

Avaliação preliminar da atividade anticolinesterásica da espécie *Picrasma crenata* (Vell.) Engl.

Preliminary evaluation of the anticholinesterase activity of the species *Picrasma crenata* (Vell.) Engl.

Jhefferson Luiz Schiavini
Jheffluiz.s@outlook.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Luciano Jose Soave
luciano.soave.22@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Alexandre da Trindade Alfaro
alexandre@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Cláudio Roberto Novello
crnovello@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

RESUMO

A população mundial está cada vez mais longínqua devido ao aumento da expectativa de vida. Entretanto, doenças relacionadas à idade permanecem sem cura ou tratamentos definitivos, podendo se tornar um problema de saúde pública de nível mundial. O mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa complexa, multifatorial e progressiva, sendo caracterizada por alterações nas funções cognitivas de aprendizado, memória e alterações comportamentais, tendo uma maior recorrência em pessoas acima de 65 anos. Os inibidores da enzima acetilcolinesterase constituem o principal tratamento da doença. As espécies vegetais são excelentes fontes de substâncias naturais com potencial anticolinesterásico. O objetivo desse trabalho foi contribuir na busca de novas substâncias naturais com potencial anticolinesterásico aproveitando a rica biodiversidade da região. A espécie *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. também conhecida popularmente como Pau Tenente, pelos seus princípios ativos amargos e diversas atividades biológicas, como antitumoral, antiúlcera e antimalária. Em ensaios fotométricos pelo método de Ellman, a fração hexânica da espécie *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. apresentou um IC₅₀ 748,7 µg/mL, resultado promissor na atividade anticolinesterásica.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Alzheimer. Anticolinesterásico. *Picrasma crenata*(Vell.) Engl.

ABSTRACT

The world's population is increasingly distant due to the increase in life expectancy. However, age-related diseases remain uncured or without definitive treatments, and may become a worldwide public health problem. Alzheimer's disease is a complex, multifactorial and progressive neurodegenerative disease characterized by changes in the cognitive functions of learning, memory and behavioral changes, with a greater recurrence in people over 65 years of age. Acetylcholinesterase inhibitors are the main treatment of the disease. Plant species are excellent sources of natural substances with anticholinesterase potential. The objective of this work was to contribute to the search for new natural substances with anticholinesteric potential, taking advantage of the rich biodiversity of the region. The species *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. also popularly known as Pau Tenente, for its bitter active principles and various related biological activities such as antitumor, antiulcer and antimalarial. In photometric tests by the Ellman method, the hexane fraction of the species *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. presented an IC₅₀ 748.7 µg/mL, promising result in anticholinesterase activity.

KEYWORDS: Alzheimer's disease. Anticholinesterase. *Picrasma crenata* (Vell.) Engl.

Recebido: 31 aug. 2018.

Aprovado: 04 out. 2018.

Direito autorial:

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





INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida e simultaneamente o aumento da população idosa, as doenças relacionadas à idade, muito das quais ainda prevalecem sem cura ou tratamento eficaz, têm-se tornado um problema de saúde pública mundial. Em quase todos os países, a proporção de pessoas acima de 60 anos está crescendo mais expressivamente do que qualquer outro grupo etário, consequência da baixa taxa de fecundidade e aumento da expectativa de vida. Nos Estados Unidos da América espera-se que a população acima dos 65 anos atinja os 72 milhões por volta do ano de 2030 (NIA, 2009). No Brasil, segundo a Projeção da população por sexo e idade, ano a ano até 2060 (2018), estima-se que um quarto da população terá mais de 65 anos em 2060 chegando há 58,2 milhões de idosos, enquanto em 2018 essa relação é de 19,2 milhões de idosos, enquanto a expectativa de vida média brasileira para ambos os sexos alcançará 84,5 anos no mesmo ano. Espera-se que a população brasileira atinja o chamado “crescimento zero” por volta de 2047 quando chegará a 233,2 milhões de pessoas, apresentando, a partir desse ano apenas taxas de crescimentos negativos (IBGE, 2018).

O mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa complexa sendo a causa mais comum de demência em pessoas idosas, cerca de 10 % das pessoas acima de 65 anos são afetadas e chegando a 50 % das pessoas acima de 85 anos (Orhan et al., 2006; Racchi et al., 2004; Reichman, 2003; Viegas et al., 2005). O número de pacientes com a doença tende a aumentar proporcionalmente ao crescente aumento da expectativa de vida juntamente com o aumento da população idosa. Segundo a Organização Mundial de saúde, estima-se que 34 milhões de pessoas poderão apresentar algum grau da doença de Alzheimer em 2025 o que a torna assim, um problema de saúde pública mundial (Reichman, 2003; Viegas et al., 2005; SEIDL, 2010).

A doença de Alzheimer (DA), foi descrita primeiramente pelo médico patologista alemão Alois Alzheimer em 1907. A DA tem etiologia ainda não totalmente conhecida, associada com a redução dos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, noradrenalina e a serotonina (Bryne et al., 1998). Esta doença neurodegenerativa atinge primeiramente a memória e, posteriormente traz mudanças comportamentais e de personalidade, tendo um declínio das habilidades intelectuais e a capacidade de raciocínio e comunicação (Anekonda, 2005; Viegas et al., 2005). As regiões cerebrais associadas com as funções mentais superiores, o neocortex e hipocampo, são os locais mais afetados pelas mudanças bioquímicas relacionadas a doença (Reichman, 2003; Viegas et al., 2005).

