

**EFEITO INIBITÓRIO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA  
AÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE,  
BUTIRILCOLINESTERASE E TIROSINASE.**

Humberto Melo Salustiano

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Trabalho efetuado sob orientação de:**

Dra. Luísa Custódio, Investigadora no Centro de Ciências do Mar (CCMar),  
Universidade do Algarve

**2014**

## **Efeito inibitório de compostos fenólicos na ação da acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e tirosinase**

Declaro ser o autor deste trabalho que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

*Copyright em nome de Humberto Melo Salustiano. A universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.*

“ Faças o que fizeres, segue sempre o teu eixo”

- Ana Melo.

Agradecimentos,

É uma honra poder iniciar a apresentação desta dissertação de mestrado da forma mais justa possível, agradecendo a todos os que de alguma forma contribuíram para que este dia chegasse.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Luísa Custódio pelo apoio que me deu na revisão deste documento, bem como na realização do trabalho prático no laboratório. Estendo este agradecimento a todo o grupo de investigação do Centro de Ciências do Mar (CCMar), liderado pelo Professor Doutor João Varela, que me acolheu como membro da equipa, auxiliou e aconselhou durante a realização do presente trabalho.

A todos os colegas que fizeram parte do meu percurso académico, pela partilha de informação, pela camaradagem e pelos momentos lúdicos por eles proporcionados. Destes, destaco o meu colega João Neto por toda a amizade e bons momentos vividos durante estes cinco anos.

Ao colega de curso Mestre David Estevão, pelo auxílio prestado na revisão e correção desta dissertação.

Aos amigos mais próximos Daniela Duarte, Wilson Faria, Rita Ricardo, Joana Santos, Inês Rita, Priscila Santos e Guida Miguel pelo apoio prestado e pela amizade incondicional, pois sem eles tudo teria sido mais difícil.

Aos meus avós paternos, que sempre demonstraram o desejo de ver o neto a concluir o ensino superior. Saibam que o vosso desejo foi cumprido com sucesso.

À restante família, primos, tios e bisavós pelo amor, carinho e respeito.

Por fim, agradeço à mulher que tornou tudo isto possível. Dedico esta dissertação, à minha mãe. Mãe que foi mãe, pai, amiga, companheira e confidente. Agradeço-lhe por todos os valores e lições de vida que me transmitiu, bem como por todos os sacrifícios realizados para que este momento fosse possível.

## Índice de Matérias

Índice de Matérias.....	4
Índice de Figuras.....	5
Índice de Quadros .....	5
Índice de Tabelas .....	6
Índice de Gráficos .....	6
Resumo .....	7
<i>Abstract</i> .....	8
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	9
Lista de Símbolos.....	11
<b>1 Capítulo 1</b> .....	12
1.1 Enquadramento Teórico e Justificação do Estudo.....	13
1.2 Objetivos.....	14
1.3 Organização da Dissertação.....	15
<b>2 Capítulo 2</b> .....	16
2.1 Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE).....	17
2.1.1 Classificação e Caracterização .....	17
2.1.2 Função Biológica.....	19
2.1.3 Inibidores da Atividade Enzimática .....	21
<b>3 Capítulo 3</b> .....	31
3.1. Tirosinase (TYRO) .....	32
3.1.1. Análise Estrutural e Localização Celular .....	32
3.1.2. Mecanismo de Catálise.....	33
3.1.3. Papel da Tirosinase na Produção das Melaninas.....	34
3.1.4. Inibidores da TYRO .....	37
3.2. Neuromelanina e Tirosinase: Papel na Doença de Parkinson (DP).....	41
<b>4 Capítulo 4</b> .....	43
4.1. Compostos Fenólicos como Inibidores da AChE, BChE e TYRO.....	44
4.1.1. Caracterização dos Compostos Fenólicos .....	44
4.2. Interesse Clínico dos Compostos Fenólicos .....	50
4.2.1. Efeito Inibitório de Compostos Fenólicos sobre a AChE e a BChE.....	51
4.2.2. Efeito Inibitório de Compostos Fenólicos sobre a TYRO.....	54

<b>5</b>	<b>Capítulo 5</b> .....	56
5.1	Trabalho Experimental .....	57
5.1.1	Materiais e Métodos .....	57
5.1.2	Resultados e Discussão.....	62
<b>6</b>	<b>Capítulo 6</b> .....	81
6.1	Conclusões e Perspetivas .....	82
6.2	Referências Bibliográficas .....	83

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1</b>	- Representação do sítio ativo da acetilcolinesterase.....	18
<b>Figura 2.2</b>	- Mecanismo da hidrólise da acetilcolina mediado pela acetilcolinesterase	21
<b>Figura 3.1</b>	- Ciclo reativo catalisado pela tirosinase.....	34
<b>Figura 3.2</b>	- Estrutura química da L-Tirosina. ....	35
<b>Figura 3.3</b>	- Via biossintética de formação da melanina, com destaque para os passos catalisados pela tirosinase.....	36
<b>Figura 3.4</b>	- Estruturas químicas da hidroquinona, arbutin e ácido Kójico. ....	38
<b>Figura 3.5</b>	- Fotografias ilustrativas das principais manifestações da acumulação excessiva de melanina. ....	40
<b>Figura 3.6</b>	- Classes de compostos utilizados no tratamento e prevenção da hiperpigmentação.....	41
<b>Figura 4.1</b>	- Estrutura química dos principais grupos de flavonóides. ....	44
<b>Figura 4.2</b>	- Estrutura química dos ácidos fenólicos. ....	47
<b>Figura 4.3</b>	- Estrutura química base dos estilbenos. ....	48
<b>Figura 4.4</b>	- Estrutura química base dos curcuminóides.....	49
<b>Figura 4.5</b>	- Exemplo de estrutura dos lignanos, secoisolariciresinol. ....	49
<b>Figura 4.6</b>	- Interação do grupo aromático do ácido cafeico com a região aniónica periférica (Trp 279) da acetilcolinesterase. ....	52
<b>Figura 5.1</b>	- Exemplo representativo do preenchimento da placa de 96 poços. ....	60

## Índice de Quadros

<b>Quadro 2.1</b>	Efeito da acetilcolina nos diferentes órgãos/sistemas. ....	20
-------------------	---	----

<b>Quadro 2.2</b> Classes de inibidores das colinesterases e exemplos de compostos com e sem autorização de introdução no mercado em Portugal.....	23
<b>Quadro 2.3</b> Efeitos farmacológicos dos inibidores das colinesterases.....	25
<b>Quadro 4.1</b> Principais compostos de cada um dos grupos que constituem os flavonóides, bem como as suas principais fontes biológicas. ....	45
<b>Quadro 4.2</b> Exemplos de alcalóides e terpenos fenólicos e respetivas fontes biológicas. ....	50
<b>Quadro 4.3</b> Compostos fenólicos com atividade inibitória comprovada da acetilcolinesterase e suas fontes biológicas. ....	53
<b>Quadro 5.1</b> Compostos analisados, fornecedor e respetivo número de registro CAS. .	57

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 5.1</b> - Efeito dos flavonóides sobre a atividade enzimática da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.....	63
<b>Tabela 5.2</b> - Efeito dos ácidos hidroxicinâmicos sobre a atividade enzimática da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.....	65
<b>Tabela 5.3</b> - Efeito dos ácidos hidroxibenzóicos sobre a atividade enzimática da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.....	67
<b>Tabela 5.4</b> - Efeito dos ácidos hidroxibenzóicos sobre a atividade enzimática da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.....	68
<b>Tabela 5.5</b> - Efeito dos flavonóides sobre a atividade enzimática da tirosinase.....	70
<b>Tabela 5.6</b> - Efeito dos ácidos hidroxicinâmicos sobre a atividade enzimática da tirosinase.....	72
<b>Tabela 5.7</b> - Efeito dos ácidos hidroxibenzóicos sobre a atividade enzimática da tirosinase.....	74
<b>Tabela 5.8</b> - Efeito dos ácidos hidroxibenzóicos sobre a atividade enzimática da tirosinase.....	76

## Índice de Gráficos

Gráfico 5.1 -. Estimulação da atividade enzimática da tirosinase pelo ácido cafeico (ACA), ácido clorogénico (AC) e hidrato de catequina (CH). ....	79
---	----

## Resumo

Os compostos fenólicos, devido às suas propriedades, são compostos de interesse no desenvolvimento de investigações de diversos âmbitos, com particular relevância no âmbito da medicina. Atualmente verifica-se um aumento da prevalência de patologias neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson. Diversos estudos citam as enzimas acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE) e tirosinase (TYRO), como determinantes no desenvolvimento destas patologias. A inibição da sua atividade enzimática promove um aumento dos níveis de neurotransmissores no cérebro, com a consequente diminuição da sintomatologia associada. Inibidores da TYRO, podem constituir-se também como alternativa terapêutica de problemas do foro dermatológico, ou ainda, como aditivo na indústria alimentar. Neste contexto, torna-se fundamental a identificação de compostos com propriedades inibitórias na atividade da TYRO. Pretendeu-se com a elaboração da presente dissertação identificar compostos fenólicos detentores de atividade inibitória sobre as enzimas supracitadas. Esta determinação foi realizada em placas de 96 poços, com base em métodos colorimétricos descritos na literatura. Dos vinte e três compostos analisados, a rutina foi o composto que demonstrou maior capacidade inibitória sobre a atividade de todas as enzimas em estudo. Para uma concentração de 250 $\mu$ M de rutina, a AChE teve a sua atividade diminuída para 68,47 $\pm$ 3,03%, a BChE para 83,29 $\pm$ 8,91% e a TYRO para 25,27 $\pm$ 4,64%. Por outro lado, as catequinas: epigalocatequina galato, epicatequina e a epigalocatequina, para uma concentração de 300 $\mu$ M, reduziram a atividade enzimática da TYRO para 49,84 $\pm$ 11,03%, 65,40 $\pm$ 3,70% e 75,64 $\pm$ 2,81%, respetivamente. Inibição, essa, superior à originada pelo composto de referência, o arbutin. Apesar de resultados promissores para alguns compostos, estes são limitativos, na medida em que apenas se reportam a uma análise *in vitro*, sem considerar a complexidade de processos que os compostos podem sofrer num organismo até atingir as enzimas alvo. Sugere-se em futuras investigações uma análise *in vivo* desses compostos.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos; Patologias neurodegenerativas; Acetilcolinesterase; Butirilcolinesterase; Tirosinase.



## ***Abstract***

Phenolic compounds, due to its properties, are compounds of interest in the development of various fields of investigations, with particular relevance for medicine. Currently there is an increased prevalence of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Several studies indicate the enzymes acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), and tyrosinase (TYRO), as determinants in the development of these disorders. The inhibition of its enzymatic activity promotes an increase in the levels of neurotransmitters in the brain, with the consequent decrease in symptoms. Inhibitors of TYRO can also be used as an alternative therapeutic treatment of dermatological disorders, or as an additive in the food industry. In this context, the identification of compounds with inhibitory properties on its enzymatic activity becomes essential. The aim of this dissertation was to identify phenolic compounds holders of inhibitory activity on the above enzymes. This determination was performed in 96 well plates using colorimetric methods described in the literature. Of the twenty-three compounds studied, rutin was the one showing the highest inhibitory effect on the activity of all enzymes studied. At a concentration of 250 $\mu$ M, the activity of AChE was reduced to 68,47 $\pm$ 3,03%, BChE to 83,29 $\pm$ 8,91%, and TYRO to 25,27 $\pm$ 4,64%. On the other hand, catechins: epigallocatechin gallate, epicatechin and epigallocatechin, at a concentration of 300 $\mu$ M, resulted in a reduction of the enzymatic activity of TYRO to 49,84 $\pm$ 11,03%, 65,40 $\pm$ 3,70% and 75,64 $\pm$ 2,81%, respectively. The inhibition was higher than the one obtained with the standard use, arbutin. Despite promising results for some compounds, they are limited as they relate only to an *in vitro* analysis, without considering the complexity of processes that compounds may undergo in the body, until they reach the target enzymes. An analysis of these compounds *in vivo* is suggested for future research.

**Key-words:** Phenolic compounds, Neurodegenerative diseases, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Tyrosinase

## Lista de Siglas e Abreviaturas

<b>4HBZ</b>	4-Hidroxibenzaldeído
<b>A</b>	Absorvência
<b>AC</b>	Ácido Clorogénico
<b>ACA</b>	Ácido Cafeico
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>AChEI</b>	Inibidor da Acetilcolinesterase
<b>ACU</b>	Ácido Cumarínico
<b>AF</b>	Ácido Ferúlico
<b>AG</b>	Ácido Gálico
<b>AGE</b>	Ácido Gentísico
<b>AIM</b>	Autorização de Introdução no Mercado
<b>AMHB</b>	Ácido m-hidroxibenzóico
<b>AP</b>	Apigenina
<b>APHB</b>	Ácido p-hidroxibenzóico
<b>AR</b>	Ácido Rosmarínico
<b>AS</b>	Ácido Salicílico
<b>ASI</b>	Ácido Siríngico
<b>ATC</b>	Ácido trans-Cinâmico
<b>AV</b>	Ácido Vanílico
<b>BChE</b>	Butirilcolinesterase
<b>BHT</b>	Butil-hidroxitolueno
<b>CH</b>	Hidrato de catequina
<b>ChE</b>	Colinesterase
<b>ChEs</b>	Colinesterases
<b>ChEI</b>	Inibidor das colinesterases
<b>ChEIs</b>	Inibidores das colinesterases
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DCL</b>	Demência de Corpos de Lewy
<b>DHICA</b>	Ácido 5,6-dihidroxiindole-2-carboxílico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DP</b>	Doença de Parkinson

<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
<b>EC</b>	Epicatequina
<b>EG</b>	Epigallocatequina
<b>EGG</b>	Epigallocatequina galato
<b>EX</b>	Exemplo
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Fig</b>	Figura
<b>FL</b>	Flavona
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração de composto que inibe em 50% a atividade da enzima. <sup>1</sup>
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>IV</b>	Intravenoso
<b>mg</b>	Miligrama, unidade de massa que se relaciona com o grama pela relação: 1 mg = 10 <sup>-3</sup> g. <sup>1</sup>
<b>ml</b>	Mililitro, unidade de volume que se relaciona com o Litro pela relação: 1 mL = 10 <sup>-3</sup> L. <sup>2</sup>
<b>mM</b>	Milimolar, unidade de concentração que se relaciona com o Molar pela relação: 1 mM = 10 <sup>-3</sup> M. <sup>2</sup>
<b>nm</b>	Unidade de medida de comprimento que se relaciona com o metro pela relação: 1 nm = 10 <sup>-9</sup> m. <sup>2</sup>
<b>PCHC</b>	Produtos de cosmética e de higiene corporal
<b>PIO</b>	Pressão intraocular
<b>QC</b>	Quercetina
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio
<b>RU</b>	Rutina
<b>SC</b>	Subcutânea
<b>Ser</b>	Serina
<b>SN</b>	Sistema Nervoso
<b>SNA</b>	Sistema Nervoso Autónomo
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervoso Periférico
<b>SNS</b>	Sistema Nervoso Somático
<b>TYRO</b>	Tirosinase
<b>UV</b>	Ultravioleta

- $\mu\text{L}$**  Microlitro, unidade de volume que se relaciona com o Litro pela relação:  $1 \mu\text{L} = 10^{-6} \text{ L}$ .<sup>1</sup>
- $\mu\text{M}$**  Micromolar, unidade de concentração que se relaciona com o Molar pela relação:  $1 \mu\text{M} = 10^{-6} \text{ M}$ .<sup>2</sup>

### **Lista de Símbolos**

- $\text{\AA}$**  Angström, unidade de medida de comprimento que se relaciona com o metro pela relação:  $1 \text{\AA} = 10^{-10} \text{ m}$ .<sup>2</sup>
- %** Percentagem
- $^{\circ}\text{C}$**  Graus Celsius<sup>2</sup>

# Capítulo 1

## 1.1 Enquadramento Teórico e Justificação do Estudo

Os compostos fenólicos são conhecidos por exibirem, em geral, uma elevada atividade antioxidante, tendo por isso o potencial de atenuar o *stress* oxidativo e reduzir o risco associado a patologias neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (AD) e doença de Parkinson (DP).<sup>3,4</sup>

Recentemente, estes compostos têm sido alvo de estudos relativos à sua capacidade inibitória de enzimas relacionadas com o desenvolvimento destas patologias, nomeadamente as colinesterases (ChEs) acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), e a tirosinase (TYRO).<sup>5,6</sup>

Com o envelhecimento tendencial da população mundial, a incidência de patologias neurodegenerativas tem vindo a aumentar com grande impacto para a saúde pública.<sup>7,8</sup> O seu impacto é tão elevado que em 2050 prevê-se que 115 milhões de pessoas viverão com demência, comparativamente com os atuais 35 milhões. A memória, o pensamento, a compreensão, o cálculo, a fala e a capacidade de aprendizagem constituem-se como as principais capacidades afetadas pela demência, geralmente acompanhadas de deterioração do controlo emocional, do comportamento social e da motivação.<sup>9,10</sup>

A DA é o principal tipo de demência (60-70% dos casos). Esta patologia atinge, principalmente, indivíduos com mais de 65 anos e caracteriza-se por uma redução acentuada e repentina da capacidade cognitiva, da qual resulta uma significativa incapacidade dos doentes.<sup>10,11</sup>

Atualmente existem quatro fármacos disponíveis na Europa para o tratamento da DA. Três deles são inibidores das ChEs (galantamina, rivastigmina e donepezilo), sendo o quarto, a memantina, um antagonista dos recetores NMDA, apenas indicado para o tratamento da DA nas fases moderada e severa<sup>12-14</sup>.

A administração de inibidores das colinesterases (ChEIs) promove um aumento dos níveis de acetilcolina no cérebro, que resulta numa atenuação dos sintomas cognitivos da AD<sup>11,15</sup>. A utilização destes compostos, apesar de aprovada pelo INFARMED, está associada a efeitos adversos como náuseas, vômitos, perda de apetite e hepatotoxicidade<sup>12,14,16</sup>.

Neste contexto, devido à elevada prevalência da AD e à falta de terapêuticas eficazes a longo termo, existe uma necessidade premente de pesquisa e desenvolvimento de novos ChEIs, mais eficazes e seguros.<sup>17</sup>

Apesar de a AChE ser a enzima responsável pela maior parte da atividade colinesterásica no cérebro, novas investigações sugerem que a BChE deve ser também considerada um alvo terapêutico em patologias como a AD.<sup>15,18</sup>

A TYRO, por sua vez, é uma enzima encontrada numa grande variedade de organismos, responsável pela síntese da melanina.<sup>19,20</sup> Compostos com atividade inibitória da TYRO, tais como o ácido kójico, hidroquinona e o arbutin são atualmente utilizados no tratamento da hiperpigmentação cutânea, bem como aditivos na indústria alimentar de forma a prevenir o escurecimento característico de alguns alimentos.<sup>6,20</sup> Diversos estudos sugerem o possível papel desta enzima na DP, bem como os benefícios terapêuticos que podem advir da sua inibição<sup>21,22</sup>.

Neste trabalho pretende-se avaliar a atividade inibitória dos compostos fenólicos sobre as enzimas AChE, BChE e TYRO, tendo em vista a sua potencial aplicação a nível farmacêutico.

## **1.2 Objetivos**

A elaboração da presente dissertação tem como objetivo geral a identificação de compostos fenólicos com elevada atividade inibitória das ChEs, AChE e BChE, e da TYRO. Pretende-se identificar compostos que possam contribuir para o desenvolvimento de potenciais fármacos com ação terapêutica em patologias onde estas enzimas desempenham um papel fulcral.

Constituem-se como objetivos específicos:

- Caracterizar as enzimas e elucidar, sucintamente, sobre os processos biológicos em que estão envolvidas;
- Identificar patologias em que estas enzimas desempenhem um papel fulcral, e onde se podem constituir alvos terapêuticos;
- Identificar e caracterizar os compostos descritos na literatura como possíveis inibidores destas enzimas;
- Elucidar, sucintamente, sobre a possível utilização destes compostos noutras áreas fora do âmbito da medicina;
- Enaltecer os efeitos terapêuticos de compostos naturais, com particular destaque para os compostos fenólicos, descritos na literatura;
- Classificar e caracterizar os compostos fenólicos;

- Abordar brevemente a utilização dos compostos fenólicos como inibidores destas enzimas e o possível benefício da sua integração na terapêutica das patologias supracitadas;
- Avaliar a atividade inibitória de vinte e três compostos fenólicos previamente estudados pelo grupo de investigação do CCMar, em laboratório;
- Analisar os resultados obtidos e inferir sobre a possível utilização de compostos fenólicos como inibidores das enzimas em estudo.

### **1.3 Organização da Dissertação**

A presente dissertação consiste numa revisão bibliográfica que serve, neste caso, de suporte à realização de um trabalho prático em que se procedeu à determinação da atividade inibitória dos compostos fenólicos sobre a atividade das enzimas em estudo. No entanto, e devido à sua estrutura, facilmente pode ser aplicada a investigações posteriores que visem identificar inibidores das enzimas supracitadas. De forma a simplificar a compreensão e leitura da presente dissertação, optou-se pela apresentação de forma separada da informação referente às ChEs e à TYRO. No que respeita às enzimas, discute-se sucintamente a sua estrutura, funções biológicas, o seu envolvimento em patologias, bem como os benefícios da sua inibição. Posteriormente, procede-se à classificação e caracterização dos compostos fenólicos, com descrição dos efeitos benéficos da sua utilização e apresentação dos compostos identificados na literatura como detentores de atividade inibitória sobre estas enzimas. Após a revisão bibliográfica, procede-se à apresentação do trabalho experimental, onde se descrevem os métodos e materiais utilizados, bem como os resultados obtidos e a discussão dos mesmos. Por último, serão efetuadas algumas considerações finais sobre os resultados obtidos.



## **Capítulo 2**

## 2.1 Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE)

### 2.1.1 Classificação e Caracterização

A AChE e a BChE são enzimas serina-hidrolases pertencentes à classe das ChEs, que catalisam a hidrólise dos ésteres de colina.<sup>15,23</sup>

A AChE (EC 3.1.1.7) é também designada por colinesterase verdadeira, acetilcolina hidrolase ou acetiltiocolinesterase. Esta enzima encontra-se presente no tecido nervoso de todos os animais e junções neuromusculares da maior parte deles.<sup>24,25</sup> No homem, a enzima é codificada pelo gene *ACHE* que se encontra no braço longo do cromossoma 7, posição 22.<sup>26,27</sup> Após ser sintetizada, a AChE é exportada para a superfície da membrana celular onde pode ficar ancorada à membrana plasmática (formas globulares), ancorada à lamina basal (formas assimétricas com cauda de colagénio) ou ser secretada sob a forma de moléculas solúveis (formas globulares).<sup>28</sup>

Apesar da atividade catalítica da enzima ser bem conhecida, a sua estrutura quaternária é altamente complexa e não se encontra totalmente elucidada. A grande variedade de formas da AChE é resultado de processos como o *splicing* alternativo<sup>1</sup> do gene, a oligomerização com subunidades catalíticas e a associação com subunidades não catalíticas.<sup>25</sup>

Até à presente data, foram identificadas e classificadas várias isoformas da enzima resultantes da presença de diferentes subunidades catalíticas: isoforma/subunidade T ou AChE-S (sináptica), isoforma/subunidade H ou AChE-E (eritrocítica); isoforma/subunidade R ou AChE-R, entre outras. As mais relevantes e melhor estudadas são as isoformas/subunidades T e H.<sup>25,26</sup>

Em mamíferos adultos a subunidade H é expressa, principalmente, na superfície de células hematopoiéticas. A função fisiológica da enzima nestas células não se encontra bem estudada, mas alguns investigadores sugerem o seu envolvimento na diferenciação dos megacariócitos.<sup>25,29</sup> A subunidade T, por sua vez, é expressa predominantemente no sistema nervoso colinérgico e no músculo-esquelético, onde desempenha um papel crucial na regulação da transmissão do impulso nervoso.<sup>24,25</sup>

A BChE (EC 3.1.1.8) é uma serina-hidrolase com funções diversas no organismo humano. Esta é sintetizada maioritariamente no fígado e distribuída pela mucosa

---

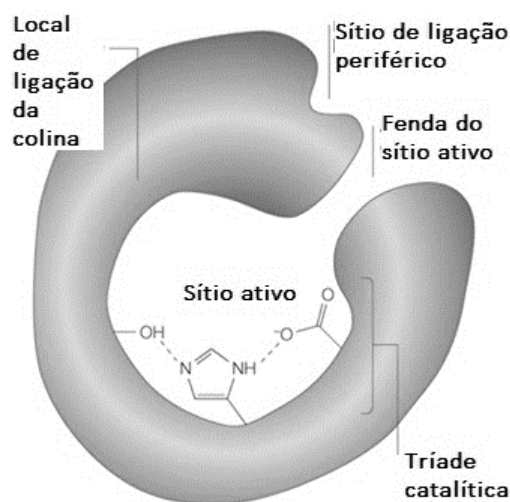
<sup>1</sup> **Splicing alternativo** – processo regulatório que ocorre durante a expressão genética e permite a obtenção de diferentes proteínas a partir de um só gene.<sup>179</sup>

intestinal, plasma sanguíneo e matéria branca do sistema nervoso central (SNC). No SNC é secretada pelas células gliais<sup>II</sup> encontrando-se associada a estas.<sup>15,30</sup>

A análise por cristalografia raio-X destas enzimas demonstrou que a sua atividade catalítica se deve a uma tríade de aminoácidos, serina, histidina e glutamato localizados no fundo de uma fenda de 20 Å, conforme se pode verificar na Fig 2.1.<sup>31</sup>

Apesar de codificadas por genes diferentes, as enzimas possuem 65% de homologia estrutural, diferindo na sua afinidade para os substratos e sensibilidade a inibidores. Esta diversidade entre as enzimas resulta da variação de aminoácidos na sequência que determina o tamanho e forma do sítio ativo.<sup>15,32</sup>

A hidrólise catalisada pelas ChEs é afetada, maioritariamente, por duas regiões: a região esteárica, onde se encontra a tríade catalítica e a região periférica. Nesta última, encontram-se vários aminoácidos aromáticos e um resíduo de aspartato, que são capazes de interagir com substratos catiónicos e conduzi-los até à tríade catalítica.<sup>31,33</sup>



**Figura 2.1** - Representação do sítio ativo da acetilcolinesterase. Adaptado de Soreq *et al.*, 2001.<sup>34</sup>

Ambas as enzimas são capazes de promover a hidrólise da ACh, mas a AChE fá-lo com  $10^{13}$  maior atividade catalítica que a BChE, nas mesmas condições. No córtex temporal de um cérebro humano saudável, a BChE representa cerca de 10% da atividade colinesterásica.<sup>35,36</sup>

---

<sup>II</sup> **Células gliais** – Células não-neuronais que mantêm um ambiente químico adequado para que ocorra a neurotransmissão. Estas estão também envolvidas na formação da mielina e fornecem suporte e proteção aos neurónios, no cérebro e no sistema nervoso periférico.<sup>180</sup>

As diferenças nas propriedades cinéticas e localização cerebral destas enzimas indicam que, num cérebro saudável, a AChE seja a enzima maioritariamente responsável pela hidrólise da ACh enquanto a BChE desempenha um papel funcional de suporte.<sup>15,36</sup>

### **2.1.2 Função Biológica**

De forma a compreender a importância biológica destas enzimas, bem como dos efeitos resultantes da sua inibição, importa conhecer a função e mecanismo de ação da ACh nos diversos órgãos.

