

## Avaliação preliminar de atividade anticolinesterásica de espécies vegetais coletadas no estado do Paraná - Brasil

### Preliminary evaluation of anticholinesterase activity of plant species collected in the state of Paraná - Brazil

**Luciano José Soave**  
[soave@alunos.utfpr.edu.br](mailto:soave@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

**Jhefferson Luiz Schiavini**  
[Jheffluiz.s@outlook.com.br](mailto:Jheffluiz.s@outlook.com.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

**Alexandre da Trindade Alfaro**  
[alexandre@utfpr.edu.br](mailto:alexandre@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

**Cláudio Roberto Novello**  
[crnovello@gmail.com](mailto:crnovello@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho é identificar possíveis compostos em espécies vegetais coletadas no estado do Paraná – Brasil, levando em consideração a medicina popular e a principais características da grande flora brasileira, para o tratamento da Doença de Alzheimer, descoberta pelo alemão Alois Alzheimer em 1901, ela é considerada uma doença neurodegenerativa crônica, que também é responsável por aproximadamente 60% dos casos de demência, e afeta preferencialmente indivíduos considerados idosos. Ainda não existe comprovação científica suficiente, sobre o que especificamente induz uma pessoa a ser portadora da Doença de Alzheimer, tanto é que a doença é considerada incurável, porém existem muitos estudos envolvendo as ações colinérgicas atuantes no sistema nervoso central e periférico com a doença neurodegenerativa. Estas instruções de grande relevância nos fizeram acreditar na existência de possíveis compostos que venham a auxiliar no tratamento da Doença de Alzheimer, para tal o artigo em questão tenta somar novas informações que sirvam para base em futuros estudos do gênero, auxiliando assim a formar um possível banco de dados, destacando espécies que podem ser efetivas em futuras ocasiões.

**PALAVRAS-CHAVE:** Doença de Alzheimer. Atividade Anticolinesterásica. Espécies Vegetais.

#### ABSTRACT

The objective of this work is to identify possible compounds in plant species collected in the state of Paraná - Brazil, taking into account the popular medicine and the main characteristics of the great Brazilian flora, for the treatment of Alzheimer 's disease, discovered by the German Alois Alzheimer in 1901, it is considered a chronic neurodegenerative disease, which is also responsible for approximately 60% of the cases of dementia, and affects mainly individuals considered elderly. There is still insufficient scientific evidence on what specifically induces a person to be carrying Alzheimer's disease, so much so that the disease is considered incurable, but there are many studies involving cholinergic actions in the central and peripheral nervous system with neurodegenerative disease. These instructions have made us believe in the existence of possible compounds that will help in the treatment of Alzheimer's disease, for which the article in question tries to add new information that will serve as a basis for future studies of the genus, thus helping to form a possible database, highlighting species that may be effective on future occasions.

**KEYWORDS:** Alzheimer's disease. Anticholinesterase activity. Plant species

**Recebido:** 09 fev. 2016.

**Aprovado:** 12 mar. 2016.

#### Direito autorial:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.





## INTRODUÇÃO

FRANÇA (2008) nos diz que aproximadamente 24% das espécies de plantas do mundo estão no Brasil, tornando-o país com maior cobertura vegetal do mundo, com isso são feitas observações na população sobre o uso e eficácia de plantas medicinais, MACIEL (2002) as quais são prescritas com frequência em virtude de seus resultados terapêuticos apesar de seus constituintes químicos não serem conhecidos, BRAZ-FILHO (1994) diante disso o isolamento e estudos de substâncias naturais tem sido uma preocupação central das ciências químicas e bioquímicas.

Porém nem sempre é encontrado na literatura, avaliações sobre determinados produtos fitoterápicos com relação a sua eficácia, com isso, FRANÇA (2008) também destaca que o empirismo da alquimia nos levou a química experimental e permitiu a síntese laboratorial de novas substâncias orgânicas no século XIX. FILHO e YUNES (1998) afirmam que neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular em vários países, com finalidades terapêuticas, têm contribuído, BRAZ-FILHO (1994) ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos e a caracterização de compostos potencialmente importantes para o tratamento de diversos males da atualidade.

