

ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DOS FRUTOS DE *Myrcianthes pungens* (O.BERG) D.LEGRAND (MYRTACEAE)

Sirlene Silveira¹
Elvis Viana de Lucena²
Tuanny Fernanda Pereira²
Fabrícia Lorca dos Santos Garnés²
Mariza Barion Romagnolo³
Orlando Seiko Takemura²
Antonio Laverde Junior^{1,2*}

SILVEIRA, S.; LUCENA, E. V. de; PEREIRA, T. F.; GARNÉS, F. L. S. dos; ROMAGNOLO, M. B.; TAKEMURA, O. S.; LAVERDE-JUNIOR, A. Atividade anticolinesterásica dos frutos de *myrcianthes pungens* (O.Berg) D.Legrand (Myrtaceae). **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 127-133, maio/ago. 2011.

RESUMO: Os inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) são uma das principais classes de medicamentos utilizadas no tratamento de sintomas de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA), pois são capazes de elevar os níveis de acetilcolina no cérebro. Plantas têm sido uma excelente alternativa na busca de novas moléculas bioativas. No presente trabalho, extratos alcoólicos dos frutos de *Myrcianthes pungens* (O.Berg) D.Legrand (Myrtaceae), também conhecidos como guabijú ou guabiroba-açú, foram investigados quanto à capacidade de inibição de AChE *in vitro* por ensaio bioautográfico, utilizando o reagente *Fast Blue Salt B*. Foi observada a presença de pelo menos quatro diferentes substâncias com capacidade inibitória de AChE nos frutos verdes e maduros desta espécie. Duas das substâncias ativas foram caracterizadas como terpenos por meio de ensaios com reagentes específicos em cromatografia de camada delgada. Estes resultados correspondem ao primeiro relato da atividade de inibição de AChE em espécies do gênero *Myrcianthes* (Myrtaceae). **PALAVRAS-CHAVE:** Guabijú. *Myrcianthes*. Enzima acetilcolinesterase. Método de *Fast Blue Salt B*. Atividade anticolinesterásica.

ANTICHOLINESTERASE ACTIVITY OF *Myrcianthes pungens* (O.Berg) D.LEGRAND (MYRTACEAE) FRUITS

ABSTRACT: Inhibitors of the acetylcholinesterase enzyme (AChE) are one of the major classes of drugs used in the treatment of symptoms of neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (AD), because they can increase the levels of acetylcholine in the brain. Plants have been an excellent alternative source of bioactive molecules. In the present study, alcoholic extracts of fruits of *Myrcianthes pungens* (O.Berg) D.Legrand (Myrtaceae), also known as "guabijú" or "guabiroba-açú", were investigated for their ability to inhibit AChE *in vitro* in a bioautographic assay using *Fast Blue Salt B* reagent. The presence of at least four different substances capable of inhibiting AChE in unripe and ripe fruits of this species was observed. Two active substances were characterized as terpenes in assays using specific reagents with thin layer chromatography. These results are the first report of the AChE inhibition activity for species of *Myrcianthes* genus (Myrtaceae).

KEYWORDS: "guabijú", *Myrcianthes*, acetylcholinesterase enzyme, *Fast Blue Salt B* method, anticholinesterasic activity.

Introdução

A demência é uma síndrome clínica caracterizada por déficits cognitivos múltiplos, adquiridos e persistentes, capazes de interferir substancialmente nas atividades diárias da pessoa portadora. Esta síndrome é mais prevalente nos segmentos da população com idade mais avançada, principalmente naqueles com mais de 65 anos. A doença de Alzheimer (DA) é uma das principais demências neurodegenerativas conhecidas. Esta doença neurológica crônica e progressiva é caracterizada por múltiplos distúrbios corticais na memória, julgamento, orientação, compreensão, aprendizagem e linguagem (CUMMINGS; BACK, 1998).

Em 1976, foi estabelecida a hipótese colinérgica que associa os sintomas cognitivos, funcionais e

comportamentais presentes na DA, com uma deficiência na neurotransmissão colinérgica ligada à perda de neurônios colinérgicos (CUMMINGS; BACK, 1998). Várias alterações relacionadas com o sistema colinérgico no cérebro com DA são observadas, entre elas: perda seletiva e significativa da atividade de colina acetiltransferase (CHAT) em diferentes partes do cérebro (córtex, hipocampo e amígdalas), degeneração seletiva dos neurônios colinérgicos basais do cérebro, diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), com proporcional aumento do número de placas senis, bem como, uma redução dos níveis de acetilcolina (ACh) e AChE (KASA; RAKONCZAY; GULYA, 1997; GOURAS, 2001; GARCIA-SANCHEZ et al., 2003). Inúmeras abordagens vêm sendo exploradas para restaurar a função central colinérgica: o uso de agentes liberadores de

¹Programa de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Instituto de Ciências Exatas, Agrárias, Tecnológicas e Geociências, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, s/n, cx. p. 224, CEP 87502-210, Umuarama, PR, Brasil.