A ACh foi o primeiro neurotransmissor descoberto. Esta desempenha funções tanto no Sistema Nervoso Periférico (SNP) como no SNC, mediando a transmissão de informação neurónio – célula efetora ou neurónio – neurónio.<sup>37</sup>

O SNP engloba o Sistema Nervoso Autónomo (SNA) e o Sistema Nervoso Somático (SNS). O primeiro é detentor de uma atividade intrínseca, ou seja, não está sob controlo consciente e regula principalmente funções viscerais como a circulação sanguínea e a digestão. Por sua vez, o SNS depende de controlo consciente e regula funções como o movimento, a respiração e a postura.<sup>37</sup>

No SNC, a ACh desempenha um papel crucial no que respeita às funções cognitivas, principalmente, funções como a aprendizagem e a memória. Recentemente, este neurotransmissor tem sido também relacionado com a atenção, orientação e com a deteção de estímulos.<sup>38</sup>

A ACh nas junções neuromusculares é responsável pela contração muscular. O processo de contração inicia-se com a transmissão do impulso nervoso aos neurónios motores que libertam ACh. Após ser libertada, a ACh difunde ao longo da sinapse ligando-se aos recetores nicotínicos da membrana plasmática das fibras musculares. Desta ligação resultam sucessivas despolarizações que culminam em contração muscular.<sup>39</sup>

No SNA, a ACh libertada pelas fibras colinérgicas promove efeitos em praticamente todos os órgãos inervados pelo SNA. Estes efeitos encontram-se discriminados no quadro 2.1.<sup>37</sup>

**Quadro 2.1** Efeito da acetilcolina nos diferentes órgãos/sistemas. Adaptado de Katzung *et al.*, 2012.<sup>37</sup>

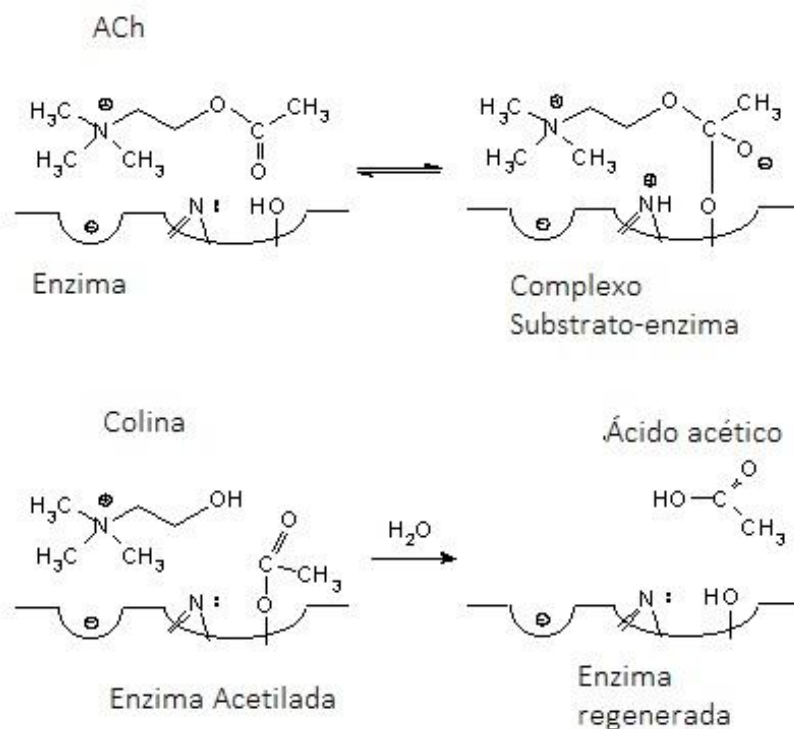
Órgãos/ Sistemas	Acetilcolina (ACh)
<b>Olhos</b>	Contração do esfíncter muscular Contração do músculo ciliar (visão ao perto) Aumento da secreção pelas glândulas lacrimais
<b>Coração</b>	Diminuição do ritmo cardíaco Diminuição da contractilidade
<b>Pulmões</b>	Contração dos músculos da traqueia e dos brônquios Aumento da secreção pelas glândulas brônquicas
<b>Sistema gastrointestinal</b>	Aumento do tónus e da motilidade Relaxamento dos esfíncteres Aumento da secreção pelas glândulas digestivas
<b>Sistema urinário</b>	Contração dos músculos da parede da bexiga Relaxamento do esfíncter muscular
<b>Pele</b>	Aumento da secreção pelas glândulas sudoríparas

Devido aos seus diversos efeitos, a regulação da atividade deste neurotransmissor tem sido alvo de desenvolvimento de fármacos utilizados na terapêutica de patologias como a DA. Neste sentido, cinco processos podem ser alvo de terapêutica farmacológica: a síntese, o armazenamento, a libertação, a terminação da ação no recetor e o seu efeito no recetor.<sup>37</sup>

A utilização de ChEIs tem como objetivo regular o processo de terminação da ação da ACh juntos dos seus recetores.<sup>15,40</sup> Na transmissão colinérgica, um impulso nervoso é transmitido quando um potencial de ação chega à região terminal de um nervo e promove a fusão da vesícula que armazena a ACh com a membrana plasmática do nervo, que culmina na libertação de ACh na fenda sináptica. Após secretadas pelo nervo pré-sináptico, as moléculas de ACh ativam os recetores de ACh no neurónio seguinte ou célula alvo pós-sináptica.<sup>15,37</sup>

No término do sinal, as moléculas de ACh são hidrolisadas pela AChE e/ou BChE em colina e ácido acético.<sup>35,37</sup> O mecanismo de hidrólise da ACh encontra-se representado na Fig. 2.2. Este inicia-se por um ataque do grupo nucleófilo Ser-CH<sub>2</sub>-OH ao carbonilo do grupo éster da acetilcolina, como resultado forma-se um intermediário tetraédrico que

colapsa. Desta forma, a enzima é acetilada e ocorre libertação de colina. Por fim, uma molécula de água medeia a hidrólise que regenera a enzima e liberta ácido acético.<sup>41</sup>



**Figura 2.2** - Mecanismo da hidrólise da acetilcolina mediado pela acetilcolinesterase. Adaptado de Hexum, 2006.<sup>42</sup> ACh – acetilcolina.

As ChEs encontram-se presentes em todas as junções colinérgicas, normalmente, ligadas à membrana basal de células na fenda sináptica.<sup>40</sup> Estas enzimas são responsáveis pela terminação efetiva da transmissão sináptica, através de uma rápida hidrólise do neurotransmissor ACh.<sup>43</sup> Caso a ACh não fosse hidrolisada o nervo pós-sináptico permaneceria eletricamente carregado e novos impulsos não seriam transmitidos.<sup>34</sup> A inibição destas enzimas pelos ChEIs diminui a hidrólise da ACh, resultando num aumento da sua concentração e duração de ação na fenda sináptica.<sup>15</sup>

## 2.1.3 Inibidores da Atividade Enzimática

### 2.1.3.1 Contexto Histórico

A Fisostigmina foi o primeiro ChEI a ser utilizado com fins terapêuticos. Esta era utilizada no tratamento do glaucoma<sup>III</sup> em 1876 apesar de ser desconhecido o seu mecanismo de ação.<sup>7</sup> Mais tarde, em 1890, este alcaloide natural isolado da espécie *Physostigma venenosum*, foi utilizado pioneiramente no tratamento da DA. No entanto, teve resultados contraditórios nos ensaios clínicos devido aos efeitos secundários periféricos e pelo seu curto tempo de meia-vida. Devido a estas limitações este composto deixou de ser utilizado clinicamente.<sup>13</sup>

Posteriormente, os ChEIs começaram a ser utilizados como pesticidas e a investigação focou-se na descoberta de agentes mais potentes, seletivos e seguros.<sup>7</sup> Com o início da primeira guerra mundial, a seletividade destes compostos foi manipulada de forma incorreta, desenvolvendo-se o sarin, que consiste num gás neurotóxico utilizado como arma química. Por esta altura, a investigação direcionava-se exclusivamente para o desenvolvimento de gases neurotóxicos e seus antídotos, surgindo novos gases organofosforados bem como os seus antídotos, as oximas.<sup>44</sup>

O período pós-guerra caracterizou-se por um cenário de população jovem e de escassez de alimentos. Neste contexto, o financiamento foi direcionado para o desenvolvimento agrícola e para a sua proteção, investindo novamente no desenvolvimento de ChEIs como pesticidas. Foi também neste período que se desenvolveram os primeiros fármacos biológicos e alguns sintéticos, que aliados a uma melhoria das condições sanitárias promoveram um aumento da esperança média de vida.<sup>7,13</sup>

Com o envelhecimento tendencial da população, tem aumentado a prevalência de doenças crónicas. Neste contexto, o financiamento dirigiu-se para o desenvolvimento de ChEIs como terapêutica de patologias neurodegenerativas como a DA.<sup>7,8,11</sup> Deste crescente interesse na terapêutica da DA, foi isolado da espécie *Galanthus woronowii* Losinsk., em 1950, a galantamina, um inibidor não competitivo da AChE que expressa uma afinidade reduzida para a BChE.<sup>7,45</sup>

Numerosos análogos da fisostigmina têm sido sintetizados, sendo o mais eficaz a rivastigmina, um derivado carbamato que inibe reversivelmente a AChE e a BChE. Atualmente, este fármaco é utilizado no tratamento da demência suave a moderada na DA e na demência ligeira a moderada em doentes com DP idiopática.<sup>17,46</sup>

---

<sup>III</sup> **Glaucoma** – neuropatia ótica associada a danos estruturais no nervo ótico e a disfunção visual provocada por vários processos patológicos.<sup>47</sup>

Entre os fármacos descobertos, alguns foram retirados do mercado devido a efeitos adversos exacerbados como diarreia, náuseas e hepatotoxicidade. Entre estes, encontram-se a tacrina e o metrifonato.<sup>15</sup> Nos últimos anos, muitos esforços têm sido efetuados com o objetivo de sintetizar compostos mais eficazes do ponto de vista terapêutico e com melhor perfil de segurança. A maioria das investigações utiliza como ponto de partida a fisostigmina e outros compostos naturais similares, no entanto, apesar dos esforços evidenciados poucos foram os fármacos que atingiram estádios avançados de ensaios clínicos.<sup>13,17</sup>

### 2.1.3.2 Propriedades Farmacológicas

As principais diferenças entre os ChEIs são químicas e farmacocinéticas, sendo a sua farmacodinâmica semelhante. Ao nível da sua química e farmacocinética, os parâmetros que os distinguem são a estrutura, a absorção e metabolismo.<sup>37</sup>

Estruturalmente, estes compostos podem ser divididos em três classes: [i] álcoois simples com um grupo amónia quaternário; [ii] ésteres carbâmicos de álcoois com um grupo amónia terciário ou quaternário (carbamatos); e [iii] derivados orgânicos do ácido fosfórico (organofosforados). No quadro 2.2, encontram-se exemplificados ChEIs destas classes e a respetiva indicação da existência ou não de Autorização de Introdução no Mercado (AIM)<sup>IV</sup> em Portugal.<sup>13,14,37</sup>

**Quadro 2.2** Classes de inibidores das colinesterases e exemplos de compostos com e sem autorização de introdução no mercado em Portugal. Adaptado de Ali *et al.*, 2012; Infarmed, 2014; Katzung *et al.*, 2012.<sup>13,14,37</sup> [i] Álcoois simples com um grupo amónia quaternário, [ii] carbamatos, [iii] organofosforados, **AIM** – Autorização de introdução no mercado.

Classe	[i]	[ii]	[iii]
<b>Com AIM</b>		Neostigmina	
		Piridostigmina	
		Rivastigmina	
		Galantamina	
		Donepezilo	

<sup>IV</sup> **AIM** – Para que um medicamento seja colocado no mercado, é necessária uma Autorização de Introdução no Mercado (AIM), concedida pelo INFARMED, I.P.<sup>181</sup>



			Soman
			Paraoxão
<b>Sem AIM</b>	Edrofónio	Fisostigmina	Malaoxão
			Paratião
			Malatião

O edrofónio, neostigmina e a piridostigmina são compostos de amónia quaternária sintéticos atualmente utilizados em medicina. O soman é um potente gás neurotóxico, o paratião e o malatião são pró-fármacos tiofosfatos (inativos) que são convertidos aos derivados fosfatos (ativos) em animais e plantas, sendo por isso utilizados como pesticidas.<sup>7</sup>

Todos os ChEIs aumentam a concentração de ACh nos recetores colinérgicos por inibirem a ação das colinesterases, no entanto, os detalhes moleculares da interação destes compostos com as enzimas variam de acordo com os grupos descritos.<sup>33,37</sup> O primeiro grupo, constituído pelos álcoois simples com um grupo amónia quaternário, interage com o sítio ativo das enzimas por ligações electrostáticas reversíveis impedindo a ligação da ACh. O complexo enzima-inibidor não envolve uma ligação covalente e portanto a duração da ação é curta, cerca de 2 a 10 minutos.<sup>37,40</sup>

A interação entre as enzimas e o segundo grupo, ésteres carbâmicos de álcoois com um grupo amónia terciário ou quaternário (carbamatos), envolve uma hidrólise sequencial, com duas etapas, semelhante à que ocorre com a ACh. Neste caso, o intermediário que se forma é mais resistente ao processo de hidratação que o intermediário acetilado, atrasando a regeneração da enzima livre em 30 minutos a 6 horas. Durante este período a enzima não consegue hidrolisar a ACh.<sup>37,40</sup>

No caso particular dos organofosforados, estes sofrem uma hidrólise que resulta em fosforilação do sítio ativo da enzima. A ligação covalente fósforo-enzima é extremamente estável e sofre hidratação a um ritmo muito lento, como consequência o efeito é muito prolongado.<sup>13,40</sup>

Diversos autores classificam os grupos supracitados com base na duração da ação provocada, em inibidores “irreversíveis” ou reversíveis das ChEs como os organofosfatos ou o Edrofónio e os carbamatos, respetivamente.<sup>7</sup>

### 2.1.3.3 Efeitos no Organismo

Os efeitos farmacológicos mais proeminentes dos ChEIs ocorrem a nível do sistema cardiovascular e gastrointestinal, dos olhos, da junção neuromuscular e da estimulação dos recetores colinérgicos no SNC. Como a ação destes fármacos passa por amplificar os efeitos da ACh, os efeitos observados são muito semelhantes aos da administração de agonistas colinómiméticos.<sup>40</sup> No quadro 2.3 que se segue, apresentam-se os efeitos desta classe de compostos nos diferentes órgãos.<sup>37,40</sup>

**Quadro 2.3** Efeitos farmacológicos dos inibidores das colinesterases. Adaptado de Katzung *et al.*, 2012; Nair, 2004<sup>37,40</sup> SNC - Sistema Nervoso Central.

Efeitos Farmacológicos dos Inibidores das Colinesterases	
<b>SNC</b>	Em doses baixas promovem um aumento da atividade neurológica Em doses elevadas provocam convulsões generalizadas que podem ser precedidas de coma e paragem respiratória
<b>Junção Neuromuscular</b>	Em doses baixas (terapêuticas) aumenta a força da contração muscular. Em doses elevadas podem provocar fibrilação das fibras musculares, fasciculações e bloqueio neuromuscular
<b>Sistema Cardiovascular</b>	Diminuição do ritmo cardíaco e força de contração Diminuição do débito cardíaco Aumento da resistência vascular periférica com aumento da pressão arterial
<b>Sistema respiratório</b>	Contração do músculo liso brônquico podendo provocar broncospasmo e hipóxia, com possível paragem respiratória Estimulação das glândulas brônquicas
<b>Sistema Urinário</b>	Aumento da atividade motora da bexiga e relaxamento do esfíncter Risco de incontinência
<b>Sistema Gastrointestinal</b>	Em doses baixas: Aumento da motilidade esofágica e gástrica, aumento da produção de secreções e relaxamento dos esfíncteres Em doses elevadas: vômitos e diarreia
<b>Olho (Por aplicação local)</b>	Constrição do esfíncter pupilar e dos músculos ciliares que culmina em contração da pupila e bloqueio do reflexo de acomodação. Se a pressão intraocular (PIO) estiver elevada, geralmente esta baixa por ocorrer um maior extravasamento do humor aquoso

<b>Glândulas secretoras</b>	Aumento da atividade de todas as glândulas secretoras inervadas por fibras pós ganglionares colinérgicas: brônquicas, salivares, sudoríparas, lacrimais, gástricas, intestinais e pancreáticas
-----------------------------	--

#### 2.1.3.4 Utilizações Clínicas

Os ChEIs são utilizados no tratamento de patologias ou distúrbios do olho (ex. glaucoma), do trato gastrointestinal e urinário, das junções neuromusculares (ex. Miastenia gravis e outros tipos paralisias neuromusculares), bem como no tratamento da DA e de outras doenças neurodegenerativas.<sup>37</sup>

O glaucoma é uma patologia caracterizada pelo aumento da pressão intraocular. Os ChEIs diminuem esta pressão por provocarem constrição do corpo ciliar facilitando o extravasamento do humor aquoso. Atualmente, os ChEIs têm vindo a substituídos por bloqueadores  $\beta$  e derivados de prostaglandinas, aplicados topicamente.<sup>37,47</sup>

Ao nível do trato urinário e do trato gastrointestinal, os ChEIs podem ser utilizados em situações de carácter não obstrutivo que envolvam depressão da atividade do músculo liso, como o íleo pós-operatório<sup>V</sup> e o megacólon congénito<sup>VI</sup>. Estes fármacos constituem, também, uma alternativa terapêutica no tratamento do refluxo esofágico por aumentarem o tónus do esfíncter esofágico.<sup>37</sup> Dos ChEIs, a Neostigmina é a mais utilizada nestas situações podendo ser administrada por via subcutânea (SC), intramuscular (IM) ou intravenosa (IV)<sup>14</sup>. A administração de ChEIs na presença de obstrução mecânica origina um agravamento dos sintomas com possível perfuração do intestino como resultado do aumento da pressão, pelo que é contraindicada a utilização desta classe de fármacos em patologias de carácter obstrutivo.<sup>37,40</sup>

A Miastenia gravis é uma doença autoimune que afeta as junções neuromusculares do músculo-esquelético, caracterizada por períodos alternados de exacerbação e de remissão dos sintomas. Nesta patologia, o organismo produz anticorpos contra a principal região imunogénica das subunidades  $\alpha 1$  dos recetores nicotínicos. Estes anticorpos diminuem a função dos recetores e são detetados em cerca de 85% dos doentes que sofrem desta patologia.<sup>48</sup>

A sintomatologia mais frequente inclui ptose (queda da pálpebra superior), diplopia (visão dupla), afonia, disfagia, e fadiga extrema. Nos casos mais severos a

<sup>V</sup> **Íleo pós - operatório** - atonia ou paralisia do estômago ou bexiga após uma intervenção cirúrgica.<sup>37</sup>

<sup>VI</sup> **Megacólon** - dilatação anormal do intestino grosso.<sup>37</sup>

Miastenia gravis pode afetar todos os músculos, incluindo os implicados nos processos da respiração.<sup>48</sup> Os ChEIs utilizados no tratamento de longa duração desta patologia são: a Piridostigmina e a Neostigmina.<sup>40,49</sup> Os ChEIs são também utilizados no diagnóstico desta patologia, utilizando-se para este fim o Edrofónio, devido ao seu rápido início de ação. Considera-se que o indivíduo sofre de Miastenia gravis se se observar uma melhoria significativa da força muscular, após administração de Edrofónio, que dure aproximadamente cinco minutos.<sup>37,40</sup>

Os ChEIs apresentam, como foi referido, diversas indicações terapêuticas, no entanto nenhuma foi tão explorada como a sua utilização na terapêutica de patologias neurodegenerativas, principalmente na terapêutica da DA. Novos estudos têm sugerido um efeito benéfico da utilização destes compostos noutras doenças neurodegenerativas como a DP e demência por corpos de Lewy<sup>VII</sup> (DCL).<sup>50,51</sup>

#### **2.1.3.4.1 Doença de Alzheimer (DA)**

A DA é o principal tipo de demência, representando 60 a 70% dos casos. Esta patologia caracteriza-se por uma perda progressiva das capacidades cognitivas e memória que podem culminar num estado vegetativo completo.<sup>37,52</sup> A DA atinge principalmente indivíduos com mais de 65 anos e caracteriza-se por uma redução acentuada e repentina da capacidade cognitiva, da qual resulta uma significativa incapacidade dos doentes.<sup>11</sup>

Segundo o relatório elaborado em 2013 pela associação *Alzheimer's Disease International*, a prevalência desta e de outros tipos de demência têm vindo a aumentar.<sup>8</sup> Também o número de mortes relacionadas com a DA tem aumentado nos últimos anos, sendo que atualmente esta patologia constitui a sexta principal causa de morte, por doença, nos Estados Unidos da América.<sup>53</sup> Em Portugal, estima-se que 153 000 pessoas vivam, atualmente, com esta demência.<sup>54</sup>

A etiologia da DA é complexa, estando envolvidos tanto fatores genéticos como fatores ambientais.<sup>17</sup> A nível fisiopatológico caracteriza-se por um aumento dos depósitos do péptido  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) e emaranhados neurofibrilares de proteína Tau<sup>VIII</sup> no córtex cerebral, que conduzem à formação de placas extracelulares e lesões vasculares. Ocorre

---

<sup>VII</sup> **Demência por corpos de Lewy** – Demência caracterizada por flutuação cognitiva, alucinações visuais e parkinsonismo espontâneo.<sup>182</sup>

<sup>VIII</sup> **Proteína Tau** – Proteína presente no sistema nervoso central que tem como função estabilizar os microtúbulos. Uma deficiência na proteína Tau resulta na destabilização dos microtúbulos e consequente formação de emaranhados neurofibrilares neurotóxicos.<sup>61</sup>

uma perda progressiva de neurónios, especialmente dos neurónios colinérgicos com afinamento do córtex cerebral.<sup>37</sup>

Baseadas nesses marcadores neuropatológicos, duas hipóteses principais foram propostas, com a finalidade de identificar a sua etiologia. De acordo com a hipótese da cascata amilóide, a neurodegeneração na DA inicia-se com a clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide e resulta da produção, agregação e deposição do péptido A $\beta$ . De acordo com a hipótese colinérgica, a disfunção do sistema colinérgico é suficiente para produzir o défice de função cognitiva apresentado pelos doentes com DA.<sup>55</sup>

Recentemente, fatores como o excesso de metais e o *stress* oxidativo têm sido, também eles, relacionados com a destruição dos neurónios colinérgicos e consequente degradação da transmissão colinérgica.<sup>56,57</sup>

Tem sido proposto que a transmissão colinérgica no SNC está envolvida no processamento cognitivo da memória, na atenção/concentração e na capacidade de detetar e selecionar estímulos relevantes.<sup>15,58</sup> O défice de transmissão colinérgica induz no doente estados de inquietação, ansiedade, confusão e em alguns casos alucinações.<sup>55</sup> Sendo a DA uma doença multifatorial em que ocorre a degeneração de múltiplas vias de neurotransmissores torna-se difícil identificar de forma isolada a sintomatologia do défice de transmissão colinérgica.<sup>55</sup>

Diversas abordagens terapêuticas têm sido exploradas na DA, no entanto, apenas existem quatro fármacos aprovados para o tratamento da patologia nos Estados Unidos da América e na Europa. Estes constituem, apenas, tratamentos sintomáticos que não evitam ou revertem a progressão da doença. Três desses fármacos são ChEIs (galantamina, donepezilo e rivastigmina), enquanto o quarto fármaco, a memantina, modula por sua vez, os recetores N-metilo-D-ácido aspártico (NMDA).<sup>10</sup>

A inibição da AChE e da BChE, pelos ChEIs, aumenta a concentração de ACh na fenda sináptica permitindo uma maior interação desta com o recetor. De forma direta, estes fármacos reduzem os sintomas supracitados, associados à deficiente neurotransmissão colinérgica.<sup>15</sup>

O benefício clínico dos ChEs é modesto. Este fator aliado à ocorrência de efeitos adversos consideráveis e à ausência de mecanismos modificadores da patogénese da DA tem direcionado a investigação no sentido da descoberta de novas abordagens terapêuticas.<sup>10,16,59</sup>

As recentes abordagens descritas na literatura ao desenvolvimento de novos fármacos incidem na utilização de anticorpos, inibidores da secretase<sup>IX</sup>, moduladores do cobre e do zinco, inibidores da agregação da proteína Tau e em produtos naturais e vitaminas.<sup>10</sup> Apesar dos esforços evidenciados, a maior parte dos compostos estudados não chegam a ser comercializados por não demonstrarem superioridade terapêutica face às alternativas existentes.<sup>60</sup>

Atualmente, tem sido também estudado o possível papel dos ChEIs não só no tratamento da sintomatologia, mas também na patogénese da DA. Neste contexto, foi demonstrado que os ChEIs interferem com a produção do péptido A $\beta$ , reduzindo a sua toxicidade e, conseqüente, a progressão da doença.<sup>58</sup>

A evidência de que os ChEIs interferem com a patogénese da DA e o facto de os ChEIs continuarem a ser a terapêutica de eleição numa patologia tão prevalente e debilitante como a DA, suportam a investigação que vem sendo realizada nesta área. Os compostos naturais, como os compostos fenólicos, têm merecido um papel de destaque nesta vertente pelo facto da maior parte dos ChEIs existentes ser de origem natural (ex. galantamina) ou sintetizados com base em compostos naturais (ex. rivastigmina).<sup>17</sup>

#### **2.1.3.4.2 Outras Doenças Neurodegenerativas**

A utilização de ChEIs noutras doenças neurodegenerativas está relacionada com o aumento dos níveis de ACh, no sistema nervoso, promovido por estes compostos.<sup>50,61</sup>

A DP, outrora considerada uma desordem motora, é atualmente reconhecida como uma patologia que envolve uma série de sintomas não-motores como défice cognitivo, depressão, psicose e disfunção do SNA. Tendo presente a influência da neurotransmissão colinérgica nos sintomas cognitivos, foi testada a utilização de ChEIs nestes doentes, e hoje em dia, a rivastigmina encontra-se aprovada para o tratamento de demência ligeira a moderadamente grave em doentes com DP idiopática.<sup>46,51</sup>

Um estudo desenvolvido por Cardoso & Teixeira em 2005 indica que os ChEIs são seguros e eficazes no tratamento dos sintomas cognitivos e psiquiátricos, como alucinações, delírios, apatia e ansiedade, em doentes com DCL.<sup>50</sup>

---

<sup>IX</sup> Secretase - Enzima envolvida na formação dos depósitos do péptido  $\beta$  amilóide.