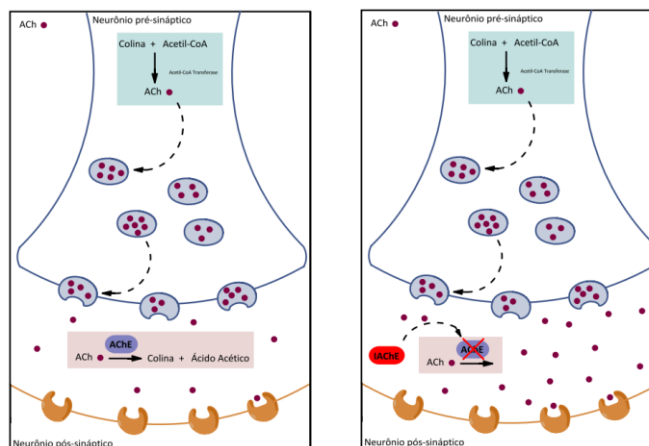
SEIDL (2010) destaca que tendo em vista o aumento de expectativa de vida a baixa taxa de fecundidade e o crescimento da proporção de pessoas acima de 60 anos de idade, umas das grandes preocupações da medicina são as doenças degenerativas, dentre elas a Doença de Alzheimer (DA), a causa mais comum de demência em pessoas acima de 65 anos afetando cerca de 10% das pessoas acima desta faixa etária e 50% das pessoas acima de 85 anos. HAMDAN (2008) a demência tem um conceito amplo que inclui deterioração das habilidades intelectuais, da memória, orientação, pensamento e do comportamento, o declínio das funções cognitivas são perceptíveis e também são indicadas pelas principais mudanças bioquímicas na DA, as quais; diminuição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), diminuição dos níveis da acetilcolina (ACh) e perda da atividade da enzima colinoacetiltransferase.

SEIDL (2010) A acetilcolinesterase constitui o alvo primário dos inibidores das colinesterases, existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), no cérebro, AChE é mais dominante do que a BChE. BONO (2014) 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. Durante a DA existe a redução na atividade da AChE no cérebro, enquanto que, os níveis de BChE aumentam com a progressão da doença. Para ARAÚJO (2016) a AChE é a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas, a qual atua transmitindo a mensagem de um neurônio a outro. A AChE quando bloqueada é incapaz de hidrolisar a ACh, assim, este neurotransmissor tende a permanecer ativo por um período maior na fenda sináptica, fato que incrementa a transmissão colinérgica.

Segundo ARAÚJO e SANTOS (2016) um anticolinesterásico retarda a degradação da ACh, assim o neurotransmissor passa mais tempo na fenda sináptica, intensificando desta forma a transmissão colinérgica, conforme figura 1.

BONO (2014) O uso de anticolinesterásicos induz a melhora das manifestações clínicas dos pacientes com Doença de Alzheimer, em especial na esfera cognitiva. No entanto, não impedem a progressão da doença. É encontrado na literatura que o benefício clínico ocorre com 40 a 70% de inibição da colinesterase.

Figura 1. Sinapse colinérgica na ausência e na presença de um inibidor da AChE



Fonte: ARAÚJO nov. 2016.

Em virtude de tais fatos, e com base nas informações da literatura, o trabalho busca encontrar novos meios de origem natural para o tratamento mais efetivo da DA. A matéria a ser apresentada neste é um estudo sobre a planta *Nerium oleander L.* pertencente à família *Apocynaceae* conhecida no Brasil pelos nomes: Espirradeira, Flor de Sao Jose, Oleandro, entre outros a planta é predominante em regiões do mediterrâneo, sendo que não resiste à baixas temperaturas, é amplamente cultivada particularmente em clima temperado quente de regiões subtropicais em jardins como planta ornamental LABORDE(1997).

Os principais compostos encontrados na planta é a oleandrina a qual é muito estudada em suas reações cardiovasculares, mas há mais de dez outros glicosídeos cuja estrutura química é bem conhecida: como a oleandrina, oleandroside, digitoxigenina, oleasinas, adrenregena, entre outras LABORDE (1997). As concentrações observadas na literatura de oleandrina nas folhas, é em média de 4,89 mg/g PEDROZA (2015).

## METODOLOGIA

Um total de 17 espécies vegetais foram pré-selecionadas e coletadas, em 07/07/2017 no estado do Paraná.

Com as plantas deixadas em contato com etanol 80 % (m/m), seguindo a proporção de 10 % de planta em massa, realizou-se a extração por turbólise e deixou-se em contato com o etanol em média por 48 horas. Posteriormente filtrou-se o EB e rota-evaporou o solvente com pressão reduzida com a temperatura mantida em 40 ° C, a parte aquosa restante foi congelada e liofilizada. A partir do extrato bruto, entre aqueles que houve evidência de alcaloides, foi feito a extração de alcaloides totais pelo método ácido-base com solvente orgânico em funil de separação.

Foram realizadas extrações de alcaloides totais com extrato bruto de cada planta. O extrato bruto seco foi colocado em um béquer com de ácido clorídrico 0,1 mol/L sob agitação durante 30 min. Após filtrado, recolheu-se as soluções aquosa de ácidos minerais em um funil de separação, onde os alcaloides se encontram na forma de sal. A solução aquosa foi então extraída três vezes com n-hexano para a remoção de substâncias lipofílicas. As fases foram reunidas e secas com sulfato de anidro, e concentrada por pressão reduzida. A fase ácida foi

alcalinizada até o pH 9-10, utilizando hidróxido de sódio como agente alcalinizante, assim extraída em várias porções de clorofórmio até que o teste do reagente Dragendorff se tornar negativo, o que indica o esgotamento dos alcalóides. A fase clorofórmica foi seca com sulfato de anidro e concentrada em rotaevaporador até a retirada de todo o solvente orgânico.