²Laboratório de Produtos Naturais, Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, s/n, cx. p. 224, CEP 87502-210, Umuarama, PR, Brasil.

³Laboratório de Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

(*correspondência: laverdej@unipar.br)

ACh, a estimulação da captação de acetilcolina, a ativação de receptores colinérgicos por agentes agonistas e a diminuição da degradação metabólica de ACh pela inibição da AChE (KASA; RAKONCZAY; GULYA, 1997).

A ACh é um importante neurotransmissor presente nos sistemas nervosos central (SNC) e periférico (SNP). Ela está associada com as funções cognitivas, processamento de informações sensoriais, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (SCREMIN et al., 1997). A deficiência de ACh na DA levou ao estabelecimento da hipótese colinérgica, a qual explica que a incapacidade de transmitir impulsos neurológicos entre as sinapses cerebrais é a razão para as disfunções cognitivas e comportamentais. A AChE desempenha um papel essencial no mecanismo colinérgico, catalisando a hidrólise da ACh na transmissão do impulso nervoso na sinapse colinérgica entre neurônios colinérgicos (RANG et al., 2004). Estudos revelaram que um aumento dos níveis de ACh pela inibição da AChE pode melhorar a insuficiência na função cognitiva em estágios prematuros de DA (MESULAM; LARRY, 2009). Os anticolinesterásicos possuem um papel importante no tratamento da DA, sendo o meio mais utilizado para o tratamento farmacológico desta morbidade (CUMMINGS, 2000; ELLIS, 2005). Até o ano de 2010, dentre os cinco medicamentos aprovados pelo FDA (*Food Drug Administration*) para o tratamento de DA, quatro eram inibidores de AChE, e um era um antagonista de NMDA (*N*-metil-D-aspartato) (FAN; CHIU, 2010).

Alguns agentes anticolinesterásicos usados comumente na terapêutica de DA possuem limitações de uso devido à meia-vida curta e aos efeitos indesejáveis (SUNG et al., 2002). Levando-se em consideração que compostos naturais vegetais como a galantamina e huperzina, que apresentam ação AChE, pesquisas estão sendo realizadas com plantas medicinais na busca de novos fármacos com menos efeitos colaterais que proporcionem ao indivíduo portador da doença uma melhor qualidade de vida (TREVISAN; MACEDO 2003; BARBOSA-FILHO et al., 2006, VIEGAS et al., 2004). Diversos extratos avaliados mostraram propriedades como pró-colinérgica, antioxidante, anti-amiloide e anti-inflamatória, indicando o uso promissor de substâncias provenientes de fármacos vegetais no tratamento de pacientes com DA (ANEKONDA; REDDY, 2005).

Como parte de nosso contínuo interesse na investigação de propriedades biológicas de espécies da família Myrtaceae de ocorrência no Brasil, o presente trabalho envolveu o estudo de *Myrcianthes*

pungens (O.Berg) D.Legrand, uma espécie nativa da Bacia do Prata, popularmente conhecida como guabijú, guabiroba-açú, guabijueiro, guabira-guaçú, ibariú ou ibaviú. Esta espécie produz frutos pequenos de coloração púrpura ou roxo-avermelhada, os quais são apreciados pelo homem, pelas aves silvestres e pela fauna em geral (ROMAGNOLO; SOUZA, 2004). Na medicina popular, é indicada para regularizar funções intestinais (CORREA, 1984).

O presente estudo foi motivado pelo fato de se tratar de uma espécie pouco estudada cientificamente (UBIERGO; TAHER; TALENTI, 1986; ZYGADLO et al., 1997; MARIN, R. et al., 2008) e os principais objetivos deste trabalho consistiram na avaliação *in vitro* da atividade anticolinesterásica e na análise fitoquímica dos extratos dos frutos de *M. pungens*.