Os ChEIs têm ainda sido utilizados *off-label*<sup>X</sup> no tratamento dos sintomas cognitivos e comportamentais em taupatias<sup>XI</sup>, um conjunto bastante heterogéneo de desordens neuropsiquiátricas que frequentemente são diagnosticadas como Síndrome de Parkinson Atípico.<sup>61</sup> A crescente utilização destes fármacos noutras patologias que não a DA revela-se também um estímulo importante para a investigação nesta área.

---

<sup>X</sup> **Off-label** – Utilização de um medicamento para uma indicação/doença/doente diferente das indicações aprovadas ou em populações não estudadas (ex. pediátricas) ou, ainda, utilizando vias de administração e dosagens não aprovadas.<sup>183</sup>

<sup>XI</sup> **Taupatias** – Classe de doenças neurodegenerativas caracterizadas pela agregação patológica da proteína Tau.<sup>61</sup>

## **Capítulo 3**



### 3.1. Tirosinase (TYRO)

A TYRO (EC.1.14.18.1) também denominada de fenolase, difenol oxidase, catecolase, *orto*-difenol oxidase, monofenol oxidase, cresolase entre outros, foi descoberta em cogumelos por Schoenbein em 1856.<sup>62</sup> Esta é uma proteína de cobre do tipo III, encontrada numa grande variedade de organismos, bactérias, fungos, plantas, insetos, crustáceos e mamíferos, estando envolvida na síntese da melanina.<sup>19</sup>

De acordo com as reações que catalisam, as enzimas pertencentes à família das tirosinases classificam-se em tirosinases (cresolases ou monofenolase/monofenol oxidase) ou em catecolases (catecol oxidases ou difenolase/difenol oxidase). As primeiras catalisam a *o*-hidroxilação de monofenóis e a oxidação dos *o*-difenóis resultantes, enquanto as segundas apenas realizam o segundo passo, a oxidação de *o*-difenóis.<sup>62,63</sup>

A nomenclatura da TYRO torna-se bastante complexa devido ao facto desta enzima poder atuar das duas formas, dependendo da estrutura do substrato.

#### 3.1.1. Análise Estrutural e Localização Celular

A TYRO humana é codificada pelo gene tirosinase, TYR, localizado no braço longo do cromossoma 11 na posição 14.3. É constituída por uma sequência de 529 aminoácidos que sofre posteriormente um processo de maturação.<sup>64</sup> Esta enzima pertence à família das tirosinases, tal como as catecol oxidases e as hemocianinas.<sup>63</sup> As proteínas desta família têm em comum um sítio ativo altamente conservado constituído por dois iões de cobre, cada um coordenado com três histidinas.<sup>65</sup> Apesar do sítio ativo altamente conservado e partilhado pelos diferentes membros da família, tem sido proposto que não existe uma TYRO comum, sendo que as tirosinases isoladas de animais, plantas e fungos diferem no tamanho, nas sequências de aminoácidos, no grau de glicosilação, na ativação e na localização celular.<sup>63,65</sup>

A enzima no organismo humano encontra-se localizada na membrana dos melanócitos presentes na pele, olhos e folículos capilares. Ao nível intracelular a TYRO localiza-se maioritariamente na membrana dos melanosomas<sup>XII</sup>. No entanto, já foi também isolada das frações solúveis do retículo endoplasmático, dos ribossomas e do aparelho de Golgi.<sup>66</sup>

---

<sup>XII</sup> Melanosomas – corpúsculos intracelulares onde ocorre a síntese de melanina.<sup>69</sup>

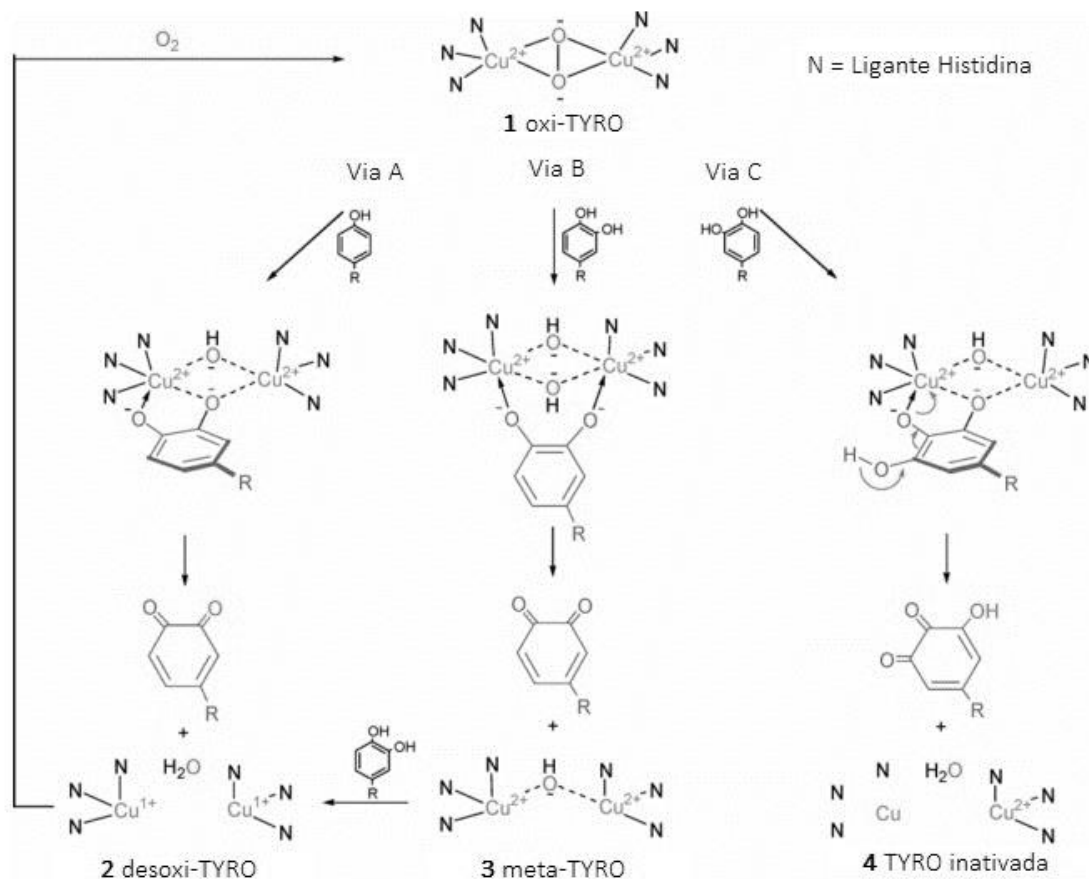
Esta é uma enzima multifuncional envolvida nos primeiros dois passos na melanogénese dos mamíferos e na oxidação enzimática que se verifica nos frutos e outros alimentos.<sup>6</sup>

### 3.1.2. Mecanismo de Catálise

A TYRO catalisa tanto a reação de hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois como a sua posterior oxidação a *o*-quinonas, utilizando neste processo oxigénio molecular.<sup>62</sup>

Durante o processo de catálise, ao centro ativo da TYRO liga-se oxigénio molecular formando-se oxi-TYRO (Composto 1, Fig. 2.1).<sup>67</sup> Posteriormente, a oxi-TYRO catalisa a formação de *o*-quinonas por dois mecanismos (Fig. 3.1): pela oxidação de catecóis (atividade de difenolase) ou pela *o*-hidroxilação de fenóis (atividade de monofenolase) com posterior oxidação dos *o*-difenois resultantes. Fenóis como a tirosina são primeiro hidroxilados a *o*-difenois que são posteriormente oxidados a *o*-quinonas com a formação de desoxi-tirosinase (Composto 2, Fig. 3.1), que se liga a oxigénio molecular para formar novamente oxi-TYRO (via A, Fig. 3.1). Por sua vez, a oxidação de catecóis (via B, Fig. 3.1) conduz à formação de *o*-quinonas e meta-TYRO (Composto 3, Fig. 2.1). A redução da m-TYRO por uma segunda molécula de catecol dá origem a desoxi-TYRO, que por ligação a oxigénio molecular produz oxi-TYRO completando o ciclo.<sup>19,68</sup>

Recentemente propôs-se que, para além dos catecóis servirem de substratos de oxidação para a oxi-TYRO, estes podem também servir de substratos para a monoxigenação (via B, Fig. 3.1). Neste caso o substituinte hidróxilo do substrato pode desprotonar resultando numa eliminação redutiva do cobre, com formação irreversível de TYRO inativa (composto 4, Fig. 3.1).<sup>68</sup>

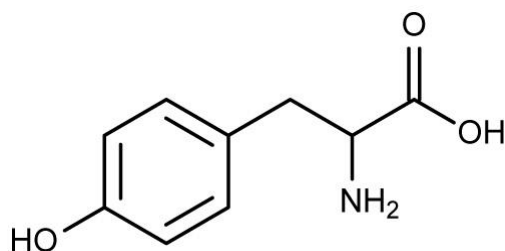


**Figura 3.1-** Ciclo reativo catalisado pela tirosinase. Adaptado de Ramsden *et al.*, 2009<sup>68</sup>

### 3.1.3. Papel da Tirosinase na Produção das Melaninas

As melaninas constituem um grupo bastante heterogêneo de polímeros. Estas derivam da oxidação de fenóis e da posterior polimerização destes últimos, bem como das quinonas resultantes do processo de oxidação. As melaninas estão presentes em diferentes composições, cores, tamanhos e funções em todos os seres vivos. Desta forma, as melaninas podem ser classificadas, de acordo com a sua origem, em: melanina dos animais, melanina das plantas, melanina dos fungos, melanina das bactérias e melanina sintética. As unidades fenólicas dos polímeros, bem como as propriedades das enzimas oxidases necessárias para a produção do polímero são bastante diferentes.<sup>69,70</sup>

Existem dois tipos de melanina animal, a eumelanina e a feomelanina, ambas produzidas a partir da L-Tirosina (Fig. 3.2) pela ação da TYRO. A eumelanina confere cores escuras, do castanho ao preto. Pequenas quantidades desta melanina concedem a cor cinzenta característica dos cabelos dos idosos. A feomelanina, por sua vez, é responsável pela coloração de amarelo a vermelho.<sup>71,72</sup>



**Figura 3.2** - Estrutura química da L-Tirosina.<sup>73</sup>

Destas melaninas, a eumelanina é a mais abundante em humanos, principalmente em indivíduos de tez escura. Para além da pele e dos pêlos, estas melaninas também fazem parte dos tecidos da íris e da estria vascular do ouvido interno.<sup>69</sup> A concentração e distribuição destes dois pigmentos determinam a cor dos pêlos, olhos e pele.<sup>74</sup>

A neuromelanina é um pigmento de coloração escura que pode ser encontrado em certas regiões do cérebro e da glândula adrenal de alguns mamíferos. Presume-se que este pigmento desempenhe um papel chave na regulação da apoptose<sup>XIII</sup>, na neurodegeneração e na DP.<sup>72</sup>

Nas plantas, os precursores mais comuns da melanina são catecóis. Na biossíntese deste tipo de melanina estão envolvidas as catecol oxidases e a TYRO, as oxidases de fenóis mais frequentes no reino das plantas.<sup>20,69</sup> A melanina presente nas plantas é denominada de alomelanina e a sua cor altera de acordo com a natureza do substrato. Esta melanina é o pigmento responsável pelo escurecimento não-enzimático que ocorre nos frutos e plantas após a sua colheita.<sup>6</sup>

A melanina, pela sua localização e função nos seres vivos, desempenha uma enorme diversidade de funções. No entanto, a mais relevante prende-se com a proteção conferida às células contra “danos exteriores” de natureza diversa.<sup>69</sup> Neste contexto, a melanina tem um elevado interesse biomédico devido às suas propriedades fotoprotetoras. A eumelanina, em particular, apresenta um amplo espectro de absorção-UV sendo capaz de dissipar 90% da energia proveniente da radiação solar sob a forma de calor. Desta forma, a melanina protege as células dos efeitos nefastos da exposição solar.<sup>75</sup>

A exposição da epiderme à radiação solar conduz a uma acrescida produção de melanina que promove um aumento da fotoproteção acompanhado do efeito bronzeado

---

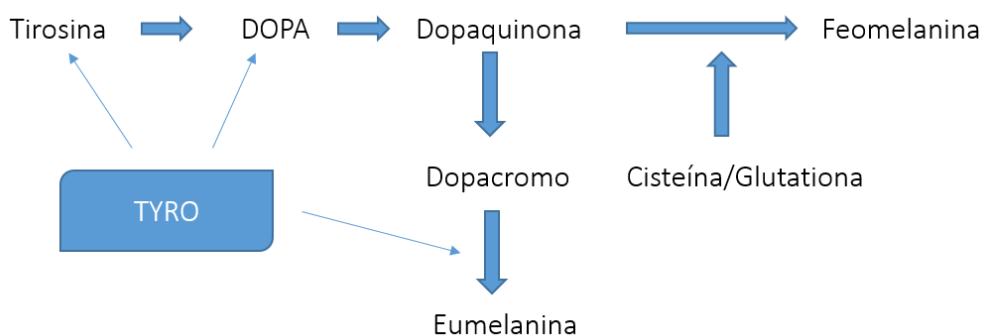
<sup>XIII</sup> **Apoptose** – É um processo de morte celular programada.

(escurecimento da pele).<sup>75</sup> Para além do papel fotoprotetor, as melaninas atuam como sequestradores de ROS e quelantes de iões, protegendo as células do *stress* oxidativo e da acumulação de iões metálicos citotóxicos.<sup>69</sup> Alterações na produção de melanina conduzem a desordens denominadas de híper ou hipopigmentação.<sup>66,69</sup> Devido ao seu envolvimento na síntese da melanina, a inibição da atividade da TYRO tem sido um dos principais alvos na terapêutica ou profilaxia de condições de hiperpigmentação como as manchas resultantes da idade.<sup>70</sup>

A TYRO é uma enzima chave no que diz respeito à biossíntese das melaninas superficiais (eumelanina e feomelanina), nos animais.<sup>66</sup> Diversos estudos indicam que a TYRO poderá também estar envolvida na síntese de neuromelanina, uma melanina associada a neurónios vulneráveis e mais suscetíveis ao desenvolvimento de patologias neurológicas.<sup>22,72</sup>

Após ser sintetizada, a TYRO sofre um primeiro processo de maturação no retículo endoplasmático e um segundo no complexo de Golgi. Posteriormente, é transportada para organelos específicos, os melanossomas, onde a melanina é sintetizada e armazenada. Na pele e nos pêlos, os melanossomas são transferidos para células vizinhas, os queratinócitos, pelas quais se distribuem conferindo-lhes cor.<sup>70</sup>

A biossíntese da melanina, representada na Fig. 3.3, ocorre no interior dos melanossomas. A TYRO catalisa as primeiras reações, nomeadamente, a oxidação de L-tirosina a dihidroxifenilamina (L-DOPA) e desta última a dopaquinona.<sup>70</sup> A partir da dopaquinona formam-se a feomelanina ou eumelanina de acordo com a presença ou ausência de cisteína e/ou glutatona, respetivamente.<sup>76,77</sup>



**Figura 3.3** - Via biossintética de formação da melanina, com destaque para os passos catalisados pela tirosinase. Adaptado de Kobayashi *et al.*, 1995<sup>76</sup> TYRO – Tirosinase.

Por catalisar a etapa limitante desta via biossintética, a TYRO tem sido o alvo do desenvolvimento de abordagens terapêuticas e profiláticas com o objetivo de tratar ou prevenir problemas associados a desordens na pigmentação da pele.<sup>70,78</sup>

### 3.1.4. Inibidores da TYRO

Diversos inibidores da TYRO encontram-se descritos na literatura. No entanto, os mais utilizados em formulações farmacêuticas ou em produtos de cosmética e de higiene corporal (PCHC) são o ácido kójico, a hidroquinona, o arbutin, aloesina e o 4-n-butil-resorcinol.<sup>6,71</sup>

A hidroquinona (A, Fig. 3.4.) é um composto fenólico inibidor da TYRO bastante conhecido e muito utilizado na prática clínica. O efeito despigmentante deste composto deve-se, não só, à forte inibição da TYRO, mas também a alterações provocadas nos melanossomas, à depleção de glutathione e à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) que, em última instância, promovem degradação oxidativa da célula.<sup>71,79</sup>

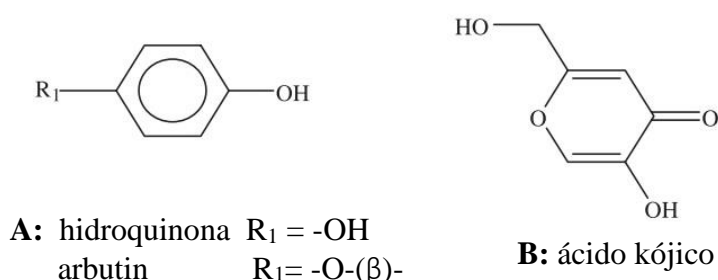
Aquando da sua descoberta e devido à sua eficácia, a utilização deste composto como despigmentante aumentou de forma brusca. Apesar dos benefícios relacionados com a redução da hiperpigmentação, efeitos adversos como a hipomelanose permanente (ausência parcial de melanina) ou a amelanose (ausência total de melanina) foram relatados. Por estes motivos, a concentração máxima em PCHC's permitida passou a ser de 2%.<sup>74</sup>

Apesar de a hidroquinona continuar a ser o despigmentante de referência no tratamento da hiperpigmentação, atualmente, por motivos de segurança, a dispensa deste fármaco só é realizada mediante apresentação de receita médica.<sup>74</sup> Em Portugal, a hidroquinona é comercializada sob a forma de gel e creme 40mg/mL, Hidrospot<sup>80</sup> e Pigmentasa<sup>81</sup>, respetivamente.<sup>14</sup>

O 4-resorcinol é um composto difenólico inibidor da TYRO que após metabolização origina quinonas reativas. O seu efeito despigmentante é então resultado da inibição da síntese da melanina, bem como da destruição dos melanócitos provocada pelas quinonas reativas formadas. Diversos estudos referem que a aplicação tópica deste composto em formulações a 0,3% tem efeitos benéficos no tratamento do melasma e na redução da hiperpigmentação inflamatória verificada após terapia com laser.<sup>74,82</sup>

Atualmente, a aloesina e o arbutin (**A**, Fig. 3.4), um  $\beta$ -glicósido natural da hidroquinona, são utilizados na indústria cosmética pelo seu poder despigmentante via inibição da TYRO<sup>71</sup>. Estes foram isolados das folhas da *Gvae grsi* e da *Aloe vera*, respetivamente.<sup>77</sup>

O ácido kójico (**B**, Fig. 3.4) é um forte inibidor da TYRO, mas apresenta alguns efeitos adversos sendo o mais relevante o desenvolvimento de alergias. A monoterapia com este fármaco revelou benefícios modestos pelo que têm sido sintetizados derivados com maior estabilidade, bem como uma penetração cutânea mais eficiente.<sup>6,83</sup>



**Figura 3.4** - Estruturas químicas da hidroquinona, arbutin e ácido Kójico. Adaptado de Solano *et al.*, 2006.<sup>74</sup>

### 3.1.4.1. Utilizações Alimentares e Clínicas

A aparência é um dos atributos que é tido em consideração pelos consumidores quando pretendem adquirir um produto alimentar, principalmente, no que se refere às frutas, vegetais e marisco. Entre os diversos aspetos que influenciam a aparência, a cor é um dos que mais determinam a decisão dos consumidores. O escurecimento deste tipo de alimentos torna-os menos apetecíveis e geralmente está associado a uma alteração do sabor e/ou amolecimento do produto em questão.<sup>20,84</sup>

O escurecimento pode ocorrer por dois processos distintos: oxidação não-enzimática e oxidação enzimática. Inibidores da TYRO têm especial interesse na inibição do escurecimento enzimático.<sup>71</sup>

Quando as frutas e vegetais são descascados, cortados, ou sofrem outro tipo de agressão física ocorre rutura da estrutura celular. Esta rutura coloca em contato a TYRO com os seus substratos fenólicos, que na presença de oxigénio, reúne as condições necessárias para o início do processo de oxidação enzimática. O grau de escurecimento depende da concentração e atividade da TYRO, da concentração dos compostos fenólicos, do oxigénio disponível, do pH, da temperatura, entre outros fatores.<sup>6,71,84</sup>

A oxidação enzimática dos alimentos pode ser diminuída através da aditivação de agentes redutores ou de inibidores enzimáticos. No entanto, poucos são os inibidores enzimáticos utilizados devido a possíveis alterações no sabor, a questões de segurança alimentar ou mesmo por inviabilidade financeira.<sup>20</sup>

Anteriormente, a indústria alimentar recorria a compostos contendo sulfitos para prevenir o processo de escurecimento referido. Estes compostos, para além de conferirem um paladar desagradável aos alimentos, foram associados ao desenvolvimento de alergias, pelo que a entidade reguladora dos Estados Unidos da América, a *Food and Drug Administration* (FDA) proibiu a sua utilização em géneros alimentícios.<sup>20,77</sup> Em resposta, a indústria alimentar investiu na utilização de compostos redutores, como o ácido ascórbico ou o ácido cítrico, utilizados como antioxidantes. Estes compostos reduzem as *o*-dopaquinonas formadas pela TYRO, diminuindo, conseqüentemente a formação do pigmento responsável pelo escurecimento dos alimentos. No processo de redução, estes ácidos vão sendo consumidos pelo que o efeito antioxidante é mais modesto comparativamente ao dos compostos à base de sulfitos.<sup>84</sup>

Recentemente, o 4-hexilresorcinol, um forte inibidor da TYRO, foi introduzido para prevenir a melanogénese em camarões, bem como a oxidação enzimática em frutas cortadas, frescas ou secas.<sup>77</sup> No entanto, e sem alternativas viáveis disponíveis o ácido ascórbico e cítrico continuam a ser os compostos mais utilizados atualmente.<sup>84</sup>

Sendo a segurança um aspeto fundamental, quando se trata de géneros alimentares, a investigação de novos inibidores da oxidação enzimática, mais efetivos e seguros, tem sido uma área de destaque. A investigação tem incidido principalmente nos compostos de origem natural presentes na dieta humana, por se encontrarem, associados a poucos efeitos adversos.<sup>77</sup>

Apesar da crescente utilização dos inibidores da tirosinase na indústria alimentar, a indústria cosmética continua a ser a área que mais investiga, desenvolve e aplica este tipo de compostos.<sup>6</sup>

Conforme supracitado, a melanina desempenha um papel crucial na proteção da pele contra os efeitos da exposição nociva aos raios UV, assim como na destoxificação de fármacos e de ROS.<sup>74</sup>

Apesar do seu efeito benéfico, a acumulação anormal de melanina em localizações específicas do corpo constitui um problema do foro estético. Esta acumulação pode culminar no desenvolvimento de sardas, cicatrizes de acne pigmentadas e de outras



patologias como o Melasma e o Lentigo.<sup>79,85</sup> A Fig. 3.5 ilustra alguns exemplos de situações provocadas pela acumulação excessiva de melanina.<sup>86-88</sup>



**Figura 3.5** - Fotografias ilustrativas das principais manifestações da acumulação excessiva de melanina. Adaptado de Eastern *et al.*, 2014; *Logical Images Inc.*, 2008; *The DermNet New Zealand Trust*, 2014.<sup>86-88</sup> A- Sardas, B- Lentigo, C-Melasma.

Segundo Solano *et al.* 2006, as patologias relacionadas com a pigmentação representam a terceira causa mais comum de patologias dermatológicas e infligem nos doentes acentuados problemas psicossociais.<sup>74</sup>

As sardas consistem em manchas planas de cor acastanhada que se manifestam, principalmente, na face, mas também podem surgir noutras zonas do corpo, frequentemente expostas à radiação solar. Este problema dermatológico tem origem hereditária, manifesta-se com maior prevalência em indivíduos de tez clara, especialmente ruivos, no entanto, pode também afetar indivíduos de tez escura.<sup>86,89</sup>

O melasma, por sua vez, caracteriza-se por uma coloração castanha ou castanha-acinzentada da pele como resultado da acumulação anormal de melanina. Geralmente afeta indivíduos do sexo feminino, especialmente com residência em regiões de elevada exposição à radiação UV intensa. As causas subjacentes ao desenvolvimento desta patologia encontram-se por elucidar, no entanto, supõe-se que esta seja de etiologia multifatorial. Trata-se de uma patologia de difícil tratamento devido à sua natureza refratária e recorrente.<sup>82,90</sup>

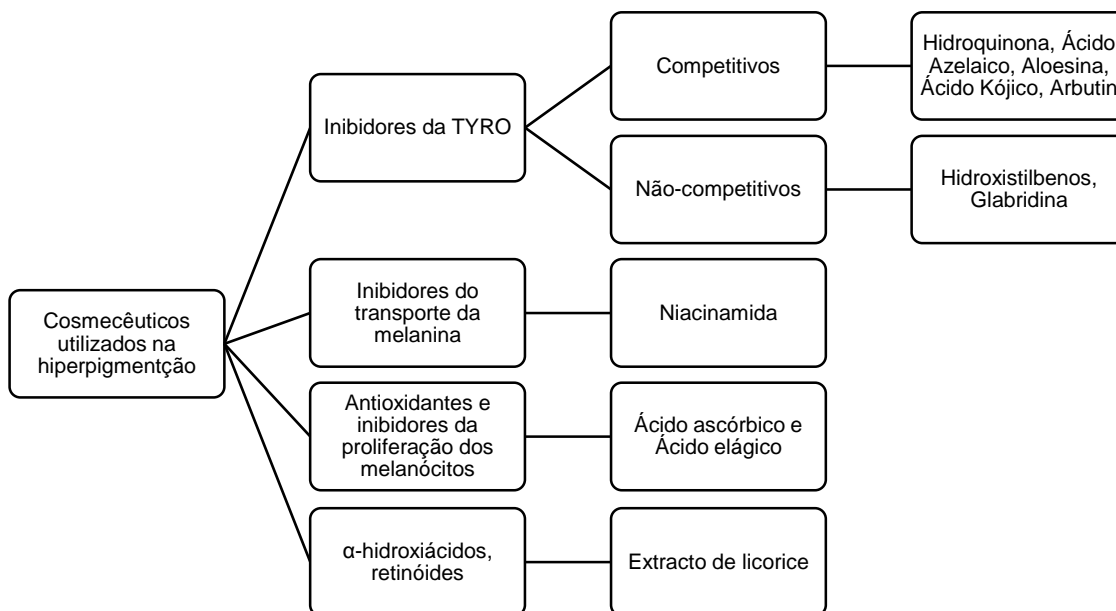
O lentigo caracteriza-se pela presença de lentigens (máculas<sup>XIV</sup> hiperpigmentadas). As lentigens podem ocorrer em qualquer parte do corpo, sendo particularmente comuns em indivíduos ruivos e de tez clara. Quanto à sua etiologia, destaca-se a exposição excessiva aos raios UV como principal responsável pela maior

---

<sup>XIV</sup> **Máculas** – Manchas ou alterações circunscritas da cor da pele, detetáveis apenas, através da visão, uma vez que não apresentam relevo.

parte dos casos. Alguns síndromes sistémicas como o Síndrome de Laugier–Hunzinger<sup>XV</sup> podem caracterizar-se também pelo aparecimento de lentigens.<sup>91,92</sup>

A terapêutica destas patologias dermatológicas envolve geralmente fármacos ou cosmecêuticos<sup>XVI</sup> contendo agentes despigmentantes.<sup>74,85</sup> Na Fig. 2.6 que se segue encontram-se representados os principais compostos utilizados.