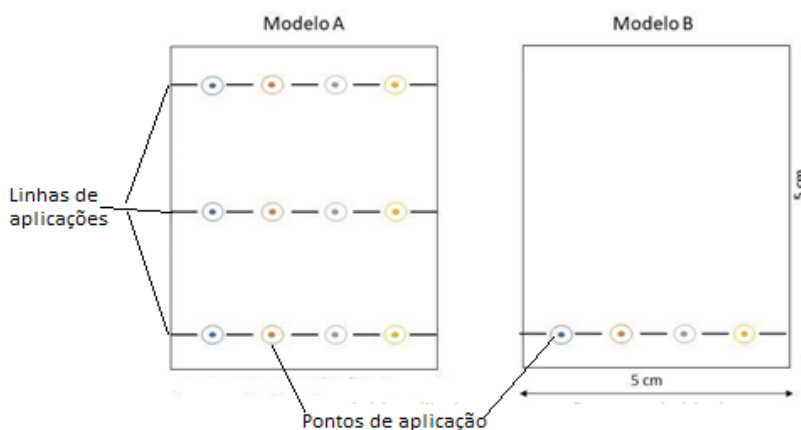
Preferiu-se extrair por uma partição líquido-líquido em quatro frações com polaridade distintas, as espécies que previamente não foi comprovada a existência de alcalóides. Em um tubo de ensaio, foi suspenso o extrato bruto seco de cada planta em de metanol/água (1:3) a solução foi extraída três vezes em n- hexano, para a remoção das substâncias mais apolares. Posteriormente, extraiu-se novamente a solução hidrometanólica três vezes em acetato de etila para a remoção das substâncias pouco polares. As frações hidrometanolica foram secas por pressão reduzida, congeladas e liofilizadas.

Foram preparadas soluções tampão para não permitir variações excessivas no pH. Em seguida foi preparado o Iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado nos ensaios nas concentrações 15 mM em água ultrapura. Dilui-se Iodeto de acetiltiocolina (289,18 g/mol) em água ultrapura. Para o preparo do reagente colorimétrico, utilizou-se o ácido 5,5'-ditiobis-2- nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®), foi utilizado nos ensaios nas concentrações 3 mM em solução tamponada.

A enzima AChE liofilizada foi dissolvida na solução tampão Tris 50 mM, pH 8,0, para se fazer uma solução estoque, deixando-se na solução por 20 min, depois sob agitação por mais um período de 10-15 min, para obtenção de uma solução homogênea. Para as diluições posteriores, utilizar-se-á a solução tampão Tris 50 mM, pH 8,0 contendo 0,1 % de soro albumina bovina (BSA).

As frações separadas de cada planta previamente, foram aplicadas em cromatografia em camada delgada (CCD) em dois formatos, como exemplifica o esquema 1. No modelo (A), cada fração foi aplicada em três pontos paralelos em formato de triplicata. No segundo modelo (B), cada fração foi aplicada com 1 cm após o início da CCD e posteriormente houve a migração das substâncias na placa com o eluente hexano/clorofórmio/metanol (3:3:1) respectivamente, para dessa forma cada fração foi semi purificadas por cromatografia em camada delgada previamente há revelação com o reagente de Ellman.

Esquema 1: Modelos utilizado na cromatografia em camada delgada



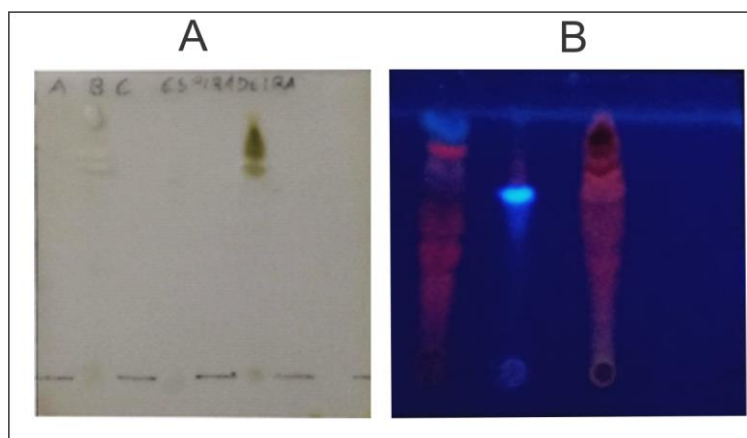
Fonte: autoria própria (2018).