Material e Métodos

Material Vegetal

Os frutos verdes e maduros da espécie *M. pungens* foram coletados separadamente no Parque Municipal de Paranavaí (Paranavaí – PR) em novembro de 2008. A planta foi identificada botanicamente pela Prof^a. Dr^a. Mariza Barion Romagnolo (Universidade Estadual de Maringá - UEM). Uma exsicata se encontra depositada no Herbário Educacional da Universidade Paranaense (HEUP), campus de Paranavaí – PR, sob o registro nº HEUP-1721.

Reagentes e Soluções

Acetilcolinesterase de peixe elétrico (EC 3.1.1.7, Sigma-Aldrich®) foi utilizada em todos os ensaios bioautográficos pelo método colorimétrico de Marston, Kissling e Hostettmann (2002). A enzima liofilizada foi dissolvida em solução tampão (Tris 0,05 M, pH 7,8, contendo 1mg/mL de albumina de soro bovino - BSA, 98%, Sigma-Aldrich®) para obter uma solução 1U/mL. Acetato de α -naftila (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado no ensaio (solução 1,5 % em etanol PA/água). O sal *Fast Blue B* (95%, Sigma-Aldrich®) foi utilizado como reagente nos ensaios bioautográficos na concentração de 0,5% em água MilliQ®.

Preparação dos extratos

As polpas (400 g) dos frutos frescos verdes e maduros de *M. pungens* foram separadamente submetidas a um processo de extração exaustiva por ma-

ceração estática com etanol puro, por um mês, com renovação do solvente feita a cada 3 dias. Os dois extratos etanólicos resultantes foram secos por evaporação sob pressão reduzida e liofilizados (Liofilizador modelo LS3000, Terroni), dando origem aos extratos alcoólicos brutos dos frutos verdes (MPFV - 10,3g) e dos frutos maduros (MPFM - 11,5g).

Avaliação da atividade anticolinesterásica

O ensaio bioautográfico foi conduzido segundo metodologia descrita por Marston, Kissing; Hostettman (2002), com algumas modificações feitas por Yang et al. (2009). Com o auxílio de uma microsseringa, diferentes volumes dos extratos MPFV e MPFM diluídos em metanol (MeOH) foram calculados e aplicados em cromatoplasmas de alumínio (10X10cm, sílica Gel 60 F₂₅₄, 0,2 mm de espessura), para que ao final da evaporação do solvente, contasse com um conjunto de pontos com diferentes quantidades do extrato a ser avaliado (600, 400, 200, 150, 100, 50 e 25 µg). Ao final da aplicação, as placas foram eluídas com uma mistura de solventes (diclorometano/MeOH - 9:1). Após a migração das amostras e secagem para eliminação total do eluente, as cromatoplasmas foram borrifadas com uma solução da enzima (AChE em solução tampão tris) e em seguida, com uma solução contendo acetato de α -naftila. As placas foram submetidas a uma breve secagem parcial, e foram mantidas em banho-maria (37°C) por 20 minutos, para incubação da enzima. Decorrido este período, as cromatoplasmas foram borrifadas com o reagente colorimétrico sal *Fast Blue B*, promovendo a formação de uma coloração púrpura em toda a superfície das cromatoplasmas após poucos minutos. Como padrão positivo foi usado o composto neoestigmina. A atividade anticolinesterásica foi determinada pela ausência da coloração púrpura característica (manchas brancas após 5 minutos) em comparação com outras regiões da placa, demonstrando desta forma a ação inibitória das substâncias avaliadas sobre a atividade da enzima. Os compostos considerados ativos foram distinguidos pelos seus respectivos fatores de retenção (R_f), os quais foram calculados conforme descrito na literatura (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

Caracterização fitoquímica em cromatografia de camada delgada

Foram realizadas análises em cromatografia de camada delgada (CCD) para a caracterização das diferentes classes fitoquímicas presentes nos extratos

avaliados anteriormente em relação à atividade anticolinesterásica.

Na cromatoplasma de sílica gel, foi aplicado cerca de 10 µL de cada extrato, e colocado na fase móvel (clorofórmio/MeOH - 9:1). Como sistema revelador foi utilizado a vanilina sulfúrica a fim de identificar terpenos. A placa foi aquecida em estufa a 110°C antes da visualização (JORK et al., 1990).

Para a identificação de flavonoides nos extratos foi utilizado como revelador o reagente *Natural Products-Polyethylene glycol* (NP/PEG), segundo Wagner; Bladt (2009). As placas foram observadas em luz ultravioleta a 365nm.