**Figura 3.6** - Classes de compostos utilizados no tratamento e prevenção da hiperpigmentação. Adaptado de Sarkar *et al.*, 2013<sup>85</sup> TYRO – tirosinase.

Grande parte dos fármacos disponíveis para o tratamento da hiperpigmentação são inibidores da TYRO como a hidroquinona ou o ácido kójico.<sup>74</sup>

### 3.2. Neuromelanina e Tirosinase: Papel na Doença de Parkinson (DP)

Supõe-se que a neuromelanina, um tipo de melanina pouco estudada, possa estar relacionada com a neurodegeneração verificada em patologias como a DP. No cérebro esta melanina acumula-se nas células que sintetizam noradrenalina e dopamina.<sup>72</sup>

A DP caracteriza-se pelo seguinte quadro sintomatológico, bradicinesia, instabilidade postural, rigidez motora e tremores. Patologicamente, ocorre uma perda

<sup>XV</sup> **Síndrome de Laugier–Hunzinger** – Patologia rara, benigna e adquirida que consiste no aparecimento de máculas hiperpigmentadas nos lábios, mucosas (oral e genital), mãos e pés.<sup>92</sup>

<sup>XVI</sup> **Cosmecêuticos** – Termo não reconhecido pelas agências reguladoras do medicamento. Define produtos que pelo seu mecanismo de ação se encontram na fronteira entre cosméticos e medicamentos.<sup>85,184</sup>

progressiva de neurónios dopaminérgicos na substância nigra, que resulta numa significativa redução dos níveis de dopamina. Para além da diminuição dos neurónios dopaminérgicos, a DP caracteriza-se também pela presença de aglomerados proteicos denominadas corpos de Lewy, que conduzem a disfunção e morte neuronais.<sup>93</sup> A diminuição dos neurónios contendo neuromelanina é um critério de diagnóstico da DP.<sup>94</sup>

Durante anos debateu-se a hipótese da síntese de neuromelanina ser dependente da TYRO, como acontece com a eumelanina e feomelanina, o que poderia relacionar esta enzima com a DP. Em 1958, detetou-se a presença de neuromelanina na substância nigra de indivíduos albinos, que não expressam a enzima TYRO, refutando assim esta hipótese.<sup>72,95</sup>

Um estudo recente, publicado por Hasegawa *et al* 2010, voltou a definir a TYRO como um possível alvo terapêutico na DP, com base no seu papel na formação de espécies reativas, as dopamina-quinonas, que estão envolvidas em processos que conduzem à morte das células neuronais. No citosol, os derivados dopamina-quinona podem reagir com os grupos sulfidrílo, dos resíduos de cisteína de moléculas proteicas, promovendo uma alteração irreversível da sua função. A oxidação da dopamina gera também ROS, como o peróxido de hidrogénio, radicais superóxido e radicais hidroxilo que promovem danos celulares.<sup>21,72</sup> Estas evidências sugerem que as dopamina-quinonas interagem com moléculas chave das células neuronais, podendo conduzir à sua morte e consequentemente a desordens neurológicas.<sup>21,72,96</sup>

Teoricamente, a utilização de compostos inibidores da TYRO seria benéfica em casos de DP uma vez que resultaria numa menor atividade desta enzima, com consequente diminuição da produção de derivados dopamina-quinona, do *stress* oxidativo e da neurodegeneração.<sup>21</sup> No entanto, um estudo realizado por Gimenez *et al* 2003, demonstrou que a TYRO, no SNC, apenas era expressa nas células do epitélio pigmentado da retina, sem qualquer ligação com a região afetada pela DP.<sup>97</sup> O papel desta enzima na DP é controverso e sem evidências científicas concretas da sua influência no desenvolvimento desta patologia.

## **Capítulo 4**

## 4.1. Compostos Fenólicos como Inibidores da AChE, BChE e TYRO

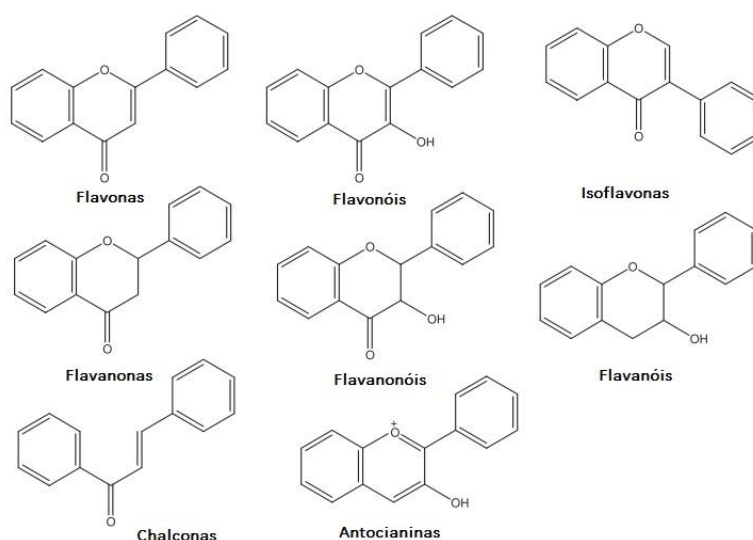
### 4.1.1. Caracterização dos Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um grupo diverso de compostos, cerca de 8000, caracterizados por uma estrutura química com um ou mais anéis aromáticos detentores de um ou mais grupos hidroxilo. Estes compostos são metabolitos secundários de diversas plantas, nas quais desempenham diversas funções biológicas. Consideram-se compostos fenólicos os flavonóides, os ácidos fenólicos e análogos, os taninos, os estilbenos, os curcuminóides, as cumarinas, os lignanos, as quinonas entre outros<sup>6,98</sup>

#### 4.1.1.1. Flavonóides

Os flavonóides constituem a classe de compostos fenólicos que engloba um maior número de compostos, cerca de 4000.<sup>71</sup> Estruturalmente, estes compostos apresentam um esqueleto de fenilbenzopirona (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) com dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que, geralmente, fazem parte de um anel pirano oxigenado.<sup>98</sup>

Dependendo do grau de saturação, bem como da abertura do anel pirano central, esta classe pode dividir-se em oito grupos, representados na Fig. 4.1: flavonas, isoflavonóides, flavonóis, flavanonas e flavanonóis, flavanóis, antocianinas e chalconas.<sup>99</sup>



**Figura 4.1-** Estrutura química dos principais grupos de flavonóides. Adaptado de Huang *et al.*, 2010<sup>98</sup>

Os flavonóides encontram-se presentes nas folhas, sementes, casca, flores e frutos das plantas onde desempenham funções como a proteção contra os raios UV, agentes patogénicos e animais herbívoros.<sup>71,98</sup> Estes são a classe de compostos fenólicos mais abundantes em plantas com propriedades medicinais.<sup>99</sup> No quadro 4.1 encontram-se discriminados os compostos mais comuns de cada grupo de flavonóides, bem como algumas das suas principais fontes alimentares.<sup>98-100</sup>

**Quadro 4.1** Principais compostos de cada um dos grupos que constituem os flavonóides, bem como as suas principais fontes biológicas.<sup>98-100</sup>

Grupo	Compostos mais comuns	Fonte biológica
<b>Flavonas</b>	Luteolina, Apigenina, Baicaléina, Crisina e os seus glicósidos	Tomilho, cerejas, azeitonas, brócolos e legumes <i>Scutellaria baicalensis, Chrysanthemum morifolium, Artemisia annua.</i>
<b>Flavonóis</b>	Quercetina, Canferol, Miricetina, Morina, Galangina e os seus glicósidos (Rutina, Quercitrina e Astragalina)	Couves, cebolas, maçãs, brócolos, tomates e cominhos <i>Sophora japonica, Rosa chinensis, A. annua, Alpinia officinarum, Crataegus pinnatifid</i>
<b>Flavanonas</b>	Naringenina, Hesperetina, Eriodictiol e os seus glicósidos (Naringina, Hesperidina, Liquiritina)	Laranjas, limões e uvas Plantas medicinais das famílias <i>Rutaceae, Rosaceae e Leguminosae</i>
<b>Flavononóis</b>	Taxifolina	
<b>Flavanóis</b>	Catequina, Epicatequina, Epigallocatequina, Epicatequina Galato, Epigallocatequina Galato	Maçãs, cacau, bagas <i>Prunella vulgaris e Rosa chinensis</i>

<b>Antocianinas</b>	Cianidina, Delfinidina, Malvidina, Peonidina, Pelargonidina e seus glicósidos	Casca da uva, mirtilos, couve roxa, feijão e batata-doce roxa  <i>Rhus verniciflua</i> , <i>Caesalpinia sappan</i> , e <i>Carthamus tinctorius</i>
<b>Chalconas</b>	Buteína e Cartamina	Plantas medicinais como a <i>Rhus verniciflua</i> , a <i>Caesalpinia sappan</i> e a <i>C. tinctorius</i>
<b>Isoflavonas</b>	Daidzeína, Ginesteína, Gliciteína e os seus glicósidos (Genistina e Daidzina)	Soja, trevo vermelho e legumes.  Plantas da família Leguminosae como a <i>Astragalus mongholicus</i>

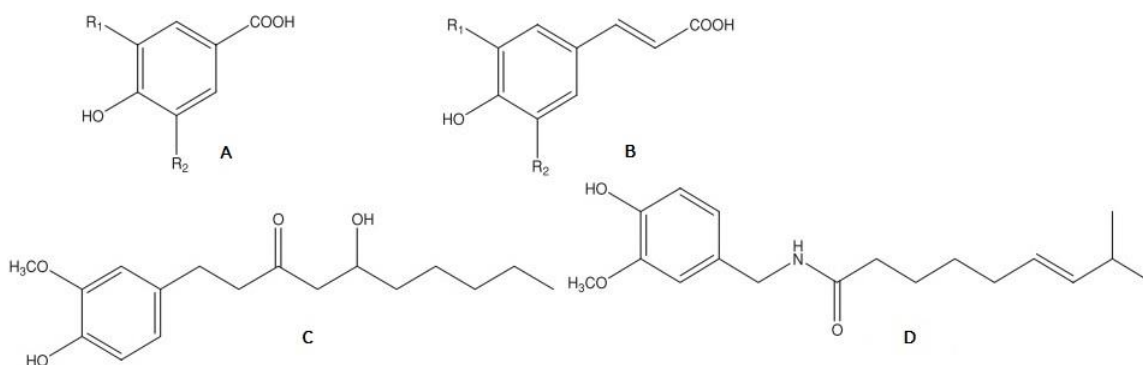
#### 4.1.1.2. Ácidos Fenólicos e Análogos

Os ácidos fenólicos constituem outra grande classe de compostos fenólicos. Estes dividem-se, por sua vez, em derivados do ácido benzóico e em derivados do ácido cinâmico, consoante a sua estrutura química. Apresentam um anel benzénico ligado a um grupo carboxilo (ácidos benzóicos) ou a um grupo propanóico (ácidos cinâmicos). Tanto os ácidos benzoicos como os cinâmicos podem apresentar diferentes graus de hidroxilação, denominando-se de ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, respetivamente.<sup>101</sup> São exemplos de ácidos hidroxibenzóicos os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico e sirínico. Por outro lado, os ácidos hidroxicinâmicos os mais comuns são o ácido ferúlico, o cafeico, o *p*-cumárico, o clorogénico e o sinápico.<sup>35,101</sup>

A concentração dos ácidos hidroxibenzóicos nas frutas e vegetais é bastante reduzida, à exceção de alguns frutos vermelhos, rabanete preto, cebolas e pele das batatas. Os ácidos hidroxicinâmicos, por sua vez, encontram-se num grande número de plantas e vegetais, apresentando uma maior contribuição para a ingestão diária de compostos fenólicos em detrimento dos ácidos hidroxibenzóicos e flavonóides.<sup>101,102</sup>

Alguns compostos fenólicos são considerados análogos dos ácidos fenólicos devido à sua semelhança estrutural. Nesta situação encontram-se a capsaicina, o ácido rosmarínico, o ácido elágico, o gingerol, o paradol, entre outros.<sup>98</sup>

Na Fig. 4.2 encontram-se representadas as estruturas químicas dos diversos grupos de ácidos fenólicos e seus análogos.



**Figura 4.2** - Estrutura química dos ácidos fenólicos. **A** – Estrutura química base dos ácidos hidroxibenzóicos, **B** - Estrutura química base dos ácidos hidroxicinâmicos, **C** - Gingerol, **D** - Capsaicina. Adaptado de <sup>98</sup>

#### 4.1.1.3. Taninos

Os taninos são compostos fenólicos hidrossolúveis e que se podem dividir em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis consistem em polifenóis complexos, que podem ser degradados em açúcares e ácidos fenólicos, quer por variações de pH, quer por hidrólise, enzimática ou não.<sup>103</sup> Estes compostos contêm um açúcar como constituinte do núcleo central cujos grupos hidróxilo estão parcial ou totalmente esterificados, pelo ácido gálico e derivados ou ainda por um ácido hexahidrodidifênico, denominando-se galotaninos e elagitaninos, respetivamente.<sup>104</sup>

Por sua vez, os taninos condensados, também conhecidos como proantocianidinas, são compostos mais complexos e abundantes comparativamente com os taninos hidrolisáveis. Constituem, principalmente, oligómeros e polímeros dos flavan-3-dióis (derivados da catequina ou epicatequina).<sup>105</sup>

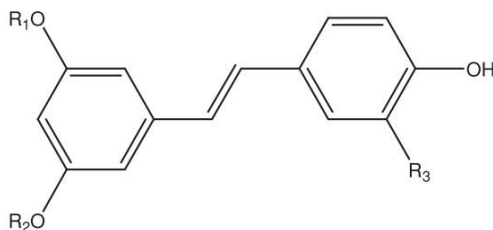
Os elagitaninos e proantocianidinas podem ser encontrados em frutas (ex. maçãs, morangos, pêssegos, amoras, entre outras), vegetais (ex. grão de bico, feijão-frade, lentilha e feijão branco) e em especiarias (ex. cravo-da-índia e canela).<sup>100</sup>

Diversas investigações identificaram taninos em plantas com propriedades medicinais Chinesas, destacando-se a *Punica granatum* e a *Sanguisorba officinalis* que revelaram um teor bastante elevado destes compostos. Galotaninos foram isoladas da *Euphorbia hirta*, *Glycyrrhiza glabra* e *Rhus succedanea*; elagitaninos da *T. chebula* e da *P. granatum*; e proantocianidinas da *Camellia sinensis*.<sup>4,102</sup>



#### 4.1.1.4. Estilbenos

Os estilbenos são compostos fenólicos constituídos por dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de etano. Estes, estruturalmente caracterizam-se pela presença de um núcleo 1,2-diariletano com grupos hidroxilo substituídos nos anéis aromáticos, como representado na Fig. 4.3.<sup>6,98</sup>



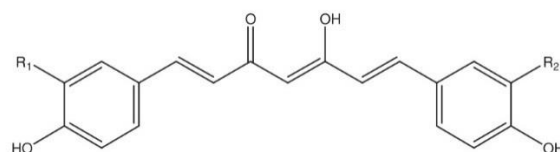
**Figura 4.3** - Estrutura química base dos estilbenos.<sup>98</sup>

Estes compostos encontram-se distribuídos, principalmente, em plantas superiores sob a forma de monómeros (resveratrol, oxiresveratrol) ou polímeros. O estilbeno mais abundante na alimentação humana é o trans-resveratrol, um trihidroxiestilbeno presente na pele das uvas tintas.<sup>100</sup> Plantas medicinais como a *Polygonum cuspidatum*, a *Polygonum multiflorum* e a *P. lactiflora* revelaram ser ricas em trans-resveratrol; *P. multiflorum* rica em piceatanol; *Morus alba* em oxiresveratrol.<sup>4,104</sup>

#### 4.1.1.5. Curcuminóides

Os curcuminóides são compostos derivados do ácido ferúlico. Estes consistem em duas moléculas de ácido ferúlico ligadas por um metileno com uma estrutura  $\beta$ -dicetona, num sistema altamente conjugado, conforme representado na Fig. 4.4. Estes, são compostos naturais presentes em plantas da família *Zingiberaceae*, sendo os mais comuns a curcumina, a demetoxicurcumina e a bis-demetoxicurcumina.<sup>4,104</sup>

Na China, plantas com elevados teores de curcuminóides como a *Curcuma longa* e a *Zingiber officinale* são utilizadas como plantas medicinais, como especiarias ou ainda como corantes naturais, devido à sua coloração amarela.<sup>4</sup>



**Figura 4.4** - Estrutura química base dos curcuminóides.<sup>98</sup>

#### 4.1.1.6. Cumarinas

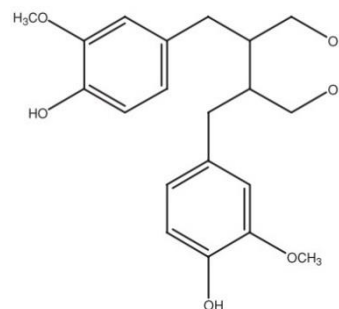
As cumarinas são lactonas que derivam da ciclização de ácidos *cis-orto*-hidroxicinâmicos. Estes estão presentes nas plantas sob a forma livre ou como glicósidos. Apresentam uma grande diversidade química, diferindo no grau de oxigenação da estrutura benzopirano.<sup>103,104</sup>

Geralmente, as cumarinas podem ser divididas em cumarinas simples (ex. esculetina e escopoletina), furanocumarinas (ex. psoraleno), piranocumarinas (ex. xantiletina e seselina) e outras cumarinas. Constituem-se como fontes de cumarinas os frutos, vegetais, azeite e bebidas como o café, o vinho e alguns chás.<sup>102,106</sup>

As cumarinas foram também identificadas em plantas com propriedades medicinais das famílias, Asteraceae, Convolvulaceae, Leguminosae, Magnoliaceae, Oleaceae, Rutaceae e Ranunculaceae.<sup>4,98,107</sup>

#### 4.1.1.7. Lignanos

Os lignanos são compostos difenólicos que derivam dos ácidos *cis-o*-hidroxicinâmicos. À semelhança das cumarinas existem na natureza quer na forma livre quer na forma de glicósidos. Constituem-se como exemplos de lignanos o secoisolariciresinol, matairesinol, pinoresinol, medioresinol, lariciresinol, siringaresinol e a sesamina.<sup>102,108</sup> A estrutura química do secoisolariciresinol encontra-se representada na Fig. 4.5.



**Figura 4.5** - Exemplo de estrutura dos lignanos, secoisolariciresinol.<sup>98</sup>

Estes compostos, encontram-se em concentrações elevadas em algumas sementes, principalmente nas sementes de linho, bem como em alguns vegetais e frutas. Bebidas como o chá, o café e o vinho, também são ricas em

lignanós, promovendo um aumento do aporte destes compostos nas dietas ocidentais.  
109,110

#### 4.1.1.8. Quinonas

Esta classe de compostos caracteriza-se pela presença de uma diona substituída na posição *orto* ou *para*, conjugada com um núcleo aromático (benzoquinonas) ou acopladas a sistemas aromáticos policíclicos (naftoquinonas, antraquinonas, fenantraquinonas).<sup>98,111</sup> As quinonas encontram-se numa grande variedade de famílias de plantas, nomeadamente nas famílias Ranunculaceae, Aphodelaceae, Fabaceae, Ebenaceae e Rhamnaceae, mas também, em alguns fungos e bactérias.<sup>111</sup> As antraquinonas constituem o grupo com maior número de compostos, presentes num maior número plantas medicinais e alimentares.<sup>112</sup>

#### 4.1.1.9. Outros Compostos Fenólicos

Compostos como os alcalóides fenólicos e os terpenos fenólicos (incluindo óleos aromáticos voláteis) são também considerados compostos fenólicos. No quadro 4.2, encontram-se discriminados alguns exemplos dos principais compostos que constituem esta classe.<sup>98,102,113</sup>

**Quadro 4.2** Exemplos de alcalóides e terpenos fenólicos e respetivas fontes biológicas.<sup>98,102,113</sup>

Composto		Fonte Biológica
<b>Alcalóides</b>	Magnoflorina	<i>Coptis chinensis</i>
<b>Fenólicos</b>	Nitidina	<i>Zanthoxylum nitidum</i>
	Carnosol e Epirosmanol	<i>Rosmarinus</i> (Alecrim)
<b>Terpenos</b>	Carvacrol	<i>Origanum</i> (Orégãos)
<b>Fenólicos</b>	Mentol	<i>Mentha</i> (Menta)
	Eugenol	<i>Syzygium aromaticum</i> (Cravinho-da-índia)

## 4.2. Interesse Clínico dos Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos desempenham diversas funções cruciais na ecologia, bem como na fisiologia das plantas. Estes têm sido bastante investigados para fins terapêuticos, principalmente, devido à sua capacidade de modular e controlar a formação de ROS, a toxicidade provocada por metais, processos inflamatórios, a apoptose, a transdução de sinais, a atividade de certos canais iônicos e neurotransmissores, entre outros.<sup>3,114,115</sup>

Uma das primeiras aplicações destes compostos com benefício terapêutico consistiu na sua utilização como antissépticos e como protetores solares, devido à sua eficiente absorção dos raios UV.<sup>114,116</sup>

Devido à sua ação no organismo, a ingestão de fenólicos na dieta alimentar resulta numa diminuição do *stress* oxidativo e do risco associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como por exemplo a DA, a DP, entre outras.<sup>3</sup>

Recentemente, os compostos fenólicos têm sido investigados pela sua capacidade de inibir, em particular, as enzimas envolvidas na fisiopatologia da DA<sup>5</sup> e da DP<sup>89</sup>.

#### **4.2.1. Efeito Inibitório de Compostos Fenólicos sobre a AChE e a BChE**

Um dos principais, se não, o principal interesse do desenvolvimento de ChEIs consiste na sua utilização em patologias como a DA. Estes compostos podem ser também importantes na terapêutica de outras patologias como a Miastenia Gravis e o Glaucoma.<sup>37</sup>

Um vasto número de extratos fenólicos provenientes de plantas tem sido investigado devido ao seu potencial no tratamento de patologias cognitivas e neurodegenerativas.<sup>5,117,118</sup> Os mecanismos pelos quais os compostos fenólicos atenuam os sintomas associados a estas patologias são bastante diversos e complexos.<sup>3</sup> Nesta dissertação, o foco consiste na determinação da sua atividade inibitória das enzimas AChE e BChE.

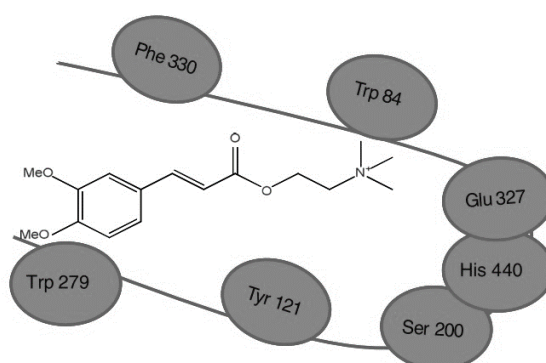
Alguns estudos direcionaram o seu foco de investigação para os aspetos estruturais envolvidos na inibição da AChE por compostos fenólicos. Destes estudos concluiu-se que:

- I. Compostos fenólicos com grupos semelhantes aos do ácido cafeico são capazes de ocupar a “bolsa” onde se encontra o sítio ativo da enzima, por posicionarem o

anel aromático na região aniônica periférica, conforme representado na Fig. 4.6; 5,119

- II. Os flavonóides que possuem um grupo hidróxilo livre na posição 3 do anel pirano oxigenado, demonstram maior atividade inibitória quando comparados com os que não têm grupo hidroxilo nessa posição ou o apresentam sob a forma glicosilada; <sup>5,120</sup>

No entanto, estes estudos apenas especulam relativamente à relação existente entre a estrutura dos compostos e a sua capacidade inibitória sobre a atividade enzimática da AChE, *in vitro*. Neste contexto, há ainda que ter em consideração a metabolização sofrida pelos compostos fenólicos, após a sua ingestão, quer ao longo do trato gastrointestinal, quer ao nível do fígado. Desta forma, é necessário o desenvolvimento de novas investigações, *in vivo*, que permitam avaliar a relação entre a estrutura do composto e a inibição enzimática originada, quer dos compostos fenólicos quer dos seus metabolitos. <sup>5</sup>



**Figura 4.6** - Interação do grupo aromático do ácido cafeico com a região aniônica periférica (Trp 279) da acetilcolinesterase. Adaptado de Roseiro *et al.*, 2012 <sup>5</sup> Phe – fenilalanina, Trp – triptofano, Tyr – tirosina, Ser – serina, His – histidina, Glu – glutamina.

