SCHEFFER, J.F.; GONZÁLES, F.H.D. Enzimologia clínica em medicina veterinária. **Seminário de Bioquímica Clínica**. Faculdade de Veterinária, UFRGS, 2003. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/lacvet/outras_publicacoes.php?id_publicacao=73>. Acesso em: 9 de ago. 2014.

VIEGAS JUNIOR, Cláudio et al . Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 27, n.4, p. 655-660, Aug. 2004 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000400021&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 27. Mai. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000400021>.

VIEIRA JÚNIOR, G. M., et al. Potencial atividade antifúngica, anticolinesterásica e anti-HIV de taxifolina, isolada de *Casearia gossypiosperma*. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 2007.

WESSELING, C.; CORRIOLSB, M.; BRAVO, V. Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.207, p.s697-s705, 2005.

YAMAGUCHI, L. F, et al. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Elsevier. Phytochemistry**. 2004.

ZERAIK, M. L.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. In: **VI Encontro sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul**. EMBRAPA, Pelotas – RS, p. 163-166, abr. 2014.

ANEXOS

Anexo A:



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 09/2009

Interessado: Guilherme Luz Emerick

Projeto: Avaliação da neurotoxicidade de formas enantioméricas de praguicidas organofosforados: um estudo comparativo em células humanas e de galinhas

Parecer nº 31/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Avaliação da neurotoxicidade de formas enantioméricas de praguicidas organofosforados: um estudo comparativo em células humanas e de galinhas", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos manifestando-se FAVORAVELMENTE à sua execução.

O relatório final do projeto de pesquisa deverá ser entregue em agosto de 2012, no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 04 de agosto de 2009.



Prof.^a Dr.^a AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

Anexo B:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____,
RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente à
(rua/av) _____, nº _____, Bairro _____, Cidade
_____, Telefone _____.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade estabelecer um protocolo para avaliação da toxicidade de agrotóxicos que são muito utilizados em todo o Brasil.
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para que um diagnóstico preciso possa ser dado pela equipe de saúde sempre que houver um quadro típico de intoxicações por agrotóxicos.
3. Doarei para a realização dessa pesquisa, o seguinte material biológico: não mais do que 10 mililitros de sangue que serão utilizados exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisa posterior;
4. A minha participação como voluntário se restringirá à doação de sangue e se encerra após a doação do material biológico;
5. Ao participar desta pesquisa, os voluntários estarão tendo o desconforto normal de todo doador de sangue, e o Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Mato Grosso UFMT – campus universitário de Sinop toma todos os cuidados cabíveis para evitar qualquer risco ao doador;
6. Não há necessidade de retorno do doador para uma coleta posterior;
7. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
8. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou da Instituição (ICS/UFMT/CUS);
9. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
10. Estou ciente de que o material a ser doado será utilizado **exclusivamente** nesta pesquisa, não podendo ser armazenado para uso posterior sem o meu consentimento;
11. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização;
12. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica pelo telefone (66) 9699-0282 com Guilherme Luz Emerick, pesquisador responsável pelo estudo;

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária (o), do estudo “COLINESTERASES SANGUÍNEAS HUMANA: ESTRATÉGIA PARA SELEÇÃO DE AGENTES POTENCIALMENTE EFICAZES PARA TRATAMENTO DO MAL DE ALZHEIMER”.

Sinop, MT/...../.....

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

Anexo C:

Termo de doação de material biológico

Eu,....., RG
....., Brasileiro, maior e responsável, estado civil,
profissão....., residente à (rua/av)
....., cidade
....., Mato Grosso, no pleno gozo de minhas
faculdades mentais e de minha livre e espontânea vontade autorizo ao acadêmico do
curso de Farmácia, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Mato
Grosso – *campus* universitário de Sinop, a retirar não mais do que 10 mililitros de meu
sangue, a qual serão doados e utilizados na pesquisa “COLINESTERASES
SANGUÍNEAS HUMANA: ESTRATÉGIA PARA SELEÇÃO DE AGENTES
POTENCIALMENTE EFICAZES PARA TRATAMENTO DO MAL DE
ALZHEIMER”, sob a responsabilidade do pesquisador Guilherme Luz Emerick.

Sinop,/...../.....

Assinatura do voluntário

Obs: procedente do voluntário da pesquisa (no caso de óbito do voluntário o termo de doação deverá ser assinado pelos familiares).

Sinop, 11 de Junho de 2015.

Acadêmica: Mylena Paris

Orientador: Prof. Guilherme Luz Emerick