Na identificação de esteróides/triterpenos as placas foram reveladas com reagente de Liebermann-Bouchard (anidrido acético/ácido sulfúrico), seguida de aquecimento em estufa a 110°C (JORK et al., 1990).

Resultados e discussão

A análise qualitativa da atividade anticolinesterásica realizada por método bioautográfico revelou que todos os extratos avaliados apresentaram resultados positivos ao teste. O efeito inibitório de componentes dos extratos dos frutos verdes e maduros sobre a atividade da enzima AChE foi detectado após o desenvolvimento de halos brancos (ausência de atividade enzimática) nas regiões onde continuam os compostos, indicando que ambos extratos possuíam algum grau de atividade anticolinesterásica.

O MPFV mostrou quatro regiões de inibição no ensaio bioautográfico, sugerindo a presença de pelo menos quatro componentes inibidores da enzima AChE, cujos fatores de retenção (R_f) nas condições cromatográficas assumidas no presente experimento foram $R_f(A) = 0,76$, $R_f(B) = 0,70$, $R_f(C) = 0,42$ e $R_f(D) = 0,0$, conforme apresentado na Tabela 1. Da mesma forma, na avaliação do MPFM também revelaram quatro regiões de inibição no ensaio bioautográfico. Nas mesmas condições experimentais se verificou que os fatores de retenção eram iguais àqueles observados para o extrato anterior. Estes resultados sugerem que os componentes inibidores da enzima acetilcolinesterase presentes nos frutos de *M. pungens* sejam os mesmos e independem do estágio de maturação dos mesmos. As concentrações de alguns dos componentes ativos do extrato podem variar com relação ao desenvolvimento ontogênico da planta, por isso, interferindo também no padrão de atividade observado.

Tabela 1: Quantidade inibitória da enzima acetilcolinesterase na presença dos extratos brutos frutos verdes (MPFV) e frutos maduros (MPFM) após separação por bioautografia.

Quantidades testadas (μg)	Componentes de MPFV				Componentes de MPFM			
	A	B	C	D	A	B	C	D
600	+	+	+	+	+	+	+	+
400	+	+	+	+	+	+	+	+
200	+	+	+	+	+	+	+	+
150	+	+	+	+	-	+	+	+
100	+	+	-	+	-	+	+	+
50	-	+	-	+	-	-	-	+
25	-	-	-	+	-	-	-	+

ativo (+); não-ativo (-); Componentes: A ($R_f = 0,76$), B ($R_f = 0,70$), C ($R_f = 0,45$), D ($R_f = 0,0$).

Na metodologia proposta por Marston, Kising; Hostettman (2002), um grande volume de enzima é utilizado (6,7 U/mL), onerando bastante o teste de inibição. Por isso, optou-se pela modificação proposta por Yang et al. (2009), cujo teste foi dimensionado para ser realizado em menor escala (1,0 U/mL), o qual, além de diminuir a quantidade de enzimas em 85%, também aumentou consideravelmente os limites de detecção do método.

Por isso, no presente trabalho, para descobrir a quantidade mínima necessária para cada extrato em demonstrar inibição de AChE, diferentes quantidades de cada extrato foram aplicadas nas cromatoplacas. O método bioautográfico além de estimar o número de metabólitos secundários capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase, conseguiu estimar a quantidade inibitória mínima do extrato para cada um dos componentes. Embora a quantificação proposta não seja pontual para cada metabólito inibidor, uma vez que a quantidade de extrato usada não corresponda exatamente à quantidade de apenas um inibidor, mas ao conjunto de substâncias do extrato avaliado, a informação obtida pode ser relevante e servir para nortear trabalhos futuros. Na Tabela 1 são apresentados os resultados quantitativos resultantes da inibição de AChE frente aos componentes dos extratos dos frutos verdes e maduros de *M. pungens*.

Considerando que as concentrações dos extratos em que houve inibição da enzima acetilcolinesterase (25 - 600 μg) e que os componentes presentes se encontram em quantidades inferiores ao do extrato total, pode-se dizer que os componentes ativos exibiram atividade inibidora forte, principalmente o(s) componente(s) ativo(s) mais polar(es) ($R_f = 0,0$). Ainda, os dados obtidos, mostram que a substância A, pode estar em menor concentração nos frutos maduros, explicando assim a ausência de atividade quando o extrato MPFM foi aplicado nas quantidades de 150 e 100 μg .