Outros estudos focaram-se na determinação da atividade inibitória de extratos fenólicos de plantas utilizadas, tradicionalmente, com o objetivo de melhorar a capacidade cognitiva, em particular da memória, e de prevenir o aparecimento de patologias neurodegenerativas. <sup>4,102</sup> Alguns dos extratos que revelaram atividade inibitória de ChEs foram os extratos da *Mentha arvensis*<sup>121</sup>, *Buddleja davidii*<sup>121</sup>, *Laurocerasus officinalis*<sup>122</sup>, *Fagopyrum esculentum*<sup>123</sup>, *Catharantus roseus*<sup>124</sup>, entre outros.

Apesar de diversos extratos demonstrarem uma forte capacidade inibitória das ChEs, na maior parte destes estudos, os compostos isolados responsáveis pela atividade inibitória dos extratos não foram identificados nem caracterizados. Na tabela 4.3 apresentam-se alguns compostos fenólicos responsáveis pela atividade inibitória da AChE identificados em diversos estudos.

**Quadro 4.3** Compostos fenólicos com atividade inibitória comprovada da acetilcolinesterase e suas fontes biológicas. Adaptado de <sup>5</sup>

Composto	Fonte Biológica
<b>Tilirosido</b>	<i>Agrimonia pilosa ledeb</i> <sup>117</sup>
<b>Quercetina</b>	<i>Agrimonia pilosa</i> <sup>117</sup>
<b>Quercitrina</b>	<i>Polygonum sachalinensis</i> <sup>125</sup>
<b>Galangina</b>	Plantas com propriedades medicinais chinesas, como a <i>Rhizoma Alpiniae Officinarum</i> <sup>126</sup>
<b>Resveratrol</b>	Uva tinta / Vinho tinto <sup>127</sup>
<b>Ácido Cafeico</b>	Sementes e folhas de várias plantas, azeitonas <sup>75</sup>
<b>Rutina</b>	<i>Hypericum</i> <sup>128</sup>
<b>Catequinas:</b> <b>Epicatequina,</b> <b>Epigallocatequina,</b> <b>Epigallocatequina Galato</b>	<i>Camellia sinensis, Diospyros kakis</i> <sup>127,129,130</sup>
<b>Ácido Rosmarínico</b>	<i>Plectranthus barbatus</i> <sup>131</sup>

Por outro lado, os estudos existentes que comprovem a capacidade inibitória dos compostos fenólicos sobre a atividade enzimática da BChE são escassos ou muito limitados, provavelmente, devido ao fato do envolvimento desta enzima nas doenças neurodegenerativas ter sido comprovado muito recentemente. Não obstante deste facto, encontram-se descritos na literatura alguns extratos com atividade inibitória da BChE como por exemplo os extratos de *C. arvensis*<sup>132</sup>, *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica*<sup>133</sup> e *Calceolaria talcana* e *Calceolaria integrifolia* <sup>134</sup>. Alguns compostos fenólicos também foram identificados como detentores de atividade inibitória desta enzima, nomeadamente, o ácido cafeico e o ácido clorogénico. <sup>35</sup>

Neste contexto, e tendo em consideração o papel de suporte, bem como o carácter compensatório da BChE <sup>15,36</sup>, é necessário o desenvolvimento de mais estudos direccionados para a avaliação da capacidade inibitória dos compostos fenólicos na atividade de ambas as enzimas, a AChE e a BChE. Teoricamente, um composto capaz de inibir ambas as ChEs apresentará melhores resultados relativamente ao aumento da concentração de ACh.

Este trabalho, desenvolvido no âmbito da presente dissertação, surge da necessidade de avaliar a atividade inibitória, sobre as enzimas supracitadas, dos compostos fenólicos, isoladamente.

#### **4.2.2. Efeito Inibitório de Compostos Fenólicos sobre a TYRO**

Os compostos fenólicos representam a maior parte dos inibidores da TYRO conhecidos até à data. Alguns compostos fenólicos, como a glabridina, foram identificados como sendo detentores de elevada atividade inibitória da TYRO, comparativamente a compostos utilizados atualmente no tratamento da hiperpigmentação. <sup>135</sup> Os principais compostos fenólicos estudados pela sua atividade inibitória da TYRO são os flavonóides.<sup>6</sup>

Da análise dos resultados de algumas investigações, pode inferir-se que alguns flavonóides como o canferol, a quercetina e a morina, inibem a TYRO enquanto outros, como a catequina e ramnetina, se comportam como cofatores ou substratos da enzima. <sup>71</sup>

Após a perceção da diversidade comportamental e da atividade química dos compostos fenólicos, diversos estudos foram realizados com o objetivo de estabelecer a relação entre efeito inibitório dos compostos fenólicos sobre a TYRO e a sua estrutura química. <sup>136-138</sup> Demonstrou-se que os flavonóides que continham um grupo  $\alpha$ -ceto, exibiam uma maior atividade inibitória. <sup>138</sup> Atividade essa que pode dever-se à semelhança entre o grupo dihidroxifenil da L-DOPA e o grupo  $\alpha$ -Ceto destes flavonóides.

71

Ainda no que respeita à relação estrutural dos flavonóides e a sua atividade inibitória da TYRO, verificou-se que os flavonóides glicosilados ou metoxilados apresentavam, geralmente, menor atividade inibitória. Esta redução na atividade pode ser resultado da perda de grupos hidróxilo considerados essenciais para a inibição ou da incapacidade dos compostos se fixarem no sítio ativo da enzima. <sup>6</sup>

Flavonóis, isolados de plantas, têm sido identificados como inibidores da TYRO, geralmente inibidores competitivos. Dos principais flavonóis estudados, a quercetina é o que apresenta maior atividade inibitória, seguida, por ordem decrescente, da miricetina, canferol, galangina e morina.<sup>139,140</sup> Demonstrou-se também que os glicósidos da quercetina e do canferol apresentam menor atividade inibitória comparativamente com as agliconas correspondentes. Importa também referir que a atividade da quercetina é bastante modesta, quando comparada com a do ácido kójico, apresentando cerca 20% da atividade deste último. Em suma, apesar de serem considerados inibidores da TYRO, estes flavonóides possuem pouco ou nenhum interesse por serem inibidores fracos desta enzima.<sup>6</sup>

Algumas flavonas, flavanonas e flavanóis apresentam capacidade inibitória da TYRO, como por exemplo, a nobiletina, a naringina e a neohesperidina, presentes na casca de citrinos. Estes inibidores também são bastante fracos quando comparados com o ácido kójico.<sup>141,142</sup> De extratos de plantas da espécie *Morus*, isolou-se a norartocarpina. Esta apresenta uma atividade inibitória da TYRO 10,4 vezes superior à do ácido kójico.<sup>143</sup> Por outro lado, a taxifolina, um flavanol isolado da *Polygonum hydropiper*, revelou uma atividade inibitória semelhante à do ácido kójico.<sup>78</sup>

Os isoflavonóides são outro grupo de flavonóides que também tem revelado atividade inibitória da TYRO. Os extratos das raízes e sementes da espécie *Glycyrrhiza* são conhecidos, há bastante tempo, pela sua atividade despigmentante. Desta planta foram isolados dois isoflavanos, com forte atividade inibitória da TYRO, a glabridina e a gliasperina C, com uma atividade cerca de 15 e 30 vezes superior à apresentada pelo ácido kójico, respetivamente.<sup>135,144</sup> A haginina A, isolada da *Lespedeza cyrtobotrya*, também demonstrou uma atividade superior à do ácido kójico, neste caso, cerca de 10 vezes.<sup>145</sup>

Outros compostos fenólicos como os ácidos fenólicos, as chalconas, os estilbenos e as cumarinas, demonstraram também atividade inibitória da TYRO. A título de exemplo pode referir-se a licochalcona A e o oxiresveratrol, com uma atividade 5,4 e 32 vezes superior à do ácido kójico, respetivamente.<sup>143,146</sup>

Nesta perspetiva e dada a elevada e variada utilização de inibidores da TYRO, o desenvolvimento de inibidores da TYRO, mais efetivos e seguros, é de extrema importância quer para a indústria da agricultura quer para a farmacêutica e cosmética.<sup>89</sup> A identificação dos compostos com elevada atividade inibitória desta enzima, eleva a classe dos compostos fenólicos a uma das com maior interesse nesta área.<sup>6,71</sup>



## **Capítulo 5**

## 5.1 Trabalho Experimental

### 5.1.1 Materiais e Métodos

#### 5.1.1.1 Materiais

No decorrer do trabalho prático foi avaliada a atividade inibitória de 23 compostos fenólicos sobre a atividade enzimática da AChE, da BChE e da TYRO. Os compostos fenólicos foram selecionados com base em investigações prévias realizadas pelo grupo de investigação do Centro de Ciências Marinhas (CCMar) da Universidade do Algarve. Na tabela 5.1 encontram-se representados os compostos analisados, o seu fornecedor e o seu número CAS<sup>XVII</sup>.

**Quadro 5.1** Compostos analisados, fornecedor e respetivo número de registro CAS.<sup>147</sup>

Abreviatura	Composto	Fornecedor	Nº CAS <sup>147</sup>
<b>4HBZ</b>	4-hidroxibenzaldeído	Sigma-Aldrich	123-08-0
<b>AP</b>	Apigenina	Sigma-Aldrich	520-36-5
<b>BHT</b>	Butil-hidroxitolueno	Sigma-Aldrich	128-37-0
<b>ACA</b>	Ácido Cafeico	Sigma-Aldrich	331-39-5
<b>CH</b>	Hidrato de Catequina	Sigma-Aldrich	7295-85-4
<b>AC</b>	Ácido Clorogénico	Sigma-Aldrich	327-97-9
<b>ACU</b>	Ácido Cumarínico	Sigma-Aldrich	91-64-5
<b>EC</b>	Epicatequina	Sigma-Aldrich	490-46-0
<b>EG</b>	Epigalocatequina	Sigma-Aldrich	970-74-1
<b>EGG</b>	Epigalocatequina galato	Sigma-Aldrich	989-51-5
<b>AF</b>	Ácido ferúlico	Sigma-Aldrich	1135-24-6,
<b>FL</b>	Flavona	Sigma-Aldrich	525-82-6
<b>AG</b>	Ácido gálico	Sigma-Aldrich	149-91-7
<b>AGE</b>	Ácido gentísico	Sigma-Aldrich	490-79-9
<b>AMHB</b>	Ácido <i>m</i> -hidroxibenzóico	Sigma-Aldrich	99-06-9
<b>APHB</b>	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	Sigma-Aldrich	99-96-7
<b>QC</b>	Quercetina	Sigma-Aldrich	117-39-5
<b>AR</b>	Ácido rosmarínico	Sigma-Aldrich	20283-92-5
<b>RU</b>	Rutina	Sigma-Aldrich	153-18-4
<b>AS</b>	Ácido salicílico	Sigma-Aldrich	69-72-7

<sup>XVII</sup> O Número CAS - de um composto químico, polímero ou sequência biológica, é um número com um registro único no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*, uma divisão da *Chemical American Society* <sup>185</sup>

<b>ASI</b>	Ácido siríngico	Sigma-Aldrich	530-57-4
<b>ATC</b>	Ácido <i>trans</i> -cinâmico	Sigma-Aldrich	140-10-3
<b>AV</b>	Ácido vanílico	Sigma-Aldrich	121-34-6

As enzimas utilizadas foram, AChE proveniente de *Electrophorus electricus*, tipo V-S (EC 3.1.1.7), BChE de soro de cavalo (EC 3.1.1.8) e TYRO de cogumelo (EC 1.14.1.8.1) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). A água destilada foi preparada internamente, segundo procedimentos específicos, nos laboratórios do Centro de Ciências Marinhas (CCMar) da Universidade do Algarve. Os restantes reagentes utilizados, iodeto de acetilcolina, cloreto de butirilticolina, L-tirosina, ácido dinitrobenzóico (DTNB), tampão fostato de sódio e o tampão fostato de potássio foram adquiridos à VWR International (Lovaina, Bélgica).

Na realização dos ensaios foi utilizado material corrente de laboratório, placas de 96 poços e estufa. Procedeu-se à leitura das placas recorrendo a um espectrofotómetro.

## **5.1.1.2 Metodologia Experimental**

### **5.1.1.2.1 Pesquisa Bibliográfica**

Na elaboração deste trabalho foram consultados livros, revistas científicas, bases de dados e bibliotecas virtuais. A maior parte da informação foi recolhida sob formato digital recorrendo a bibliotecas virtuais como o b-on, o PubMed e o Google Académico.

Tentou-se, sempre que possível, incluir apenas informação cientificamente fundamentada e com data de publicação posterior a 2004. Os termos de pesquisa mais utilizados foram: “Phenolic compounds AND AChE inhibitors”, “Phenols AND ChE inhibitor”, “Phenolic compounds AND cholinesterase inhibitors”, “Phenolic compounds AND Butyrylcholinesterase”, “Phenolic compounds AND Tyrosinase”, “Phenols AND tyrosinase inhibition”, “Phenolic compounds AND Alzheimer” e “Phenolic compounds AND hyperpigmentation”.

### **5.1.1.2.2 Preparação das Soluções**

Para cada composto, referido na tabela 5.1, procedeu-se à preparação de pelo menos três soluções de diferentes concentrações. As concentrações variaram entre 50µM a 300µM.

Na literatura, o solvente mais comumente utilizado neste tipo de ensaios é o dimetilsulfóxido (DMSO).<sup>148-150</sup> Neste trabalho prático optou-se por utilizar água destilada, em detrimento do DMSO, por ser um solvente que não influencia negativa ou positivamente a atividade enzimática, ao contrário do DMSO que diminui a atividade da TYRO<sup>151</sup>; por ser um solvente mais económico; e por ser o solvente de eleição quando se pretende analisar compostos que podem vir a integrar uma formulação terapêutica.<sup>152</sup>

### **5.1.1.2.3 Determinação da Atividade Inibitória dos Compostos**

#### **5.1.1.2.3.1 Ensaio Colorimétrico de Inibição das Enzimas AChE e BChE.**

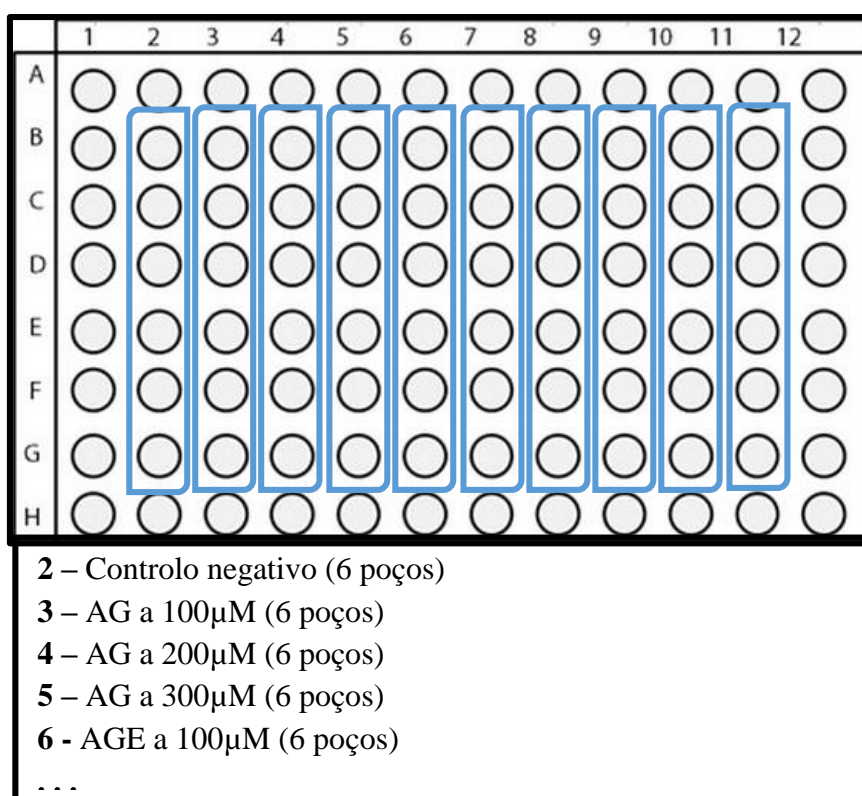
A determinação da atividade inibitória dos compostos sob a AChE e BChE foi efetuada recorrendo a uma adaptação do método espectrofotométrico desenvolvido por Ellman *et al.*, 1961, adaptado por Orhan *et al.*, 2007.<sup>150</sup>

Utilizou-se AChE de *E. electricus* e BChE de soro de cavalo, bem como os seus respetivos substratos acetilcolina e butirilcolina. O ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) foi utilizado para revelar a atividade enzimática. Como controlo positivo recorrer-se-ia à galantamina, no entanto, devido a problemas no fornecedor tal não foi possível, pelo que se utilizou como referência os valores de inibição enzimática para as enzimas em estudo, descritos na literatura para este fármaco.

A análise da atividade enzimática foi realizada em placas de 96 poços. Em cada placa procedeu-se à análise de seis poços do controlo negativo e seis poços de cada composto fenólico nas diferentes concentrações. Na Fig. 5.1 encontra-se esquematizado uma representação do preenchimento da placa de 96 poços. Procedeu-se à análise da atividade enzimática, através da execução do seguinte procedimento experimental:

- 1) Misturou-se em cada poço de cada placa, 140µl de tampão fosfato de sódio 0,1 mM (pH=8,0), 20µl do composto fenólico a analisar (ou do respetivo controlo) e 20µl de AChE ou BChE (0,28 U/ml);
- 2) Incubou-se as placas durante 15 minutos a 37 °C;

- 3) Após incubação, procedeu-se à adição de 10µl do substrato da enzima (4mg/ml), iodeto de acetiltiocolina no caso da AChE ou cloreto de butiriltiocolina no caso da BChE, e 20 µL de DTNB (1,2 mg/ml), a cada poço.
- 4) A hidrólise do iodeto de acetiltiocolina/cloreto de butiriltiocolina catalisado pela AChE/BChE é monitorizada pela formação do anião 5-tio-2-nitrobenzoato. Este anião é formado pela reação do DTNB com as tiocolinas resultantes da hidrólise. No final da reação, a concentração deste anião pode ser determinada a 412 nm, recorrendo a um espectrofotómetro. Quanto maior for a atividade enzimática, mais anião 5-tio-2-nitrobenzoato será formado e, conseqüentemente, maior será a absorvência (A) determinada no espectrofotómetro.



**Figura 5.1** - Exemplo representativo do preenchimento da placa de 96 poços.

Assim, a atividade das enzimas para cada amostra é calculada por comparação com o controlo negativo, através da seguinte expressão matemática:

$$Atividade (\%) = \frac{A_{amostra}}{A_{controlo\ negativo}} \times 100$$

**Legenda:** A – absorvência

O resultado final da atividade enzimática, expressa em percentagem, obtida para cada concentração do composto, representa a média dos resultados obtidos para as seis amostras desse composto numa determinada concentração.

#### **5.1.1.2.3.2 Ensaio Colorimétrico de Inibição da Enzima Tirosinase**

A atividade inibitória dos compostos sob a TYRO foi avaliada através de uma adaptação do método colorimétrico descrito por Nerya *et al* 2003<sup>153</sup>. Utilizou-se TYRO de cogumelo e o respetivo substrato L-tirosina.

A determinação da atividade inibitória da enzima TYRO regeu-se pelos ensaios efetuados na determinação da atividade das ChEs. Em cada ensaio foi analisado um controlo negativo e um conjunto de compostos fenólicos, conforme esquematizado na Fig. 5.1. Como controlo negativo utilizou-se o arbutin, tendo sido calculada a sua atividade inibitória sobre a enzima nas concentrações de 100, 200 e a 300 $\mu$ M. Neste ensaio utilizou-se o seguinte procedimento experimental:

- 1) Misturou-se 70  $\mu$ L do composto fenólico (ou dos respetivos controlos) e 30  $\mu$ L de tirosinase (333 U/mL em tampão fosfato de potássio a pH 6,5);
- 2) Incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente;
- 3) Adicionou-se 110  $\mu$ L do substrato L-tirosina a 2mM, a cada poço;
- 4) Incubou-se 45 minutos à temperatura ambiente;
- 5) Após incubação realizou-se a leitura das placas a 492nm recorrendo a um espectrofotómetro.

A oxidação da L-tirosina é monitorizada pela formação de dopacromo, que resulta da auto-oxidação da dopaquinona (produto da reação entre a TYRO e a L-tirosina), a 492 nm num leitor de placas de 96 poços. Quanto maior for a atividade inibitória do composto em estudo, menos dopacromo é formado e menor é a absorvência das amostras.

Os resultados finais da atividade enzimática obtidos para cada composto a uma determinada concentração, resultam da aplicação da expressão matemática supracitada no ensaio colorimétrico de inibição das enzimas AChE e BChE. À semelhança do ensaio anterior, os resultados finais resultam da média da atividade das seis amostras (poços).

#### **5.1.1.2.4 Análise dos Resultados**

Os resultados foram analisados recorrendo ao método de Duncan no programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 22. De forma a simplificar a apresentação dos resultados, agruparam-se os compostos fenólicos da seguinte forma: flavonóides, ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos e outros compostos fenólicos.<sup>101,104,154</sup>

## **5.1.2 Resultados e Discussão**

A água é um solvente bastante polar e como tal, alguns compostos revelaram-se insolúveis a determinadas concentrações o que condicionou a determinação da sua atividade inibitória sobre as enzimas em estudo. Por este motivo concentrações superiores a 100µM de Quercetina, a 150µM de BHT e de Rutina não foram analisadas. Os compostos Apigenina e Flavona revelaram-se insolúveis mesmo a baixas concentrações pelo que a sua atividade inibitória também não foi passível de ser determinada.

O objetivo deste trabalho prático seria calcular o IC<sub>50</sub> de cada composto para cada enzima, no entanto, devido à baixa atividade inibitória apresentada pela maioria dos compostos optou-se por apresentar os resultados de acordo com a atividade enzimática obtida.

### **5.1.2.1 Atividade Inibitória dos Compostos Fenólicos sobre a AChE e BChE**

Devido a um problema laboratorial, não foi possível determinar o efeito inibitório da galantamina sobre a atividade enzimática da AChE e da BChE, pelo que se consideraram valores descritos, na literatura, como referência. Na ausência deste controlo positivo, a atividade inibitória de cada composto será avaliada tendo em consideração a atividade dos restantes compostos.

Nas tabelas 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4, encontram-se apresentados os resultados da influência dos flavonóis, ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos e outros compostos fenólicos na atividade enzimática da AChE e da BChE. Para cada concentração de composto fenólico utilizado, determinou-se o valor de atividade enzimática, bem como o respetivo erro associado. Valores de atividade enzimática superiores a 100% resultam de possíveis erros, interferências ou do facto de alguns compostos poderem atuar como cofatores ou substratos das enzimas.

**Tabela 5.1** - Efeito dos flavonóides sobre a atividade enzimática da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

Atividade da AChE e BChE – Flavonóides			
Composto	Concentração (µM)	Atividade AChE (%) ± σ <sub>m</sub> (%)	Atividade BChE (%) ± σ <sub>m</sub> (%)
CH	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	79,92 <sup>b</sup> ± 3,53	93,26 <sup>b</sup> ± 3,49
	200	79,87 <sup>b</sup> ± 3,15	92,46 <sup>b</sup> ± 4,65
	300	74,97 <sup>c</sup> ± 2,77	93,40 <sup>b</sup> ± 3,16
EC	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	87,51 <sup>b</sup> ± 4,65	96,94 <sup>a</sup> ± 4,92
	200	89,36 <sup>b</sup> ± 2,75	96,55 <sup>a</sup> ± 5,46
	300	85,89 <sup>b</sup> ± 3,63	97,56 <sup>a</sup> ± 5,42
EG	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	101,09 <sup>a</sup> ± 4,46	101,72 <sup>a</sup> ± 3,65
	200	99,37 <sup>a</sup> ± 5,73	99,21 <sup>a</sup> ± 5,03
	300	95,43 <sup>a</sup> ± 8,44	95,85 <sup>a</sup> ± 7,78
EGG	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	101,35 <sup>a</sup> ± 1,43	99,71 <sup>a</sup> ± 2,81
	200	100,76 <sup>a</sup> ± 4,09	99,69 <sup>a</sup> ± 1,12
	300	87,33 <sup>b</sup> ± 2,43	95,81 <sup>b</sup> ± 2,49
QC	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	50	99,09 <sup>a</sup> ± 3,40	103,58 <sup>a</sup> ± 5,96
	75	95,33 <sup>b</sup> ± 1,88	102,70 <sup>a</sup> ± 4,24
	100	89,81 <sup>c</sup> ± 2,41	102,84 <sup>a</sup> ± 3,98
RU	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	92,53 <sup>b</sup> ± 3,02	93,45 <sup>ab</sup> ± 3,82
	200	88,74 <sup>b</sup> ± 4,34	90,87 <sup>bc</sup> ± 5,71
	250	68,47 <sup>c</sup> ± 3,03	83,29 <sup>c</sup> ± 8,91
FL		Insolúvel (Não determinado)	
AP		Insolúvel (Não determinado)	
Galantamina		0,57 ± 0,05 <sup>128</sup>	74,23 ± 5,16 <sup>155</sup>



## IC<sub>50</sub>

AChE – acetilcolinesterase, BChE – butirilcolinesterase,  $\mu\text{M}$  – micromolar, % – percentagem,  $\sigma_m$  – erro padrão, IC<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% da enzima, CH – hidrato de catequina, EC – epicatequina, EG – epigalocatequina, EGG – epigalocatequina galato, QC – quercetina, RU – rutina, FL – flavona, AP – apigenina.

Dos resultados obtidos para os flavonóides, discriminados na tabela 5.1, pode observar-se que os compostos desta classe, à exceção do EG, apresentaram maior atividade inibitória da AChE do que da BChE.

Das Galocatequinas a EGG e a EC apresentaram atividade inibitória semelhante nas concentrações utilizadas, sendo que a EC promoveu uma redução mais acentuada da atividade de ambas as enzimas a concentrações mais baixas (100 $\mu\text{M}$ ). A EG apresentou um perfil de inibição semelhante para as duas enzimas, sendo o composto que demonstrou a atividade inibitória mais reduzida.

A QC, devido à sua baixa solubilidade em água, não pôde ser analisada a concentrações superiores a 100 $\mu\text{M}$ . No entanto, a 100 $\mu\text{M}$  este composto revelou uma ligeira inibição da atividade da AChE, correspondente a  $89,81 \pm 2,41\%$  de atividade. Num estudo realizado por Fan *et al.* 2010, a QC apresentou um valor de IC<sub>50</sub> para a AChE de 242,19  $\mu\text{M}$ <sup>125</sup>. Neste caso e atendendo ao valor de IC<sub>50</sub> da QC descrito na literatura para a AChE, seria necessário a análise de concentrações superiores deste composto para se poder inferir relativamente à sua atividade inibitória.