Teste positivo: O ensaio será realizado conforme Rhee e colaboradores (2003). As amostras serão aplicadas em placas de CCD e após o desenvolvimento com o solvente adequado, as placas foram secas. Uma mistura de solução do substrato iodeto de acetilcolina 15 mM e do reagente de Ellman, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 1 mM, será borrifada sobre a placa. Após completa secagem da placa, a solução de enzima AChE foi borrifada esperando-se até o desenvolvimento de manchas brancas sob um fundo amarelo que indica a presença de compostos inibidores da enzima acetilcolinesterase.

## RESULTADOS

Dentro dos métodos utilizados, chegamos a um resultado muito importante, como podemos observar nitidamente na imagem 1(A) a existência de pontos brancos como resultado da migração de substâncias, esse ponto em questão é onde está localizado o composto de interesse, já na imagem 1(B) podemos observar a existência de várias manchas coloridas, o que resultado de quando levamos a placa até a câmara uv (365 nm), onde está organizado da seguinte forma, da direita para a esquerda: estrato bruto, composto de atividade com maior pureza, porção apolar da espécie vegetal. Indicando assim o composto de interesse em um tom azul luminescente.

Imagem 1: Da direita (A) placa de CCD espirradeira com as devidas frações em luz natural, Da esquerda placa de CCD espirradeira com as devidas frações em câmara uv.



Fonte: Autoria própria (2018).

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, o objetivo inicial do trabalho foi alcançado com êxito pois a espécie em questão apresentou atividade anticolinesterásica, sendo esse um grande avanço para futuras descobertas do gênero, as quais podem vir a somar como um banco de dados, nos orientando um possível norte para a descoberta de compostos mais efetivos para o tratamento da Doença de Alzheimer, seja aplicando o método em outras espécies ou apenas isolando os compostos inibidores da espécie apresenta nesse estudo.





## REFERÊNCIAS

FRANÇA, Inácia Sátiro Xavier de et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais: Popular medicine: benefits and drawbacks of medicinal plants. **Revista Brasileira de Enfermagem REBEn**, Brasília, v. 61, n. 2, p. 201-208, mar. [abril 2008]. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/2670/267019607010/>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

MACIEL, Maria Aparecida M. et al. PLANTAS MEDICINAIS: A NECESSIDADE DE ESTUDOS MULTIDISCIPLINARES. **QUÍMICA NOVA**, [S.l.], v. 25, n. 3, p. 429-438, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/qn/v25n3/9337.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

BRAZ-FILHO, Raimundo. Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas, A Peregrinação de um Pacatubano.: Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. **QUÍMICA NOVA**, Itaguaí - RJ, v. 17, n. 5, p. 405-445, maio. 1994. Disponível em: <[http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol17No5\\_405\\_v17\\_n5\\_%289%29.pdf](http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol17No5_405_v17_n5_%289%29.pdf)>. Acesso em: 15 ago. 2018.

FILHO, Valdir Cechinel; YUNES, Rosendo A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **QUÍMICA NOVA**, Itajaí - SC, v. 21, n. 1, p. 99-105, jan. 1998. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v21n1/3475>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

SEIDL, CLAUDIA. **PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS INIBIDORAS DA ACETILCOLINESTERASE**. 2010. 86 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2010. Disponível em:<<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/24086/Claudia%20Seidl.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

HAMDAN, Amer Cavalheiro. AVALIAÇÃO NEUROPSICOLÓGICA NA DOENÇA DE ALZHEIMER E NO COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE. **Psicologia Argumento**, [S.l.], v. 26, n. 54, p. 183-192, set. 2008. Disponível em: <<https://periodicos.pucpr.br/index.php/psicologiaargumento/article/view/19649>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

BONO, GLEYSE FREIRE. **INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A BUTIRILCOLINESTERASE E A DOENÇA DE ALZHEIMER**. 2014. 106 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Genética.) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2014. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/36045/R%20-%20D%20-%20GLEYSE%20FREIRE%20BONO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 15 ago. 2018.



ARAÚJO, Cleônia Roberta M.; SANTOS, Victória L. A.; GONSALVES, Arlan A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, [S.l.], v. 8, n. 6, p. 1818-1834, nov. 2016. Disponível em: <<http://rvq.s bq.org.br/imagebank/pdf/v8n6a04.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

LABORDE, Dr A.; LEON, Christine. **Nerium oleander L. (PIM 366)**. 1997. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/pims/plant/pim366.htm>>. Acesso em: 19 ago. 2018.

PEDROZA, Heloisa de Paula et al. Concentrações de oleandrina nas folhas de Nerium oleander de diferentes cores da floração. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 5, p. 1-3, maio. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140885>>. Acesso em: 28 ago. 2018.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação- PROPPG - UTFPR pelo apoio financeiro.