A aplicação da CCD empregando reveladores para a caracterização de grupos fitoquímicos mostrou que as substâncias ativas detectadas pelo método com solução de *Fast Blue B*, podem tratar-se de terpenos. A revelação com solução de vanilina sulfúrica mostrou que as substâncias com $R_f = 0,70$ e 0,30 com coloração púrpura, podem se tratar de monoterpénos (JORK et al., 1990). Com relação à análise com outros reveladores, não foi encontrado correlação das substâncias com atividade anticolinesterásica com coloração padrão de flavonoides ou esteroides/triterpenos.

Embora a identidade das substâncias ativas ainda permaneça desconhecida, estes resultados são significativos, uma vez que se conhece pouco sobre a atividade anticolinesterásica de plantas da família Myrtaceae. Gupta; Gupta (1997) observaram esta atividade em extratos das folhas de duas espécies desta família: *Callistemon lanceolatus* e *Psidium guajava* (goiabeira). Estudo com o extrato bruto das cascas de jambolão (*Syzygium jambolana*) relatou que componentes químicos presentes nas cascas desta espécie mostraram efeitos inibitórios sobre a atividade da AChE no cerebelo e córtex cerebral de ratos, agindo nos receptores colinérgicos, sugerindo assim uma alteração no sistema nervoso central dos animais testados (MAZZANTI et al., 2004). Recentemente, Souza et al. (2010) relataram que os óleos essenciais de duas espécies nativas da Mata Atlântica, *Myrcogenia myrcioides* e *Eugenia riedeliana*, apresentaram atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, a qual foi mais acentuada para a *E. riedeliana*. Souza et al. (2009), avaliando o efeito de óleos essenciais de *Marlierea racemosa* (Myrtaceae) atribuíram o efeito possivelmente a monoterpénos, compostos majoritários encontrados na espécie coletadas em diferentes regiões do litoral do estado de São Paulo.

Mais de 25 diferentes monoterpénos já foram identificados como inibidores de acetilcolinesterase

(BARBOSA-FILHO et al., 2006). Trabalhos prévios relatam que monoterpenos como (-)-carvona; (-)-mentona; (-)-mentol; *p*-cimeno; α e γ -terpinenos; entre outros, se mostraram eficientes na inibição de acetilcolinesterase (MIYAZAWA; WATANABE; KAMEOKA, 1997). De acordo com Savelev et al. (2003), foi demonstrado experimentalmente sinergismo entre cineol, α -pineno e óxido de cariofileno.

Monoterpenos hidrocarbonados apresentaram maior inibição da enzima acetilcolinesterase do que alcoóis e cetonas. A presença de um grupo funcional oxigenado diminui a inibição da enzima acetilcolinesterase. A posição da dupla ligação também influencia o efeito inibitório. Assim, o α -pineno, apresentou maior potencial de inibição, quando comparado com o β -pineno, que apresenta dupla ligação exocíclica. Para os compostos (+)- δ -2-careno e (+)- δ -3-careno, a posição da dupla ligação foi relacionada com a potência de inibição enzimática, sendo o segundo mais ativo do que o primeiro (MIYAZAWA; WATANABE; KAMEOKA, 1997).

Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram a afirmativa de que exemplares da família Myrtaceae podem ser fontes de compostos anticolinesterásicos. No entanto, investigações para isolamento e elucidação estrutural dos compostos inibidores da enzima acetilcolinesterase são necessárias para um estudo mais profundo, sobre a eficácia destas substâncias bioativas. A identificação das moléculas ativas inibidores da acetilcolinesterase pode ser bastante importante, na compreensão dos mecanismos envolvidos na inibição enzimática, e conseqüentemente na terapêutica de doenças neurodegenerativas.

Conclusões

De acordo com o presente estudo, a espécie *Myrcianthes pungens* apresenta componentes químicos com capacidade inibitória da enzima AChE, indiferente do estágio de maturação. Além disso, algumas substâncias presentes nos extratos foram ativas mesmo em concentrações baixas, levando a concluir que se tratem de substâncias com capacidade inibitória promissora. Dos compostos ativos, dois pertencem à classe dos terpenos, corroborando com resultados de outros trabalhos de atividade anticolinesterásica com plantas da família Myrtaceae e relacionados a terpenoides.

De um modo geral, estes resultados são interessantes, pois contribuem com o leque de atividades das plantas desta família e abrem perspectivas para futuros estudos sobre a identificação da composição

química dos metabólitos bioativos desta espécie. Este trabalho apresenta o primeiro relato de atividade anticolinesterase em espécies do gênero *Myrcianthes* (Myrtaceae).