O CH foi, dos compostos em estudo, o que originou uma maior diminuição da atividade da AChE a baixas concentrações (100  $\mu\text{M}$ ), inibindo em cerca de 20,08% a atividade da enzima. Desta forma, foi o composto mais efetivo a concentrações reduzidas e demonstrou uma relação direta entre a concentração utilizada e a respetiva percentagem de inibição. Numa concentração de 300 $\mu\text{M}$  o composto resultou numa inibição de 25,03%. A ação inibitória sobre a BChE revelou-se bastante inferior, cerca de 7% de inibição a 300  $\mu\text{M}$ , independentemente da concentração utilizada. Não foram encontrados resultados da atividade inibitória deste composto na literatura.

Dos flavonóides, a RU foi o composto que provocou uma maior diminuição da atividade enzimática, a concentrações superiores a 200 $\mu\text{M}$ . O aumento da inibição promovida pela RU em ambas as enzimas revelou-se dependente do aumento da concentração do composto. A 250 $\mu\text{M}$  de RU, a AChE revelou uma atividade de  $68,47 \pm 3,03\%$  e a BChE de  $83,29 \pm 4,34\%$ , o que corresponde a 31,53% e 16,71% de inibição da sua atividade enzimática, respetivamente.

No estudo realizado por Hernandez *et al* 2010, a atividade inibitória da RU sobre a AChE foi substancialmente superior à determinada neste trabalho prático, 50% de inibição a 140,86µM em DMSO, comparativamente ao valor obtido, cerca de 31,53% de inibição a 250µM em água. Noutro estudo, a RU foi considerada como sendo isenta de atividade inibitória da AChE a 163,80µM em metanol.<sup>154</sup> No caso particular da RU, estas diferenças de resultados podem ser justificadas pela utilização de diferentes solventes, que dissolvem em maior ou menor extensão o composto, afetando a sua capacidade inibitória.

A galantamina utilizada como inibidor de referência apresenta um IC<sub>50</sub> de 0,57µM para a AChE e de 74,23µM para a BChE.<sup>128,155</sup> Apesar da RU apresentar a maior atividade inibitória entre os compostos flavonóides analisados, a sua atividade é muito baixa quando comparada com a atividade de fármacos, atualmente, utilizados no tratamento da DA como a galantamina.

**Tabela 5.2** - Efeito dos ácidos hidroxicinâmicos sobre a atividade enzimática da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

Atividade da AChE e BChE - Ácidos Hidroxicinâmicos			
Composto	Concentração (µM)	Atividade	
		AChE (%) ± σ <sub>m</sub> (%)	BChE (%) ± σ <sub>m</sub> (%)
ACA	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>b</sup> ± 0,00
	100	97,88 <sup>a</sup> ± 2,74	107,99 <sup>ab</sup> ± 9,68
	200	94,93 <sup>a</sup> ± 2,70	109,02 <sup>a</sup> ± 4,58
	300	93,40 <sup>b</sup> ± 6,01	110,74 <sup>a</sup> ± 3,78
AC	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	101,48 <sup>ab</sup> ± 2,76	101,00 <sup>a</sup> ± 3,71
	200	107,65 <sup>a</sup> ± 4,41	99,02 <sup>a</sup> ± 6,87
	300	102,76 <sup>ab</sup> ± 6,13	99,70 <sup>a</sup> ± 4,68
ACU	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	102,63 <sup>a</sup> ± 4,51	100,06 <sup>a</sup> ± 7,39
	200	102,72 <sup>a</sup> ± 3,04	98,73 <sup>a</sup> ± 8,33
	300	102,87 <sup>a</sup> ± 5,87	101,22 <sup>a</sup> ± 4,67
AF	0	100,00 <sup>b</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	87,01 <sup>c</sup> ± 3,38	97,64 <sup>a</sup> ± 2,88
	200	98,43 <sup>b</sup> ± 4,72	96,67 <sup>a</sup> ± 2,91
	300	105,93 <sup>a</sup> ± 5,69	89,89 <sup>b</sup> ± 7,40
ATC	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	96,63 <sup>a</sup> ± 4,15	95,23 <sup>b</sup> ± 1,59

	200	95,77 <sup>a</sup> ± 5,40	94,13 <sup>b</sup> ± 2,71
	300	89,10 <sup>b</sup> ± 4,70	95,59 <sup>b</sup> ± 4,47
<b>AR</b>	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	97,01 <sup>ab</sup> ± 3,12	101,79 <sup>a</sup> ± 5,65
	200	95,93 <sup>ab</sup> ± 2,50	106,91 <sup>a</sup> ± 3,11
	250	92,04 <sup>b</sup> ± 5,18	105,49 <sup>a</sup> ± 5,79
<b>Galantamina</b> <b>IC<sub>50</sub></b>	0,57 ± 0,05 <sup>128</sup>	74,23 ± 5,16 <sup>155</sup>	

AChE – acetilcolinesterase, BChE – butirilcolinesterase,  $\mu\text{M}$  – micromolar, % – percentagem,  $\sigma_m$  – erro padrão, IC<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% da enzima, ACA – ácido cafeico, AC – ácido clorogénico, ACU – ácido cumarínico, AF – ácido ferúlico, ATC – ácido *trans*-cinâmico, AR – ácido rosmarínico.

Da análise da atividade dos ácidos hidroxicinâmicos apresentados na tabela 5.2, destacam-se alguns compostos como o ACA, o AF, o ATC, o AR.

O ACA apresenta uma ligeira atividade inibitória da AChE a 300 $\mu\text{M}$ , cerca de 6,6% (93,40±6,01% de atividade) a esta concentração.

Num estudo realizado por Oboh *et al.*, 2012, os resultados foram significativamente distintos dos obtidos neste trabalho prático. Nesse mesmo estudo, o ACA revelou um IC<sub>50</sub> de 23,37 $\mu\text{M}$  para a AChE e de 31,08 $\mu\text{M}$  para a BChE, enquanto o AC apresentou um IC<sub>50</sub> de 22,61 $\mu\text{M}$  para a AChE e de 17,78  $\mu\text{M}$  para a BChE.<sup>35</sup> Noutro estudo realizado por Kwon *et al.*, 2010, o IC<sub>50</sub> obtido para a ação do AC sobre a AChE, foi de 277,07 $\mu\text{M}$ , um valor ainda assim elevado em comparação com o obtido no presente trabalho prático.<sup>156</sup> Segundo Hernandez *et al.*, 2010, o IC<sub>50</sub> determinado para o AC em relação à AChE foi de 553,19 $\mu\text{M}$ .<sup>128</sup> É possível verificar que apesar de ser utilizado o mesmo método base<sup>150</sup> nestes estudos, os resultados diferem significativamente, provavelmente, devido a alterações no método ou utilização de diferentes materiais ou condições experimentais.

O AF inibiu a AChE em 12,99% (87,01% de atividade) a baixas concentrações (100 $\mu\text{M}$ ), mas parece ter estimulado a atividade da enzima (105,93% de atividade) a concentrações mais elevadas. Dos ácidos hidroxicinâmicos, o AF foi o composto que apresenta uma maior inibição da BChE, correspondente a 89,89% de atividade enzimática para uma concentração de 300 $\mu\text{M}$ . O AF é dos compostos fenólicos mais abundantes, encontrando-se em plantas como o trigo (*Triticum aestivum*) e o eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Apesar da sua baixa atividade inibitória das ChEs, o AF tem sido utilizado na

síntese de híbridos Tacrina-Ácido ferúlico como ChEIs, devido à sua atividade antioxidante e hepatoprotetora.<sup>157</sup>

O ATC e o AR foram os ácidos hidroxicinâmicos com maior atividade inibitória da AChE, apesar de revelarem inibidores fracos. A inibição promovida por estes compostos não variou de forma significativa com o aumento da concentração, verificando-se apenas um ligeiro aumento da capacidade de inibição. O AR não inibiu a BChE, enquanto o ATC revelou uma ligeira inibição mesmo a 100µM, que se mantém a 200µM e a 300µM. Não foram encontrados, na literatura, resultados relativos à atividade inibitória deste composto sobre as ChEs.

**Tabela 5.3** - Efeito dos ácidos hidroxibenzoicos sobre a atividade enzimática da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

Atividade da AChE e BChE - Ácidos Hidroxibenzoicos			
Composto	Concentração (µM)	Atividade	
		AChE (%) ± σ <sub>m</sub> (%)	BChE (%) ± σ <sub>m</sub> (%)
AG	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	94,74 <sup>ab</sup> ± 8,67	91,23 <sup>b</sup> ± 2,17
	200	84,09 <sup>c</sup> ± 4,13	82,84 <sup>c</sup> ± 3,27
	300	86,90 <sup>bc</sup> ± 8,55	84,53 <sup>c</sup> ± 4,44
AGE	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	97,60 <sup>ab</sup> ± 6,52	61,83 <sup>b</sup> ± 7,68
	200	94,54 <sup>ab</sup> ± 5,30	59,67 <sup>b</sup> ± 6,83
	300	90,99 <sup>b</sup> ± 5,70	54,05 <sup>b</sup> ± 9,72
AMHB	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>c</sup> ± 0,00
	100	91,00 <sup>b</sup> ± 1,58	111,59 <sup>a</sup> ± 2,13
	200	90,77 <sup>b</sup> ± 2,65	104,41 <sup>b</sup> ± 4,31
	300	93,89 <sup>b</sup> ± 3,55	103,45 <sup>bc</sup> ± 2,25
APHB	0	100,00 <sup>b</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	110,61 <sup>a</sup> ± 5,18	105,81 <sup>a</sup> ± 5,72
	200	100,78 <sup>b</sup> ± 2,62	103,67 <sup>a</sup> ± 4,94
	300	92,60 <sup>c</sup> ± 3,57	99,38 <sup>a</sup> ± 11,57
AS	0	100,00 <sup>ab</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	101,68 <sup>a</sup> ± 1,02	100,75 <sup>a</sup> ± 5,43
	200	96,86 <sup>bc</sup> ± 4,16	98,23 <sup>a</sup> ± 4,59
	300	93,87 <sup>c</sup> ± 0,68	100,42 <sup>a</sup> ± 6,07
ASI	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	93,87 <sup>a</sup> ± 4,17	99,75 <sup>a</sup> ± 5,48
	200	96,63 <sup>ab</sup> ± 3,24	98,95 <sup>a</sup> ± 6,53

	300	98,34 <sup>a</sup> ± 2,02	96,02 <sup>a</sup> ± 4,82
AV	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	90,81 <sup>b</sup> ± 5,14	89,15 <sup>b</sup> ± 6,69
	200	92,32 <sup>b</sup> ± 4,10	72,78 <sup>c</sup> ± 5,10
	300	86,16 <sup>b</sup> ± 7,44	76,79 <sup>c</sup> ± 5,88
<b>Galantamina</b> <b>IC<sub>50</sub></b>		0,57 ± 0,05 <sup>128</sup>	74,23 ± 5,16 <sup>155</sup>

AChE – acetilcolinesterase, BChE – butirilcolinesterase,  $\mu\text{M}$  – micromolar, % - percentagem,  $\sigma_m$  – erro padrão, IC<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% da enzima, AG – ácido gálico, AGE – ácido gentísico, AMHB - ácido *m*-hidroxibenzóico, APHB - ácido *p*-hidroxibenzóico, AS – ácido salicílico, ASI – ácido siríngico, AV – ácido vanílico.

Dos ácidos hidroxibenzóicos representados na tabela 5.3, o AGE, o AG e o AV apresentaram a maior atividade inibitória sobre ambas as enzimas em estudo.

O AGE foi o composto deste grupo que demonstrou maior atividade inibitória da BChE, com ligeira atividade sobre a AChE. A inibição promovida por este composto sobre a BChE a 100 $\mu\text{M}$  foi de 38,17% (62,83±7,68% de atividade da enzima), um valor próximo dos 50% de inibição originados pela galantamina a 74,23  $\mu\text{M}$ .

A inibição verificada pelo AV é dependente da concentração utilizada. Obteve-se para uma concentração de 300 $\mu\text{M}$ , uma atividade da AChE e da BChE de 86,16±7,44% e 76,79±5,88%, correspondendo a aproximadamente a 13,84% e a 23,21% de inibição, respetivamente. O AG, na mesma concentração, apresentou uma atividade inibitória ligeiramente inferior ao AV, de 13,10% e de 15,47% para as mesmas enzimas, respetivamente. Destaca-se que ambos os compostos apresentam maior atividade inibitória para a BChE em detrimento da AChE.

O AMHB, APHB e o AS apresentaram, por sua vez, uma fraca inibição da AChE, sem efeito inibitório sobre a BChE. Numa concentração de 100 $\mu\text{M}$  de AMHB a atividade da enzima foi de 91,00%, ou seja, 9% de inibição, um valor bastante superior ao APHB e ao AS, para a mesma concentração.

Apesar de terem demonstrado alguma inibição das enzimas em estudo, nenhum dos ácidos hidroxibenzóicos revelou atividade semelhante ou superior à da galantamina, pelo que são considerados inibidores fracos. Não foram encontrados na literatura estudos relativos à avaliação da atividade inibitória destes compostos, não existindo, desta forma, meio de comparação.

**Tabela 5.4** - Efeito dos ácidos hidroxibenzóicos sobre a atividade enzimática da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

Atividade da AChE e BChE – Outros Compostos Fenólicos			
Composto	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Atividade	
		AChE (%) $\pm \sigma_m$ (%)	BChE (%) $\pm \sigma_m$ (%)
<b>4HBZ</b>	0	100,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,00	100,00 <sup>c</sup> $\pm$ 0,00
	100	103,11 <sup>ab</sup> $\pm$ 7,93	105,60 <sup>b</sup> $\pm$ 3,08
	200	108,00 <sup>a</sup> $\pm$ 3,32	102,56 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,19
	300	99,60 <sup>b</sup> $\pm$ 5,97	109,04 <sup>a</sup> $\pm$ 2,21
<b>BHT</b>	0	100,00 <sup>a</sup> $\pm$ 0,00	100,00 <sup>b</sup> $\pm$ 0,00
	50	102,51 <sup>a</sup> $\pm$ 8,52	108,91 <sup>a</sup> $\pm$ 2,17
	75	104,95 <sup>a</sup> $\pm$ 6,28	106,49 <sup>a</sup> $\pm$ 5,21
	100	106,88 <sup>a</sup> $\pm$ 2,85	107,85 <sup>a</sup> $\pm$ 3,43
<b>Galantamina</b> <b>IC<sub>50</sub></b>	74,23 $\pm$ 5,16	<sup>155</sup>	74,23 $\pm$ 5,16 <sup>155</sup>

AChE – acetilcolinesterase, BChE – butirilcolinesterase,  $\mu\text{M}$  – micromolar, % – percentagem,  $\sigma_m$  – erro padrão, IC<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% da enzima, 4HBZ – 4-Hidroxibenzaldeído, BHT – butil-hidroxitolueno.

Na tabela 5.4, apresentam-se os resultados relativos à atividade inibitória de outros compostos fenólicos que, segundo critérios estruturais, não se enquadravam nas classes de compostos fenólicos anteriormente referidas. O 4HBZ e o BHT não revelaram qualquer tipo de inibição enzimática, quer para a AChE, quer para a BChE.

Resumindo, dos compostos analisados, destacam-se como inibidores da AChE, a CH, a QC, a RU, o AG, o AV e o U. Como inibidores da BChE destacam-se a RU, o AF, o AG, o AGE, o OAC e o U.

Os fármacos disponíveis para o tratamento de patologias neurodegenerativas têm, geralmente uma grande atividade inibitória da AChE e escassa ou nenhuma atividade inibitória da BChE<sup>7,158</sup>. Neste contexto, a rivastigmina constitui uma exceção, pois apresenta uma boa capacidade inibitória de ambas as enzimas, sendo cada vez mais utilizada para o tratamento destas patologias.<sup>8,18</sup> Atendendo ao papel da BChE como enzima de suporte à hidrólise da ACh no cérebro, tem sido proposto que a inibição desta enzima conjuntamente com a inibição da AChE, possa ser uma mais-valia terapêutica na DA.<sup>36</sup>

Nesta perspetiva, dos compostos analisados, por inibirem tanto a AChE como a BChE, a RU e o AG assumem-se como compostos de possível interesse no desenvolvimento de alternativas terapêuticas de patologias em que se verifica défice da transmissão colinérgica.

Tendencialmente, os resultados de atividade inibitória obtidos foram, consideravelmente, inferiores aos descritos na literatura. Uma possível causa justificativa da discrepância dos resultados obtidos relaciona-se com o método utilizado, bem como as modificações aplicadas ao mesmo nos diversos estudos publicados.

Um artigo publicado por Dingova *et al.*, 2014 descreve o método de Ellman, utilizado neste trabalho prático e pela maior parte dos investigadores, como sendo rápido, económico e preciso. Apesar das vantagens apresentadas, os autores do artigo referem algumas das suas limitações como a fotossensibilidade do DTNB, a instabilidade da solução deste reagente ao longo do tempo, bem como a baixa sensibilidade de deteção do método (devido a concentrações reduzidas das ChEs ou pela adição de um forte inibidor).<sup>159</sup> Este último fator limitante não teve grande impacto na realização deste trabalho prático, uma vez que os compostos não apresentaram uma forte inibição enzimática. No entanto, as limitações relacionadas com o DTNB, como a sua instabilidade em solução e fotossensibilidade, poderão ter afetado os resultados obtidos.

Assim sendo, em futuras investigações neste âmbito, e de forma a obter resultados mais precisos e fiáveis, a atividade inibitória dos compostos fenólicos deve ser testada utilizando o DMSO como solvente e atendendo ao carácter fotossensível e instável do DTNB.

### 5.1.2.2 Atividade Inibitória dos Compostos Fenólicos sobre a TYRO

Nas tabelas 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8 apresentam-se os resultados obtidos para o efeito inibitório na atividade da TYRO dos compostos flavonóides, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e outros polifenóis, respetivamente. Os resultados obtidos para o controlo positivo, arbutin, encontram-se referenciados em todas as tabelas. Conforme apresentado nos resultados obtidos para as ChEs, os valores de atividade enzimática superiores a 100% resultam de possíveis erros, interferências ou do facto de alguns compostos poderem atuar como cofatores ou substratos das enzimas.

**Tabela 5.5** - Efeito dos flavonóides sobre a atividade enzimática da tirosinase.

Flavonóis		
Composto	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Atividade TYRO (%) $\pm \sigma_m$ (%)
	0	100,00 <sup>c</sup> $\pm$ 0,00

<b>CH</b>	100	115,55 <sup>b</sup> ± 3,17
	200	100,78 <sup>c</sup> ± 4,04
	300	174,10 <sup>a</sup> ± 7,32
<b>EC</b>	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	105,90 <sup>a</sup> ± 6,81
	200	75,44 <sup>b</sup> ± 3,22
<b>EG</b>	300	65,40 <sup>c</sup> ± 3,70
	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	97,79 <sup>a</sup> ± 7,62
<b>EGG</b>	200	76,66 <sup>b</sup> ± 8,63
	300	75,64 <sup>b</sup> ± 2,81
	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
<b>EGG</b>	100	85,55 <sup>b</sup> ± 3,43
	200	87,27 <sup>b</sup> ± 1,57
	300	49,84 <sup>c</sup> ± 11,03
	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
<b>QC</b>	50	103,73 <sup>a</sup> ± 6,80
	75	79,37 <sup>b</sup> ± 8,62
	100	73,11 <sup>b</sup> ± 1,78
	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
<b>R</b>	100	104,38 <sup>a</sup> ± 6,58
	200	83,11 <sup>b</sup> ± 2,67
	250	25,27 <sup>c</sup> ± 4,64
	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
<b>F</b>	Insolúvel (Não determinado)	
<b>A</b>	Insolúvel (Não determinado)	
<b>Arbutin</b>	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	101,33 <sup>a</sup> ± 2,86
	200	87,77 <sup>b</sup> ± 3,27
	300	76,43 <sup>c</sup> ± 3,41
<b>Arbutin</b> <b>IC<sub>50</sub></b>	7300µM <sup>160</sup> 8400µM <sup>161,162</sup>	

AChE – acetilcolinesterase, BChE – butirilcolinesterase, µM – micromolar, % – percentagem, σm – erro padrão, IC<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% da enzima, CH – hidrato de catequina, EC – epicatequina, EG – epigalocatequina, EGG – epigalocatequina galato, QC – quercetina, RU – rutina, FL – flavona, AP – apigenina.

Os compostos flavonóides analisados revelaram, à exceção da CH, uma boa atividade inibitória da enzima. O CH encontra-se descrito na literatura como sendo um cofator e um substrato da TYRO<sup>163</sup>, o que justifica o aumento da atividade da enzima verificado.



As catequinas, EC, EG, EGG demonstraram um perfil de inibição enzimática bastante semelhante. Atendendo ao seu efeito inibitório na concentração de 300µM, a EGG promoveu o menor valor de atividade da TYRO, 49,84±11,03%, seguida da EC e EG que originaram uma atividade de 65,40±3,70% e 75,64±2,81%, respetivamente. A inibição verificada por estas catequinas, à exceção da EG, foi superior à do arbutin, que para a mesma concentração resultou numa atividade enzimática de 76,43±3,41%. Num trabalho realizado por No *et al.*, 1999, a EGG também foi identificada como o composto com maior atividade inibitória, com um IC<sub>50</sub> de 34,10µM<sup>164</sup>, uma atividade inibitória bastante superior à determinada.

No caso da QC e da RU, estes compostos demonstraram uma atividade inibitória da TYRO superior à do arbutin. Para uma concentração de 100µM, a QC promoveu um decréscimo da atividade enzimática para 73,11±1,78%, enquanto a RU apenas apresentou inibição a concentrações superiores a 200µM. Devido à baixa solubilidade destes compostos, não foi possível determinar a sua atividade inibitória para as concentrações inicialmente previstas de 100, 200 e 300µM. Contudo e apesar desta condicionante, ambos os compostos revelaram uma atividade inibitória superior à do composto referência. Num estudo realizado por Kubo & Kinst-Hori, 1999, o IC<sub>50</sub> da QC obtido foi de 70µM, uma atividade inibitória superior à determinada, enquanto a RU, por sua vez, foi considerada como isenta de qualquer efeito inibitório sobre a TYRO.<sup>165</sup> O método utilizado por estes investigadores é semelhante ao utilizado neste trabalho prático, mas difere nos tempos de incubação, bem como nos solventes utilizados, o que pode em parte explicar as discrepâncias verificadas nos resultados obtidos.

**Tabela 5.6** - Efeito dos ácidos hidroxicinâmicos sobre a atividade enzimática da tirosinase.

Ácidos Hidroxicinâmicos		
Composto	Concentração (µM)	Atividade TYRO (%) ± DP (%)
ACA	0	100,00 <sup>d</sup> ± 0,00
	50	121,04 <sup>c</sup> ± 1,79
	100	132,40 <sup>b</sup> ± 2,01
	150	132,33 <sup>b</sup> ± 1,76
	200	129,39 <sup>b</sup> ± 6,47
	300	192,84 <sup>a</sup> ± 6,10
AC	0	100,00 <sup>d</sup> ± 0,00
	50	131,35 <sup>c</sup> ± 9,97

	100	131,45 <sup>c</sup> ± 9,49
	150	129,47 <sup>c</sup> ± 7,27
	200	165,74 <sup>a</sup> ± 5,32
	300	156,06 <sup>b</sup> ± 3,93
<b>ACU</b>	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	103,26 <sup>a</sup> ± 8,56
	200	104,64 <sup>a</sup> ± 5,97
	300	87,31 <sup>b</sup> ± 7,26
<b>AF</b>	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	103,24 <sup>a</sup> ± 3,76
	200	100,52 <sup>a</sup> ± 2,45
	300	99,66 <sup>a</sup> ± 3,13
<b>ATC</b>	0	100,00 <sup>ab</sup> ± 0,00
	100	106,50 <sup>a</sup> ± 4,03
	200	96,38 <sup>b</sup> ± 5,73
	300	87,76 <sup>c</sup> ± 7,81
<b>AR</b>	0	100,00 <sup>b</sup> ± 0,00
	100	110,37 <sup>a</sup> ± 6,58
	200	101,53 <sup>b</sup> ± 2,67
	250	89,97 <sup>c</sup> ± 4,64
<b>Arbutin</b>	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	101,33 <sup>a</sup> ± 2,86
	200	87,77 <sup>b</sup> ± 3,27
	300	76,43 <sup>c</sup> ± 3,41
<b>Arbutin</b>	7300µM <sup>160</sup>	
<b>IC<sub>50</sub></b>	8400µM <sup>161,162</sup>	

AChE – acetilcolinesterase, BChE – butirilcolinesterase, µM – micromolar, % - percentagem,  $\sigma_m$  – erro padrão, IC<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% da enzima, ACA – ácido cafeico, AC – ácido clorogénico, ACU – ácido cumarínico, AF – ácido ferúlico, ATC – ácido *trans*-cinâmico, AR – ácido rosmarínico.

Dos resultados obtidos para a atividade inibitória dos ácidos hidroxicinâmicos apresentados na tabela 5.6, pode verificar-se que nenhum composto demonstrou uma atividade superior ao arbutin. O ACU, o ATC e o AR promoveram uma fraca inibição da TYRO entre 10 e 13%, nas concentrações mais elevadas de 250 e 300µM, sem inibição relevante a concentrações mais baixas. Na literatura, o IC<sub>50</sub> do AR é de 1400µM, concentração bastante superior às analisadas neste estudo.<sup>166</sup>

O AF não apresentou atividade inibitória da enzima, enquanto o ACA e o AC, por sua vez, originaram um aumento da atividade enzimática. De forma a confirmar os resultados obtidos para o ACA e o AC, foi também determinada a atividade inibitória

destes compostos para as concentrações de 50 e 150µM. Os valores de atividade determinados para estas concentrações revelaram-se coerentes com os obtidos para as concentrações de 100, 200 e 300µM. À semelhança do CH, também o ACA e o AC têm sido descritos na literatura como sendo cofatores e substratos da TYRO (85), o que fundamenta o aumento de atividade da TYRO verificado.

**Tabela 5.7** - Efeito dos ácidos hidroxibenzóicos sobre a atividade enzimática da tirosinase.

Ácidos Hidroxibenzóicos		
Composto	Concentração (µM)	Atividade TYRO (%) ± σ <sub>m</sub> (%)
AG	0	100,00 <sup>b</sup> ± 0,00
	100	107,58 <sup>a</sup> ± 4,60
	200	104,11 <sup>ab</sup> ± 4,27
	300	99,66 <sup>b</sup> ± 3,13
AGE	0	100,00 <sup>ab</sup> ± 0,00
	100	103,55 <sup>a</sup> ± 2,43
	200	97,97 <sup>b</sup> ± 2,50
	300	92,20 <sup>c</sup> ± 5,91
AMHB	0	100,00 <sup>ab</sup> ± 0,00
	100	103,56 <sup>a</sup> ± 2,74
	200	96,93 <sup>bc</sup> ± 2,31
	300	94,64 <sup>c</sup> ± 3,48
APHB	0	100,00 <sup>b</sup> ± 0,00
	100	110,03 <sup>a</sup> ± 7,77
	200	96,36 <sup>b</sup> ± 2,56
	300	97,28 <sup>b</sup> ± 5,50
AS	0	100,00 <sup>b</sup> ± 0,00
	100	111,63 <sup>a</sup> ± 3,33
	200	100,06 <sup>b</sup> ± 3,44
	300	94,76 <sup>c</sup> ± 3,28
ASI	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	100	105,46 <sup>b</sup> ± 2,00
	200	103,18 <sup>ab</sup> ± 2,33
	300	103,04 <sup>ab</sup> ± 4,19
AV	0	100,00 <sup>b</sup> ± 0,00
	100	110,00 <sup>a</sup> ± 5,65
	200	97,19 <sup>b</sup> ± 2,23
	300	94,22 <sup>b</sup> ± 5,55
Arbutin	0	100,00 <sup>a</sup> ± 0,00

	100	101,33 <sup>a</sup> ± 2,86
	200	87,77 <sup>b</sup> ± 3,27
	300	76,43 <sup>c</sup> ± 3,41
<b>Arbutin</b>		7300µM <sup>160</sup>
<b>IC<sub>50</sub></b>		8400µM <sup>161,162</sup>

AChE – acetilcolinesterase, BChE – butirilcolinesterase, µM – micromolar, % - percentagem,  $\sigma_m$  – erro padrão, IC<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% da enzima, AG – ácido gálico, AGE – ácido gentísico, AMHB - ácido *m*-hidroxibenzóico, APHB - ácido *p*-hidroxibenzóico, AS – ácido salicílico, ASI – ácido siríngico, AV – ácido vanílico.

Os ácidos hidroxibenzóicos, à semelhança com os ácidos hidroxicinâmicos, não apresentaram uma relevante atividade inibitória da TYRO. Desta classe de compostos, destacaram-se o AGE, o AMHB, o AS e o AV. Estes quatro compostos exibiram perfis de inibição bastante semelhantes, sendo que para uma concentração de 300µM demonstraram uma inibição enzimática que variou de 5,88% a 7,80%, correspondente a 94,22±5,55% e 92,20±5,91% de atividade, respetivamente. Apesar da baixa atividade inibitória do AGE obtida, este composto tem sido utilizado como despigmentante, antioxidante e estimulador da renovação celular em produtos de cosmética.<sup>167</sup> Não existem, no entanto, estudos que refiram a atividade inibitória deste composto sobre a TYRO, pelo que o seu efeito despigmentante pode estar relacionado com outro mecanismo que não a inibição desta enzima.

O AS é vastamente utilizado em formulações cosméticas e terapêuticas, devido às suas propriedades queratolíticas. As principais indicações de formulações contendo AS são o tratamento do acne, da psoríase e do fotoenvelhecimento.<sup>168</sup> A atividade inibitória deste composto, bem como de alguns dos seus derivados foi determinada por Zhang *et al.*, 2006. Nesse estudo o AS apresentou uma inibição de 30% da atividade enzimática a 10,000µM e um IC<sub>50</sub> de 4,300µM.<sup>169</sup> Estes resultados suportam os dados obtidos neste trabalho prático, relativos a uma fraca inibição da enzima a 300µM. Atendendo às indicações terapêuticas de formulações contendo AS, seria uma mais-valia se este composto apresentasse uma forte inibição da TYRO, o que não se verificou.

O AG não inibiu a atividade da enzima em nenhuma das concentrações analisadas. O IC<sub>50</sub> deste composto foi determinada por Isao Kubo *et al.*, 2003, como sendo de 4500µM o que justifica o facto deste composto não demonstrar inibição da TYRO nas concentrações analisadas neste trabalho prático.

Não foram encontrados na literatura estudos referentes à atividade inibitória da TYRO ou da utilização do AV nem do AMHB em formulações despigmentantes, pelo que, não existe meio de comparação dos resultados obtidos.

Na tabela 5.8 encontram-se apresentados os resultados relativos ao efeito inibitório de outros compostos fenólicos.

**Tabela 5.8** - Efeito dos ácidos hidroxibenzoicos sobre a atividade enzimática da tirosinase.

Outros compostos fenólicos		
Composto	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Atividade TYRO (%) $\pm \sigma_m$ (%)
<b>4HBZ</b>	0	100,00 <sup>b</sup> $\pm$ 0,00
	100	107,04 <sup>a</sup> $\pm$ 6,57
	200	106,61 <sup>a</sup> $\pm$ 9,37
	300	91,97 <sup>b</sup> $\pm$ 2,14
<b>BHT</b>	0	100,00 <sup>c</sup> $\pm$ 0,00
	50	109,98 <sup>a</sup> $\pm$ 2,29
	75	107,21 <sup>a</sup> $\pm$ 1,58
	100	107,98 <sup>a</sup> $\pm$ 7,93
<b>Arbutin</b>	0	100,00 <sup>a</sup> $\pm$ 0,00
	100	101,33 <sup>a</sup> $\pm$ 2,86
	200	87,77 <sup>b</sup> $\pm$ 3,27
	300	76,43 <sup>c</sup> $\pm$ 3,41
<b>Arbutin</b>	7300 $\mu\text{M}$ <sup>160</sup>	
<b>IC<sub>50</sub></b>	8400 $\mu\text{M}$ <sup>161,162</sup>	

AChE – acetilcolinesterase, BChE – butirilcolinesterase,  $\mu\text{M}$  – micromolar, % – percentagem,  $\sigma_m$  – erro padrão, IC<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% da enzima, 4HBZ - 4-Hidroxibenzaldeído, BHT – butil-hidroxitolueno

O 4HBZ foi o composto que apresentou uma maior diminuição da atividade da TYRO, 91,97 $\pm$ 2,14%, para uma concentração de 300 $\mu\text{M}$ . Esta inibição é consideravelmente inferior à promovida pelo arbutin, o composto de referência. Num estudo realizado por Yi *et al.*, 2010, foi analisada a atividade inibitória do 4HBZ e de alguns dos seus derivados sintéticos. O IC<sub>50</sub> do 4HBZ obtido nesse estudo foi de 1.220 $\mu\text{M}$ <sup>170</sup>, que está de acordo com a reduzida inibição originada nas baixas concentrações utilizadas neste trabalho prático.

O BHT, composto bastante utilizado devido às suas propriedades antioxidantes, não demonstrou atividade inibitória da TYRO a nenhuma das concentrações analisadas.

Este facto corrobora os resultados obtidos por Weerapreeyakul *et al.*, 2012<sup>171</sup>, que determinaram o IC<sub>50</sub> como sendo de  $1.682,3 \pm 94\mu\text{M}$ <sup>171</sup>, uma concentração bastante superiores à analisada no presente trabalho prático.

Apesar de existirem na literatura algumas referências relativas à atividade inibitória dos compostos analisados, estes estudos diferem nas condições da realização da análise, na concentração dos substratos, nos tempos de incubação, bem como no tipo de TYRO utilizado. Num artigo de revisão elaborado por Chang *et al.*, 2009, é sugerida a utilização do ácido kójico como composto de referência, assim como a apresentação dos resultados da atividade inibitória dos compostos em função desse composto, minimizando, dessa forma, a influência das condições de realização do ensaio.<sup>6</sup> Nesta investigação utilizou-se o arbutin em detrimento do ácido kójico por questões económicas.

Em suma, como compostos inibidores da TYRO, com melhor atividade de inibição enzimática comparativamente com o composto referência, destacam-se os EC, EG, EGG, QC e RU. De referir que todos estes compostos pertencem ao grupo dos flavonóides, pelo que a sua estrutura química pode estar associada à atividade inibitória verificada. Dos compostos mencionados, a QC foi o composto que promoveu maior inibição da atividade da TYRO a 100 $\mu\text{M}$ , enquanto a RU fê-lo a 300 $\mu\text{M}$ .

A hidroquinona é o despigmentante de referência no tratamento de patologias dermatológicas caracterizadas por hiperpigmentação. No entanto, devido à sua elevada toxicidade e incidência de efeitos adversos, a sua utilização foi restringida. Atualmente a sua dispensa só pode ser efetuada mediante receita médica.<sup>14,74,80</sup> O arbutin, um glicósido natural da hidroquinona, apresenta uma menor eficácia, mas também uma menor toxicidade, pelo que tem sido utilizado como despigmentante em formulações cosméticas.<sup>71</sup>

O facto de alguns compostos analisados neste estudo apresentarem *in vitro* uma atividade superior ao arbutin constitui um bom indicador da sua possível utilização como agentes despigmentantes. No entanto, não foram realizados estudos de toxicidade nem de eficácia de penetração cutânea, pelo que não se pode concluir, que estes compostos constituam uma mais-valia à utilização do arbutin.<sup>172</sup> Os inibidores da TYRO aqui identificados podem, também, ter interesse para a indústria alimentar como agentes inibidores do escurecimento dos alimentos.<sup>173</sup>

Os compostos que apresentaram maior atividade inibitória da TYRO, EC, EG, EGG e RU, também se encontram na literatura como sendo detentores de atividade

antioxidante.<sup>174,175</sup> O benefício da sua utilização dever-se-ia à inibição das duas vias oxidativas que promovem o escurecimento enzimático.<sup>173</sup>

Em relação à utilização destes compostos no tratamento da DP, e dos inibidores da TYRO em geral, pouca informação se encontra disponível, além da controvérsia associada.<sup>21,72</sup> Até à data, nenhum inibidor da TYRO foi proposto como terapêutica ou adjuvante à terapêutica no tratamento desta patologia.<sup>176</sup>

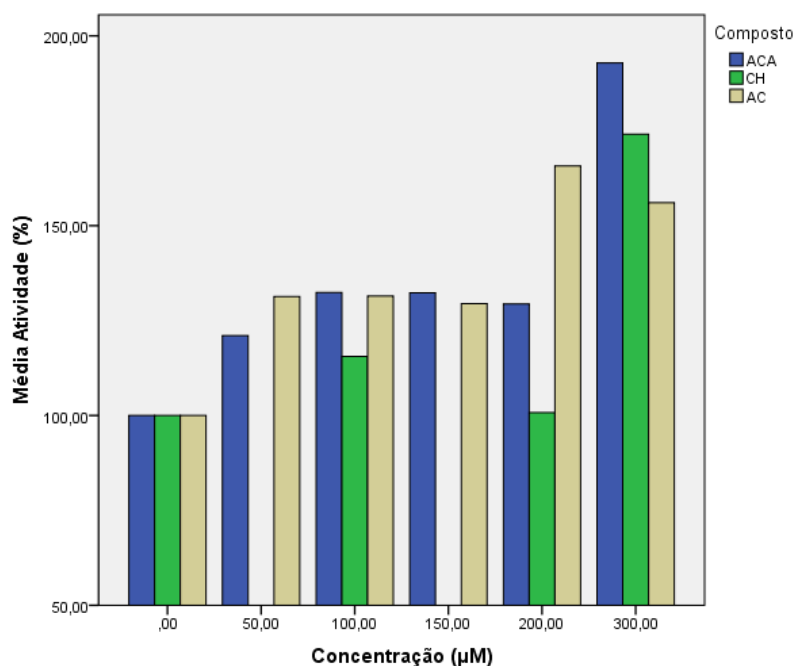
Estudos epidemiológicos realizados em humanos demonstraram que a ingestão de chá verde e chá preto enriquecidos com catequinas (ex: E, EG, EGG) pode diminuir o envelhecimento cerebral, bem como o desenvolvimento de demência. Este estudo revelou que este efeito neuroprotetor não se deve apenas aos seus efeitos antioxidantes e sequestrador de iões nocivos, mas também aos efeitos que promovem na regulação da neurotransmissão e metabolismo intracelular, da apoptose e da função mitocondrial.<sup>174</sup> Os resultados obtidos no presente trabalho prático adicionam ao leque de efeitos benéficos destes compostos, a sua atividade inibitória da TYRO, enzima possivelmente envolvida na neurodegeneração.<sup>21</sup>

A RU demonstrou uma boa inibição da TYRO e uma inibição considerável das ChEs. Este composto apresenta baixa solubilidade em água, pelo que concentrações superiores a 250µM não foram analisadas. Tendo em consideração a atividade deste compostos, é de extrema importância repetir este trabalho prático com um solvente adequado, principalmente, pelo facto de não existirem valores descritos na literatura do efeito inibitório deste composto sobre a BChE e a TYRO.

A RU foi isolada de diversas plantas do género *Hypericum*<sup>128</sup>, da espécie *Juniperus sibirica* Burgsdorf<sup>177</sup>, *Fagopyrum esculentum* Moench<sup>178</sup>. Este composto tem sido bastante estudado devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Num estudo publicado por Khan *et al.* 2012, foi induzida DP em ratinhos e avaliados os benefícios da ingestão de RU, verificou-se que o consumo deste composto pode ter um efeito preventivo do desenvolvimento de patologias neurodegenerativas.<sup>175</sup> Os resultados obtidos no presente trabalho prático, relativos ao efeito inibitório da RU na atividade da AChE, BChE e TYRO, reforçam e complementam os resultados obtidos em estudos anteriores, elevando a RU a um dos compostos fenólicos de maior interesse na procura de novos fármacos para o tratamento de patologias neurodegenerativas.

Após a exposição solar, verifica-se aumento da atividade da TYRO, que promove um aumento da produção da melanina, responsável pelo efeito bronzeado.<sup>75</sup> Teoricamente, a aplicação tópica de compostos que estimulem a atividade da TYRO,

poderia constituir-se uma abordagem ao desenvolvimento de formulações que visam estimular o bronzeado cutâneo. Neste contexto, torna-se importante a identificação de compostos que atuem como cofatores da enzima. No gráfico 5.1, apresentam-se os compostos analisados neste trabalho prático que incitaram um aumento da atividade da TYRO.



**Gráfico 5.1** -. Estimulação da atividade enzimática da tirosinase pelo ácido cafeico (ACA), ácido clorogénico (AC) e hidrato de catequina (CH).

Da análise do gráfico 5.1, o AC e o ACA estimularam a atividade enzimática de forma semelhante a concentrações inferiores a 300µM. Por outro lado, a CH apresentou uma indução da atividade enzimática inferior.

Na concentração de 300µM, o ACA promoveu a atividade máxima desta enzima, seguindo-se por ordem decrescente a CH e o AC.

Este aumento da atividade da TYRO pode dever-se ao facto dos compostos se comportarem como cofatores ou substratos da enzima. No método experimental utilizado, a atividade enzimática é determinada em função do dopacromo formado a partir da L-Tirosina, assim sendo, o mais provável é que estes compostos atuem como cofatores. No entanto, não se pode excluir, a possibilidade destes compostos poderem sofrer oxidação por parte da TYRO. Neste caso particular poderia originar-se um composto que absorva no mesmo comprimento de onda que o dopacromo, 492 nm, constituindo-se uma interferência ao método utilizado.



Na literatura, é referido que a CH, o ACA e o AC atuam tanto como cofatores como substratos da TYRO,<sup>163</sup> no entanto, não existem estudos que quantifiquem o aumento de atividade promovido por estes compostos.

O ACA encontra-se presente numa grande variedade de plantas (principalmente nas sementes e folhas) e alimentos, como por exemplo nas azeitonas. Aplicado topicamente, este composto diminui o eritema provocado aquando da exposição à radiação-UV. Este efeito fotoprotetor relaciona-se com a sua atividade antioxidante e sequestradora de iões nocivos.<sup>75</sup> Neste trabalho prático, o ACA foi dos compostos que promoveu um maior aumento da atividade da TYRO. Este composto poderá apresentar benefícios quando incorporado em formulações autobronzeadoras com fotoproteção.

Em suma, identificou-se nesta investigação alguns compostos com atividade inibitória da AChE, BChE e TYRO. Foram também apresentados os possíveis benefícios da utilização dos mesmos em formulações terapêuticas, e no caso particular da TYRO, em formulações cosméticas ou como aditivos alimentares. Contudo, e mesmo após a demonstração da atividade inibitória originada pelos compostos analisados, é ainda necessário realizar mais estudos que demonstrem a eficácia e segurança dos mesmos, quer *in vitro* quer *in vivo*.<sup>20</sup> Somente assim, se poderá inferir relativamente ao seu risco-benefício, comparativamente, com as alternativas terapêuticas atualmente disponíveis.

## Capítulo 6

## 6.1 Conclusões e Perspetivas

Na presente dissertação procedeu-se à avaliação do efeito inibitório de 23 compostos fenólicos sobre a atividade enzimática da AChE, da BChE e da TYRO, com o objetivo de identificar compostos com atividade inibitória sobre estas enzimas.

Dos compostos analisados, destacam-se como inibidores moderados a fortes da TYRO, as catequinas, como a EGG, a EG e a EC, que para uma concentração de 300 $\mu$ M reduziram a atividade enzimática para 49,84 $\pm$ 11,03%, 65,40 $\pm$ 3,70% e 75,64 $\pm$ 2,81%, respetivamente. A inibição induzida pela aplicação destas catequinas foi superior à originada pelo composto de referência, o arbutin. A RU, de todos os compostos, foi o que demonstrou uma maior diminuição da atividade de todas as enzimas em estudo. Este composto, para uma concentração de 250 $\mu$ M, reduziu a atividade enzimática da AChE para 68,47 $\pm$ 3,03%, da BChE para 83,29 $\pm$ 8,91% e da TYRO para 25,27 $\pm$ 4,64%.

Apesar de relevantes e promissores, os resultados obtidos são limitativos pois remetem-se apenas para uma análise *in vitro*, sem considerar os processos metabólicos a que estes compostos estão sujeitos quando ingeridos na alimentação, quer ao longo do trato gastrointestinal, quer no fígado, por exemplo.

No caso concreto dos ChEIs, apesar da diversidade de compostos descritos na literatura como detentores de uma grande atividade inibitória das ChEs *in vitro* e *in vivo*, são ainda necessários estudos que procedam à avaliação da atividade das ChEs no cérebro após administração destes compostos fenólicos. Estudos epidemiológicos que considerem a ingestão diária de compostos fenólicos e o desenvolvimento de patologias neurodegenerativas, constituem, também, uma possível abordagem à determinação do efeito neuroprotetor destes compostos.

Por outro lado, relativamente aos inibidores da atividade da TYRO, a sua utilização em patologias como a DP é uma temática bastante controversa. Desta forma, não se prevê, pelo menos num futuro próximo, a administração de compostos fenólicos com esta indicação, sem o desenvolvimento de mais estudos que estabeleçam uma relação direta entre esta enzima e o desenvolvimento da patologia.

O facto de alguns compostos analisados, no trabalho experimental, apresentarem *in vitro* uma atividade superior ao arbutin é um bom indicador da sua possível utilização enquanto agentes despigmentantes. No entanto, não foram realizados estudos de toxicidade ou de penetração cutâneas, pelo que apenas se pode especular relativamente à

sua mais-valia em detrimento do arbutin, sendo necessários estudos posteriores que abordem estes aspetos.

Foram, também, identificados compostos que parecem promover um aumento da atividade enzimática da TYRO, que se poderá relacionar com um aumento da produção da melanina, como o ACA, o AC e a QC. Estes compostos poderão apresentar benefícios quando incorporados em formulações bronzeadoras com fotoproteção.

Em suma, os compostos fenólicos constituem-se como uma possível alternativa terapêutica de certas patologias neurodegenerativas, patologias do foro dermatológico como a hiperpigmentação, ou ainda como aditivos na indústria alimentar.

## 6.2 Referências Bibliográficas

1. Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat.* 2011;10(2):128–34. doi:10.1002/pst.426.
2. Page C, Vigoureux P. *The international system of units (SI)*.; 1974. Available at: [http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=x2tgu9uYDR4C&oi=fnd&pg=PA1&dq=The+International+System+of+Units+\(+SI+\)&ots=Ji4\\_Xt8t7W&sig=ABK8dW5D0GXPoCL-N-fly6jhT8](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=x2tgu9uYDR4C&oi=fnd&pg=PA1&dq=The+International+System+of+Units+(+SI+)&ots=Ji4_Xt8t7W&sig=ABK8dW5D0GXPoCL-N-fly6jhT8). Accessed August 20, 2014.
3. Bhullar K, Rupasinghe H. Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:891748. doi:10.1155/2013/891748.
4. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 2004;74(17):2157–84. doi:10.1016/j.lfs.2003.09.047.
5. Roseiro L, Rauter A, Serralheiro M. Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease. *Nutr Aging.* 2012;1:99–111. doi:10.3233/NUA-2012-0006.
6. Chang T-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2009;10(6):2440–75. doi:10.3390/ijms10062440.
7. Singh M, Kaur M, Kukreja H, Chugh R, Silakari O, Singh D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. *Eur J Med Chem.* 2013;70:165–88. doi:10.1016/j.ejmech.2013.09.050.
8. Alzheimer's Disease International. *World Alzheimer Report 2013 Journey of Caring: An analysis of long-term care for dementia.*; 2013.
9. Laine C. Dementia. *Ann Intern Med.* 2008;148(7):pp ITC–4. doi:<http://dx.doi.org/10.7326>.

10. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011;377(9770):1019–1031. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673610613499>. Accessed September 29, 2013.
11. Duthey BB, Ph D. Priority Medicines for Europe and the World “ A Public Health Approach to Innovation ” Update on 2004 Background Paper Written by Saloni Tanna Background Paper 6 . 11 Alzheimer Disease and other Dementias. 2013;(February).
12. Association A. FDA-Approved Treatment for Alzheimer's. *Vasa*. 2013. Available at: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>. Accessed March 25, 2014.
13. Ali R, Ahmed I, Jabir NR, Kamal MA. Comparative Review of Decade ' s Research on Cholinesterase Inhibition. 2012;4(2):1–8. doi:10.1166/ajnn.2012.1051.
14. Infarmed. Informação sobre medicamentos do INFARMED. 2014. Available at: [www.infarmed.pt/infomed/inicio.php](http://www.infarmed.pt/infomed/inicio.php). Accessed August 15, 2014.
15. Lane RM, Potkin SG, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. 2006:101–124. doi:10.1017/S1461145705005833.
16. Karakaya T, Fußer F, Schröder J, Pantel J. Pharmacological Treatment of Mild Cognitive Impairment as a Prodromal Syndrome of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(1):102–8. doi:10.2174/157015913804999487.
17. Williams P, Sorribas A, Howes M-JR. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Nat Prod Rep*. 2011;28(1):48–77. doi:10.1039/c0np00027b.
18. Nordberg A, Ballard C. A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Prim Care* .... 2013. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3733526/>. Accessed March 18, 2014.
19. IUBMB. EC 1.14.18.1. *IUBMB Enzym Nomencl*. 2012. Available at: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/14/18/1.html>. Accessed July 24, 2014.
20. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F. Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2012;11(4):378–398. doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00191.x.
21. Hasegawa T. Tyrosinase-expressing neuronal cell line as in vitro model of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 2010;11(3):1082–9. doi:10.3390/ijms11031082.

22. Greggio E, Bergantino E, Carter D, et al. Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2005;93(1):246–256. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03019.x.
23. Webb M, Dixon C. E. *Enzymes 3rd (edn.)*. 3rd ed. (Longman Group Ltd, ed.). London; 1979.
24. Herz F, Kaplan E. A review: human erythrocyte acetylcholinesterase. *Pediatr Res*. 1973;7(4):204–14. doi:10.1203/00006450-197304000-00024.
25. Legay C. Why so many forms of acetylcholinesterase? *Microsc Res Tech*. 2000;49(1):56–72. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(20000401)49:1<56::AID-JEMT7>3.0.CO;2-R.
26. UniProtKB/Swiss-Prot. P22303 (ACES\_HUMAN). 2014. Available at: [http://www.uniprot.org/uniprot/P22303#section\\_general](http://www.uniprot.org/uniprot/P22303#section_general). Accessed February 4, 2014.
27. Getman DK, Eubanks JH, Camp S, Evans G a, Taylor P. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet*. 1992;51(1):170–7.
28. Chatel JM, Vallette FM, Massoulié J, Grassi J. A conformation-dependent monoclonal antibody against active chicken acetylcholinesterase. *FEBS Lett*. 1993;319(1-2):12–5.
29. Paoletti F, Mocali A, Vannucchi a M. Acetylcholinesterase in murine erythroleukemia (Friend) cells: evidence for megakaryocyte-like expression and potential growth-regulatory role of enzyme activity. *Blood*. 1992;79(11):2873–9.
30. Department of Bioinformatics&Biochemistry TU Braunschweig. EC 3.1.1.8 - cholinesterase. *BRENDA - Compr Enzym Inf Syst*. 2014. Available at: [http://www.brenda-enzymes.org/php/result\\_flat.php4?ecno=3.1.1.8](http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.1.1.8). Accessed May 22, 2012.
31. Macdonald IR, Martin E, Rosenberry TL, Darvesh S. Probing the peripheral site of human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*. 2012;51(36):7046–53. doi:10.1021/bi300955k.
32. Campiani G, Fattorusso C, Butini S, et al. Development of molecular probes for the identification of extra interaction sites in the mid-gorge and peripheral sites of butyrylcholinesterase (BuChE). Rational design of novel, selective, and highly potent BuChE inhibitors. *J Med Chem*. 2005;48(6):1919–29. doi:10.1021/jm049510k.
33. Tripathi A, Srivastava U. Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system. *Ann Neurosci*. 2010;15(4):106–111. doi:10.5214/95.
34. Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:294–302. doi:10.1038/35067589.