Agradecimentos

Nossos agradecimentos à Universidade Paranaense (UNIPAR) pelo apoio financeiro recebido (Projeto 17805/2010) e à Diretoria Executiva de Gestão da Pesquisa e da Pós-Graduação (DEGPP) pelo incentivo aos programas de iniciação científica (PIC e PIBIC).

Referências

- ANEKONDA, T. S.; REDDY, P. H. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? **Brain Research Reviews**, v. 50, p. 361-376, 2005.
- BARBOSA FILHO, J. M. Natural Products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 258-285, 2006.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Unicamp, 1997.
- CORREA, P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivada**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. p. 429-430.
- CUMMINGS, J. L. The role of cholinergic agents in the management of behavioural disturbances in Alzheimer's disease. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 3, p. 21-29, 2000.
- CUMMINGS, J. L.; BACK, C. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 6, p. S64-S78, 1998.
- ELLIS, J. M. et al. Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. **Jaoa**, v. 105, n. 3, p. 145-158, 2005.
- FAN, L. Y.; CHIU, M. J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. **Acta Neurologica Taiwanica**, v. 19, n. 4, p. 228-245, 2010.

- GARCIA-SANCHEZ, C. et al. Cognitive and functional decline in the stage previous to the diagnosis of Alzheimer's disease. **Neurologia**, v. 18, p. 716-722, 2003.
- GOURAS, G. K. Current theories for the molecular and cellular pathogenesis of Alzheimer's disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 2001, p. 1-11, 2001.
- GUPTA, A.; GUPTA, R. A survey of plants for presence of cholinesterase activity. **Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 827-831, 1997.
- JORK, H. et al. **Thin-Layer Chromatography**: reagents and detection methods. Weinheim: VCH, 1990. 403 p.
- KASA, P.; RAKONCZAY, Z.; GULYA, K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 52, p. 511-535, 1997.
- MARIN, R. et al. Volatile components and antioxidant activity from some myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p.172-177, 2008.
- MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.
- MAZZANTI, C. M. et al. Efeito do extrato da casca de *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 803-807, 2004.
- MESULAM, M. M.; LARRY, R. S. Acetylcholine Neurotransmission in CNS. In: **Encyclopedia of Neuroscience**. Oxford: Academic Press, 2009. p. 1-4.
- MIYAZAWA, M.; WATANABE, H.; KAMEOKA, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 45, p. 677-679, 1997.
- RANG, H. P. et al. Distúrbios neurodegenerativos. In: RANG, H. P. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 559-573.
- ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. Os gêneros *Calycorectes* O. Berg, *Hexachlamys* O. Berg, *Myrcianthes* O. Berg, *Myrciaria* O. Berg e *Plinia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do alto Rio Paraná. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 613-627, 2004.
- SAVELEV, S. et al. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 661-668, 2003.
- SCREMIN, O. U. et al. Cholinesterase inhibition improves blood flow in the ischemic cerebral cortex. **Brain Research Bulletin**, v. 42, p. 59-70, 1997.
- SOUZA, A. et al. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils of *Myrceugenia myrcioides* (Cambess.) O. Berg and *Eugenia riedeliana* O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 175-179, 2010.
- _____. Differential acetylcholinesterase inhibition by volatile oils from two specimens of *Marlierea racemosa* (Myrtaceae) collected from different areas of the Atlantic Rain Forest. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 8, p. 1143-1146, 2009.
- SUNG, S. H. et al. (+)- α -Vinifrin, a stilbene trimer from *Caragana chamlague*, inhibits acetylcholinesterase. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 125-127, 2002.
- TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade colinesterásica para o tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 302-304, 2003.
- UBIERGO, G.; TAHER, H. A.; TALENTI, E. C. Mono and sesquiterpenoids from the essential oil of *Myrcianthes pungens*. **Anales de la Asociacion Quimica Argentina**, v. 74, n. 5, p. 567-569, 1986.
- VIEGAS, C. et al. Natural products as candidates for useful drugs in the treatment of Alzheimer's disease. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.
- YANG, Z. et al. Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts. **Journal Separation Science**, v. 32, p. 3257-3259, 2009.

ZYGADLO, J. A. et al. Leaf oils of two *Myrcianthes* species from Argentina: *M. pungens* (Berg.) Legrand and *M. cisplatensis* (Camb.) Berg. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 237-239, 1997.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Germany: Springer, 2009. 384 p.

Recebido em: 17/01/2011

Aceito em: 20/04/2011

Received on: 17/01/2011

Accepted on: 20/04/2011