35. Oboh G, Agunloye OM, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO, Adefegha S a. 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. *Neurochem Res.* 2013;38(2):413–9. doi:10.1007/s11064-012-0935-6.
36. Skrzypek A, Matysiak J, Niewiadomy A, Bajda M, Szymański P. Synthesis and biological evaluation of 1,3,4-thiadiazole analogues as novel AChE and BuChE inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2013;62:311–9. doi:10.1016/j.ejmech.2012.12.060.
37. Katzung BG, Masters S, Trevor A. *Basic & Clinical Pharmacology*. 12th ed. (Bertram G. Katzung, MD P, Susan B. Masters P, Anthony J. Trevor P, eds.); 2012:83–86.
38. Klinkenberg I, Sambeth A, Blokland A. Acetylcholine and attention. *Behav Brain Res.* 2011;221(2):430–42. doi:10.1016/j.bbr.2010.11.033.
39. Appiah-Ankam J, Hunter J. Pharmacology of neuromuscular blocking drugs. ... *Educ Anaesthesia, Crit Care Pain.* 2004;4(1):2–7. doi:10.1093/bjaceaccp/mkh002.
40. Nair VP. Anticholinesterases and anticholinergic drugs. *Contin Educ Anaesthesia, Crit Care Pain.* 2004;4(5):164–168. doi:10.1093/bjaceaccp/mkh045.
41. Foye W, Lemke T, Williams D. *Foye's principles of medicinal chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins; 2008:1521. Available at: <http://books.google.pt/books?id=Sd6ot9ul-bUC>. Accessed May 21, 2014.
42. Hexum TD. Cholinergic Transmission. *Lect Auton Cardiovasc Pharmacol Neuropharmacol.* 2006. Available at: <http://app1.unmc.edu/hexum/ans/section2/body2.asp>. Accessed February 5, 2014.
43. Shaffermansb A, Kronmans C, Flashners Y, et al. Mutagenesis of Human Acetylcholinesterase. *J Biol Chem.* 1992;267(25):17640–17648.
44. Kassa J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2002;40(6):803–16.
45. INFARMED. *Resumo das características do medicamento: Galantamina Inventis.*; 2008.
46. INFARMED. *Resumo das Características do Medicamento: Rivastigmina Ciclum.* 2011.
47. Foster P, Buhrmann R. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol.* 2002;86:238–242. Available at: <http://bjo.bmj.com/content/86/2/238.short>. Accessed August 21, 2014.

48. Vernino S, Cheshire W, Va L. Myasthenia gravis with autoimmune autonomic neuropathy. *Aut Neurosci.* 2001;88(3):187–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11474561>.
49. Shah AK, Goldenberg WD. Myasthenia Gravis Medication. *Medscape.* 2014. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/1171206-medication#2>. Accessed July 27, 2014.
50. Cardoso F, Teixeira A. Dementia with Lewy bodies : clinical and therapeutic management. *Rev Neurociências.* 2005;2005(13-1):28–33.
51. Lalli S, Albanese A. Rivastigmine in Parkinson’s disease dementia. *Expert Rev Neurother.* 2008. doi:doi: 10.1586/14737175.8.8.1181.
52. *Demencia: A Public Health Priority.*; 2012:112. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75263/1/9789241564458\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75263/1/9789241564458_eng.pdf). Accessed October 6, 2013.
53. Hoyert DL, Xu J. Deaths : Preliminary Data for 2011. *Natl Vital Stat Reports.* 2012;61(6).
54. Alzheimer Portugal. Plano Nacional para as Demências. *Doença de Alzheimer.* 2014. Available at: <http://alzheimerportugal.org/pt/plano-nacional-para-as-demencias>. Accessed August 15, 2014.
55. Sereniki A, Vital M. Alzheimer’s disease : pathophysiological and pharmacological features. *Rev Psiquiatr RS.* 2008;(30).
56. Hegde M, Hegde P, Rao K, Mitra S. Oxidative genome damage and its repair in neurodegenerative diseases: function of transition metals as a double-edged sword. *J Alzheimer’s Dis.* 2011;24(0 2):183–198. doi:10.3233/JAD-2011-110281.Oxidative.
57. Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer’s disease. *Indian J Psychiatry.* 2009;51(1):55–61.
58. Ciro A, Park J, Burkhard G. Biochemical differentiation of cholinesterases from normal and Alzheimer’s disease cortex. *Curr Alzheimer Res.* 2012;9(1):138–143.
59. Aarsland D, Ballard C, Rongve a, Broadstock M, Svenningsson P. Clinical trials of dementia with Lewy bodies and Parkinson’s disease dementia. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2012;12(5):492–501. doi:10.1007/s11910-012-0290-7.
60. Kiaei M. New Hopes and Challenges for Treatment of Neurodegenerative Disorders: Great Opportunities for Young Neuroscientists. *Basic Clin Neurosci.* 2013;4(1):3–4.
61. Karakaya T, Fußer F, Prvulovic D, Hampel H. Treatment options for tauopathies. *Curr Treat Options Neurol.* 2012;14(2):126–36. doi:10.1007/s11940-012-0168-7.



62. Whitaker JR, Ramı EC, Virador VM. Polyphenol Oxidase. In: *Handbook of Food Enzymology*. Vol 2.; 2003. doi:10.1201/9780203910450.ch39.
63. M. Punta, P.C. Coghill RYE et al. Family: Tyrosinase (PF00264). *Pfam protein Fam database*. Available at: <http://pfam.xfam.org/family/Tyrosinase>. Accessed November 24, 2013.
64. Genetics Home Reference. TYR - tyrosinase. 2013. Available at: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TYR>. Accessed November 24, 2013.
65. Jaenicke E, Decker H. Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochem J*. 2003;371(Pt 2):515–23. doi:10.1042/BJ20021058.
66. Jiménez M, Kameyama K, Maloy WL, Tomita Y, Hearing VJ. Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(11):3830–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=280313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
67. Land EJ, Ramsden C a, Riley P a. Tyrosinase autoactivation and the chemistry of ortho-quinone amines. *Acc Chem Res*. 2003;36(5):300–8. doi:10.1021/ar020062p.
68. Ramsden C a, Stratford MRL, Riley P a. The influence of catechol structure on the suicide-inactivation of tyrosinase. *Org Biomol Chem*. 2009;7(17):3388–90. doi:10.1039/b910500j.
69. Solano F. Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. *New J Sci*. 2014;2014:1–28. doi:10.1155/2014/498276.
70. Ando H, Kondoh H, Ichihashi M, Hearing VJ. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *J Invest Dermatol*. 2007;127(4):751–61. doi:10.1038/sj.jid.5700683.
71. Kim Y-J, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(15):1707–23. doi:10.1007/s00018-005-5054-y.
72. Fedorow H, Tribl F, Halliday G, Gerlach M, Riederer P, Double KL. Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson’s disease. *Prog Neurobiol*. 2005;75(2):109–24. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.02.001.
73. Sigma Aldrich. L-Tyrosine. *Prod Details*. 2014. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=PT&language=pt&productNumber=T3754&brand=SIAL&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fisial%2Ft3754%3Flang%3Dpt>. Accessed August 15, 2014.

74. Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res.* 2006;19(6):550–71. doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00334.x.
75. Kullavanijaya P, Lim HW. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52(6):937–58; quiz 959–62. doi:10.1016/j.jaad.2004.07.063.
76. Kobayashi T, Vieira WD, Potterf B, Sakai C, Imokawa G, Hearing VJ. Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *J Cell Sci.* 1995;108 ( Pt 6:2301–9.
77. Parvez S, Kang M, Chung H, Bae H. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phyther Res.* 2007;816(March):805–816. doi:10.1002/ptr.
78. Miyazawa M, Tamura N. Inhibitory compound of tyrosinase activity from the sprout of Polygonum hydropiper L.(Benitade). *Biol Pharm Bull.* 2007;30(3):595–7.
79. Briganti S, Camera E, Picardo M. Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. *Pigment CELL RES.* 2003;16(101-111):101–110.
80. INFARMED. Hidrospot 40 mg/mL gel. 2011.
81. INFARMED. *Pigmentasa 40mg/g creme.*; 2010.
82. Huh SY, Shin J-W, Na J-I, Huh C-H, Youn S-W, Park K-C. The Efficacy and Safety of 4-n-butylresorcinol 0.1% Cream for the Treatment of Melasma: A Randomized Controlled Split-face Trial. *Ann Dermatol.* 2010;22(1):21–5. doi:10.5021/ad.2010.22.1.21.
83. Nakagawa M, Kawai K. Contact allergy to kojic acid in skin care products. *Contact Dermatitis.* 1995;32(1):9–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7720390>.
84. Abbasi NA, Akhtar A, Hussain A, Ali I. Effect of anti-browning agents on quality changes of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindley] fruit after harvest. *Pakistan J Bot.* 2013;45(4):1391–1396.
85. Sarkar R, Arora P, Garg KV. Cosmeceuticals for hyperpigmentation: What is available? *J Cutan Aesthet Surg.* 2013;6:4–11.
86. The DermNet New Zealand Trust. Brown spots and freckles. *DermNet.* 2014. Available at: <http://dermnetnz.org/lesions/freckles.html>. Accessed August 16, 2014.
87. Logical Images Inc. Solar Lentigo. *Skinsight.* 2008. Available at: <http://www.skindsight.com/adult/solarLentigo.htm>. Accessed August 16, 2014.

88. Eastern J, Aractingi S, Hexsel DM, Miyachi Y. Melasma: An update on laser and tranexamic acid treatment. *DermQuest*. 2014. Available at: <https://www.dermquest.com/expert-opinions/clinical-updates/2013/melasma/>. Accessed August 16, 2014.
89. Liu J, Wu F, Chen L, et al. Biological evaluation of coumarin derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors. *Food Chem*. 2012;135(4):2872–8. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.055.
90. Gupta AK, Gover MD, Nouri K, Taylor S. The treatment of melasma: a review of clinical trials. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(6):1048–65. doi:10.1016/j.jaad.2006.02.009.
91. Carli P, Salvini C. Lentigines Including Lentigo Simplex, Reticulated Lentigo and Actinic Lentigo. *Color Atlas Melanocytic Lesions Ski*. 2007.
92. Coelho R, Manuel M, Isabel V, Esmeralda V, Olívia B. Síndrome de Laugier–Hunzinger. *Trab da Soc Port Dermatologia e Venerol*. 2009;67(1).
93. Norris EH, Giasson BI, Hodara R, et al. Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. *J Biol Chem*. 2005;280(22):21212–9. doi:10.1074/jbc.M412621200.
94. LS F. Neuropathology of Parkinson’s disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55(3):259–72.
95. JM F, D. B. On the nature of the pigment granules in the cells of the locus coeruleus and substantia nigra. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1958;17(4):586–98.
96. Smythies J, Galzigna L. The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1380(2):159–62.
97. Gimenez E, Lavado A, Giraldo P, Montoliu L. Tyrosinase gene expression is not detected in mouse brain outside the retinal pigment epithelium cells. *Eur J Neurosci*. 2003;18(9):2673–2676. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02992.x.
98. Huang W-Y, Cai Y-Z, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer*. 2010;62(1):1–20. doi:10.1080/01635580903191585.
99. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*. 2003;23(4):519–34. doi:10.1002/med.10033.
100. Han X, Shen T, Lou H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int J Mol Sci*. 2007;8:950–988.
101. Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev*. 2007;7(2):301–311. doi:10.1007/s11101-007-9077-x.

102. Surveswaran S, Cai Y, Corke H, Sun M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.* 2007;102(3):938–953. doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.033.
103. Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MPM. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev.* 2006;26(6):747–66. doi:10.1002/med.20060.
104. Cai Y-Z, Mei Sun, Jie Xing, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 2006;78(25):2872–88. doi:10.1016/j.lfs.2005.11.004.
105. Scho P, Mbugua DM, Pell AN. Analysis of condensed tannins : a review. *Anim Feed Sci Technol.* 2001;91:21–40.
106. Cai Y, Sun M, Corke H. Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae. *J Agric Food Chem.* 2003;51(8):2288–94. doi:10.1021/jf030045u.
107. International Association for Plant Taxonomy. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). *Int Assoc Plant Taxon.* 2012. Available at: [http://www.iapt-taxon.org/index\\_layer.php](http://www.iapt-taxon.org/index_layer.php). Accessed August 17, 2014.
108. Landete JM. Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Res Int.* 2012;46(1):410–424. doi:10.1016/j.foodres.2011.12.023.
109. Milder IEJ, Feskens EJM, Arts ICW, Mesquita HBB De, Hollman PCH, Kromhout D. Intake of the Plant Lignans Secoisolariciresinol , Matairesinol , Lariciresinol , and Pinoresinol in Dutch Men and Women. *Nutr Epidemiol.* 2005;135(5):1202–1207.
110. Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N. Phytoestrogen Content of Foods Consumed in Canada , Including Isoflavones , Lignans , and Coumestan. *Nutr Cancer.* 2006;54(2):184–201.
111. El-Najjar N, Gali-Muhtasib H, Ketola R a., Vuorela P, Urtti A, Vuorela H. The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. *Phytochem Rev.* 2011;10(3):353–370. doi:10.1007/s11101-011-9209-1.
112. Vermerris W, Nicholson R. Families of Phenolic Compounds and Means of Classification. In: Vermerris W, Nicholson R, eds. *Phenolic Compound Biochemistry.* Springer Netherlands; 2006:1–34. doi:10.1007/978-1-4020-5164-7\_1.
113. Han BINS, Ai YIZC, Un MEIS, Orke HAC. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journol Agric food Chem.* 2005;53:7749–7759.

114. Vermerris W, Nicholson R. Phenolic compounds and their effects on human health. *Phenolic Compd Biochem*. 2006.
115. Tota S, Awasthi H, Kamat P, Nath C, Hanif K. Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. *Behav Brain Res*. 2010;209(1):73–9. doi:10.1016/j.bbr.2010.01.017.
116. Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ Chem Lett*. 2006;4(3):147–157. doi:10.1007/s10311-006-0068-8.
117. Jung M, Park M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules*. 2007;12(9):2130–9.
118. Custódio L, Justo T, Silvestre L, et al. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chem*. 2012;131(1):134–140. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.047.
119. Šebestík J, Marques SM, L. P, et al. Bifunctional phenolic-choline conjugates as anti-oxidants and acetylcholinesterase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2011;26(4):485–497.
120. Khan MTH, Orhan I, Senol FS, et al. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem Biol Interact*. 2009;181(3):383–9. doi:10.1016/j.cbi.2009.06.024.
121. Lou H, Fan P, Perez RG, Lou H. Neuroprotective effects of linarin through activation of the PI3K/Akt pathway in amyloid- $\beta$ -induced neuronal cell death. *Bioorg Med Chem*. 2011;19(13):4021–7. doi:10.1016/j.bmc.2011.05.021.
122. Orhan IE, Akkol EK. Estimation of neuroprotective effects of *Laurocerasus officinalis* Roem. (cherry laurel) by in vitro methods. *Food Res Int*. 2011;44(3):818–822. doi:10.1016/j.foodres.2011.01.037.
123. Gulpinar AR, Erdogan Orhan I, Kan A, Senol FS, Celik SA, Kartal M. Estimation of in vitro neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. *Food Res Int*. 2012;46(2):536–543. doi:10.1016/j.foodres.2011.08.011.
124. Pereira DM, Ferreres F, Oliveira J, Valentão P, Andrade PB, Sottomayor M. Targeted metabolite analysis of *Catharanthus roseus* and its biological potential. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(6):1349–54. doi:10.1016/j.fct.2009.03.012.
125. Fan P, Terrier L, Hay A-E, Marston A, Hostettmann K. Antioxidant and enzyme inhibition activities and chemical profiles of *Polygonum sachalinensis* F.Schmidt ex Maxim (Polygonaceae). *Fitoterapia*. 2010;81(2):124–31. doi:10.1016/j.fitote.2009.08.019.

126. Guo AJY, Xie HQ, Choi RCY, et al. Galangin, a flavonol derived from *Rhizoma Alpiniae Officinarum*, inhibits acetylcholinesterase activity in vitro. *Chem Biol Interact.* 2010;187(1-3):246–8. doi:10.1016/j.cbi.2010.05.002.
127. Kennedy D, Wightman E. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Adv Nutr An ....* 2011;32–50. doi:10.3945/an.110.000117.32.
128. Hernandez MF, Falé PLV, Araújo MEM, Serralheiro MLM. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species. *Food Chem.* 2010;120(4):1076–1082. doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.055.
129. Spencer JPE. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br J Nutr.* 2010;104 Suppl :S40–7. doi:10.1017/S0007114510003934.
130. Kaur T, Pathak CM, Pandhi P, Khanduja KL. Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain Cogn.* 2008;67(1):25–30. doi:10.1016/j.bandc.2007.10.003.
131. Porfírio S, Falé PLV, Madeira PJA, Florêncio MH, Ascensão L, Serralheiro MLM. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after in vitro gastrointestinal metabolism. *Food Chem.* 2010;122(1):179–187. doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.044.
132. Ercetin T, Senol FS, Erdogan Orhan I, Toker G. Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. *Ind Crops Prod.* 2012;36(1):203–208. doi:10.1016/j.indcrop.2011.09.007.
133. Costa P, Gonçalves S, Valentão P. Metabolic profile and biological activities of *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica*(Chaytor) Franco: Studies on the essential oil and polar extracts. *Food Chem.* 2013;141(3):2501–6. doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.055.
134. Cespedes CL, Muñoz E, Salazar JR, et al. Inhibition of cholinesterase activity by extracts, fractions and compounds from *Calceolaria talcana* and *C. integrifolia* (Calceolariaceae: Scrophulariaceae). *Food Chem Toxicol.* 2013;62:919–926. doi:10.1016/j.fct.2013.10.027.
135. Yokota T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res.* 1998;11(6):355–61.
136. Lim J, Ishiguro K, Kubo I. Tyrosinase inhibitory p-coumaric acid from ginseng leaves. *Phytother Res.* 1999;13(5):371–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10441774>.
137. Miyazawa M, Oshima T, Koshio K, Itsuzaki Y, Anzai J. Tyrosinase inhibitor from black rice bran. *J Agric Food Chem.* 2003;51(24):6953–6. doi:10.1021/jf030388s.

138. Conrad JS, Dawso SR, Hubbard ER, Meyers TE, Strothkamp KG. Inhibitor Binding to the Binuclear Active Site of Tyrosinase: Temperature, pH, and Solvent Deuterium Isotope Effects. *Biochemistry*. 1994;33(19):5739–5744.
139. Xie L, Chen Q, Huang H, Wang H, Zhang R. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochem*. 2003;68(4):487–91. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1023620501702>.
140. Matsuda H, Higashino M, Chen W, Tosa H, Iinuma M, Kubo M. Studies of cuticle drugs from natural sources. III. Inhibitory effect of *Myrica rubra* on melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull*. 1995;18(8):1148–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8535414>.
141. Zhang C, Lu Y, Tao L, Tao X, Su X, Dongzhi W. Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2007;22(1):91–98.
142. Itoh K, Hirata N, Masuda M, Naruto S. Inhibitory effects of Citrus hassaku extract and its flavanone glycosides on melanogenesis. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(3):410–5.
143. Shin N, Ryu S, Choi E, Kang S. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;243(3):801–3. doi:10.1006/bbrc.1998.8169.
144. Kim HJ, Seo SH, Lee BG LY. Identification of tyrosinase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis*. *Planta Med*. 2005;71(8):785–7.
145. Kim JH, Baek SH, Kim DH, et al. Downregulation of melanin synthesis by haginin A and its application to in vivo lightening model. *J Invest Dermatol*. 2008;128(5):1227–35. doi:10.1038/sj.jid.5701177.
146. Fu B, Li H, Wang X, Lee F, Cui S. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. *J Agric ....* 2005;53(19):7408–14. doi:10.1021/jf051258h.
147. Sigma-Aldrich Product Directory Home. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html>. Accessed January 22, 2014.
148. Matos MJ, Santana L, Uriarte E, et al. Tyrosine-like condensed derivatives as tyrosinase inhibitors. *J Pharm Pharmacol*. 2012;64(5):742–6. doi:10.1111/j.2042-7158.2012.01467.x.
149. Katalinić M, Rusak G, Domaćinović Barović J, et al. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *Eur J Med Chem*. 2010;45(1):186–92. doi:10.1016/j.ejmech.2009.09.041.

150. Orhan I, Kartal M, Naz Q, et al. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chem.* 2007;103(4):1247–1254. doi:10.1016/j.foodchem.2006.10.030.
151. Chen Q-X, Liu X-D, Huang H. Inactivation kinetics of mushroom tyrosinase in the dimethyl sulfoxide solution. *Biochem.* 2003;68(6):644–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12943509>. Accessed August 18, 2014.
152. Grodowska K, Parczewski A. Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Pol Pharm.* 2010;67(1):3–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210074>. Accessed August 18, 2014.
153. Nerya O, Vaya J, Musa R, Izrael S, Ben-Arie R, Tamir S. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J Agric Food Chem.* 2003;51(5):1201–7. doi:10.1021/jf020935u.
154. Ouattara N, Meda RN-T, Hilou A, et al. Anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities and HPLC-MS analysis of polyphenol from extracts of *Nelsonia canescens* (Lam.) Spreng. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2013;3(5):382–388. doi:10.1016/S2222-1808(13)60088-2.
155. Sermboonpaisarn T, Sawasdee P. Potent and selective butyrylcholinesterase inhibitors from *Ficus foveolata*. *Fitoterapia.* 2012;83(4):780–4. doi:10.1016/j.fitote.2012.03.009.
156. Kwon S-H, Lee H-K, Kim J-A, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur J Pharmacol.* 2010;649(1-3):210–7. doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.001.
157. Fang L, Kraus B, Lehmann J, Heilmann J, Zhang Y, Decker M. Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(9):2905–9. doi:10.1016/j.bmcl.2008.03.073.
158. Liston DR, Nielsen J a., Villalobos A, et al. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2004;486(1):9–17. doi:10.1016/j.ejphar.2003.11.080.
159. Dingova D, Leroy J, Check A, Garaj V, Krejci E, Hrabovska A. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. *Anal Biochem.* 2014;462C:67–75. doi:10.1016/j.ab.2014.05.031.
160. Yi W, Cao R, Wen H, et al. Synthesis and biological evaluation of helicid analogues as mushroom tyrosinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(24):6490–3. doi:10.1016/j.bmcl.2008.10.056.
161. Okombi S, Rival D, Bonnet S, Mariotte A-M, Perrier E, Boumendjel A. Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived



- from human melanocytes. *J Med Chem.* 2006;49(1):329–33. doi:10.1021/jm050715i.
162. Funayama M., Arakawa H., Yamamoto R., Nishino T., Shin T., Murao S. Effects of alpha- and beta-arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995;59:143–144.
  163. Kubo I, Kinst-Hori I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sánchez Y, Ogura T. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg Med Chem.* 2000;8(7):1749–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10976523>.
  164. No JK, Soung DY, Kim YJ, et al. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci.* 1999;65(21):PL241–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10576599>.
  165. Kubo I, Kinst-Hori I. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J Agric Food Chem.* 1999;47(10):4121–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10552777>.
  166. Fujimoto A, Shingai Y, Nakamura M, Maekawa T, Sone Y, Masuda T. A novel ring-expanded product with enhanced tyrosinase inhibitory activity from classical Fe-catalyzed oxidation of rosmarinic acid, a potent antioxidative Lamiaceae polyphenol. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(24):7393–6. doi:10.1016/j.bmcl.2010.10.040.
  167. Arraudeau J, Aubert L. Use of benzoic acid derivatives to stimulate the process of epidermal renewal. *US Pat 5,766,613.* 1998. Available at: <http://www.google.com/patents/US5766613>. Accessed July 25, 2014.
  168. Kornhauser A, Coelho SG, Hearing VJ. Applications of hydroxy acids: classification, mechanisms, and photoactivity. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2010;3:135–42. doi:10.2147/CCID.S9042.
  169. Zhang J-P, Chen Q-X, Song K-K, Xie J-J. Inhibitory effects of salicylic acid family compounds on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Food Chem.* 2006;95(4):579–584. doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.042.
  170. Yi W, Cao R, Peng W, et al. Synthesis and biological evaluation of novel 4-hydroxybenzaldehyde derivatives as tyrosinase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2010;45(2):639–46. doi:10.1016/j.ejmech.2009.11.007.
  171. Weerapreeyakul N, Seebundit K, Pra-yong P. Antioxidative and Tyrosinase Inhibitory Activities of Indigenous Plants. *2022894204.* 2012;40(2):572–583. Available at: [http://202.28.94.204/Dean/sci\\_journal/web/book/40\\_2/572.pdf](http://202.28.94.204/Dean/sci_journal/web/book/40_2/572.pdf). Accessed April 8, 2014.
  172. Bian S, Doh H-J, Zheng J, Kim JS, Lee C-H, Kim D-D. In vitro evaluation of patch formulations for topical delivery of gentisic acid in rats. *Eur J Pharm Sci.* 2003;18(2):141–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594007>.

173. Kubo I, Chen Q-X, Nihei K. Molecular design of antibrowning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors. *Food Chem.* 2003;81(2):241–247. doi:10.1016/S0308-8146(02)00418-1.
174. Mandel S a, Amit T, Weinreb O, Youdim MBH. Understanding the broad-spectrum neuroprotective action profile of green tea polyphenols in aging and neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.* 2011;25(2):187–208. doi:10.3233/JAD-2011-101803.
175. Khan MM, Raza SS, Javed H, et al. Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2012;22(1):1–15. doi:10.1007/s12640-011-9295-2.
176. Getz KA. FDA Approved Drugs by Medical Condition. *CenterWatch.* 2014. Available at: <https://www.centerwatch.com/about-centerwatch/team-bios.aspx>. Accessed August 20, 2014.
177. Lesjak MM, Beara IN, Orčić DZ, et al. Juniperus sibirica Burgsdorf. as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chem.* 2011;124(3):850–856. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.006.
178. Kalinova J, Triska J, Vrchotova N. Distribution of Vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *J Agric Food Chem.* 2006;54(15):5330–5. doi:10.1021/jf060521r.
179. WebMD. Definition of Alternative splicing. *MedicineNet.* 2012. Available at: <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=16831>. Accessed August 21, 2014.
180. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Al. E. Neuroglial Cells. *Neuroscience.* 2001. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10869/>. Accessed August 21, 2014.
181. INFARMED. Autorização de Introdução no Mercado (AIM). *Medicam Uso Hum.* 2014. Available at: [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS\\_USO\\_HUMANO/AUTORIZACAO\\_DE\\_INTRODUCAO\\_NO\\_MERCADO](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AUTORIZACAO_DE_INTRODUCAO_NO_MERCADO). Accessed August 21, 2014.
182. Mosimann UP, McKeith IG. Dementia with lewy bodies--diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly.* 2003;133(9-10):131–42. doi:2003/09/smw-10028.
183. Carneiro AV, Costa J. [Off-label prescription: practice and problems]. *Rev Port Cardiol.* 2013;32(9):681–6. doi:10.1016/j.repc.2013.01.006.
184. Bagatin E. Envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmeceuticos. *Bol dermatológico UNIFESP.* 2008;17:1–4.
185. American Chemical Society. About CAS. *CAS - Chem Abstr Serv.* 2014. Available at: <http://www.cas.org/about-cas>. Accessed May 22, 2014.