Medicamentos baseados na hipótese colinérgica são os que têm apresentado melhores resultados no tratamento clínico da doença nos casos considerados leves e moderados. Esta hipótese descreve que a deficiência de acetilcolina (ACh) é produzida pela DA pela atrofia do nucleus basalis de Meynert, o qual é a fonte produtora da enzima colina acetiltransferase (CAT). Essa enzima é transportada para o sistema límbico onde ela catalisa a reação de síntese da ACh a partir da colina e da acetilcoenzima A. Depois de formada, a ACh é liberada na fenda sináptica, onde poderá ser acoplada a dois tipos de receptores, o muscarínico e o nicotínico. A ACh restante é degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) na fenda sináptica. Na DA, existe uma atrofia no nucleus basalis, resultando na



diminuição da síntese da CAT e, conseqüentemente, da ACh. Por esse motivo, a estratégia adotada no desenvolvimento das drogas para o tratamento da DA é a de aprimorar a função colinérgica. Níveis sinápticos de ACh podem ser aumentados inibindo a AChE, usando precursores de ACh, aumentando a liberação de ACh ou estimulando os receptores pós-sinápticos (Minett e Bertolucci, 2000). Por isso, a persistente investigação para a descobertas de inibidores de AChE e a resposta positiva do tratamento contribuem para o surgimento de novos anticolinesterásicos no mercado (Orhan et al., 2006; SEIDL, 2010).

A atuação de drogas no tratamento da DA está associada uma série de dificuldades: baixa biodisponibilidade, efeitos benéficos apenas em altas dosagens devido absorção do sistema ser pobre, e graves efeitos colaterais, sendo que a maior parte da absorção é por células normais além da dificuldade em penetrar a restritiva barreira hemato-encefálica (Mufamadi et al, 2013). A barreira hemato-encefálica restringe a entrada de moléculas grande no sistema nervosa central, enquanto facilita a passagem de moléculas menores e lipofílicas, nutrientes e peptídeos através dos transportadores endógenos (Pardridge, 2005).

Por conseguinte, a situação atual requer a prospecção de novas drogas para o tratamento do mal de Alzheimer. Derivados de plantas, extratos e óleos, são amplamente conhecidos pela sua diversidade química e pela sua variada aplicação biológica. As plantas constituem-se em uma rica fonte de bioativos químicos, sendo que o conhecimento popular sobre o uso e a eficácia destas contribui de forma relevante para a divulgação de suas propriedades (Simões et al., 2010). Os alcaloides são grandes candidatos para novos protótipos de inibidores de acetilcolinesterase, sendo o grupo de substância mais amplamente estudados. Em uma revisão realizada por Barbosa-Filho e colaboradores, consultaram-se 175 referências e foram relatadas que entre 260 das substâncias isoladas e identificadas com potencial anticolinesterásico, 53,5% pertenciam à classe dos alcaloides (Barbosa-Filho et al., 2006). Como a maioria dos inibidores de acetilcolinesterase apresentam nitrogênio em sua estrutura, a elevada atividade dos extratos parece estar correlacionada com uma rica presença de alcaloides nas plantas. As plantas brasileiras, dada a sua grande biodiversidade, podem desempenhar um papel fundamental na busca de drogas inibidoras de AChE com ação prolongada, maior potência e menores riscos de efeitos colaterais (Howes e Houghton, 2003; Khalid et al., 2004).

Diante deste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar preliminarmente a atividade anticolinesterásica da espécie vegetal *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. da família Simaroubaceae. Esta espécie, popularmente conhecida como pau-tenente, é rica em quassinóides, princípios ativos amargos com diversas atividades biológicas associadas como antitumoral, antiúlcera e antimalária (NOVELLO, 2002).

METODOLOGIA

A espécie vegetal *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. foi coletada na Serra do Cadeado, município de Ortigueira-PR. O lenho sem cascas foi colocado em contato com etanol 80% (m/m), seguindo a proporção de 10% de planta em massa, realizou-se a extração por turbólise e deixou em contato com o etanol em média de 48 horas. Posteriormente filtrou-se e rota-evaporou o solvente com pressão



reduzida e a temperatura foi mantida a 40 °C, a parte aquosa restante foi congelada e liofilizada.

A partir do extrato bruto (EB), foi realizado a extração de alcaloides totais pelo método ácido-base com solvente orgânico em funil de separação realizado segundo (Rinaldi, 2007).

Para o ensaio em microplaca de extrato bruto e frações foi preparado uma solução mãe (10 mg/mL) em metanol p. a. e as diluições subsequentes foram feitas utilizando água MilliQ (5 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,1 mg/mL e 0,05 mg/mL). Cada concentração foi analisada em triplicata e a porcentagem de inibição calculada.

Para a reação enzimática no ensaio de microplaca, utilizou-se leitora de microplacas com absorbância ajustada a 405 nm, de acordo com o método de Elman (Rhee et al., 2001). Nas 96 cavidades da placa, foram adicionados 25 µL de iodeto de acetilcolina 15 mM, 125 µL de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] 3 mM); 50 µL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 8, contendo 0,1% de BSA, 25 µL da amostra analisada, dissolvida em MeOH, diluída 10 vezes em tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 8; mediu-se a absorbância a cada 10 segundos por 10 vezes. Foram adicionados 25 µL da enzima (0,22 U/mL) e mediu-se novamente a absorbância a cada 10 segundos por 10 vezes. Foram calculadas as velocidades das reações utilizando-se a curva obtida. Foram corrigidos os aumentos em absorbância, devido à hidrólise espontânea, por meio da subtração da velocidade da reação antes de se adicionar a enzima com a velocidade da reação depois de se adicionar a enzima. Calculou-se a porcentagem de inibição pela comparação das velocidades das amostras em relação ao branco (10% MeOH em tampão no tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 8).

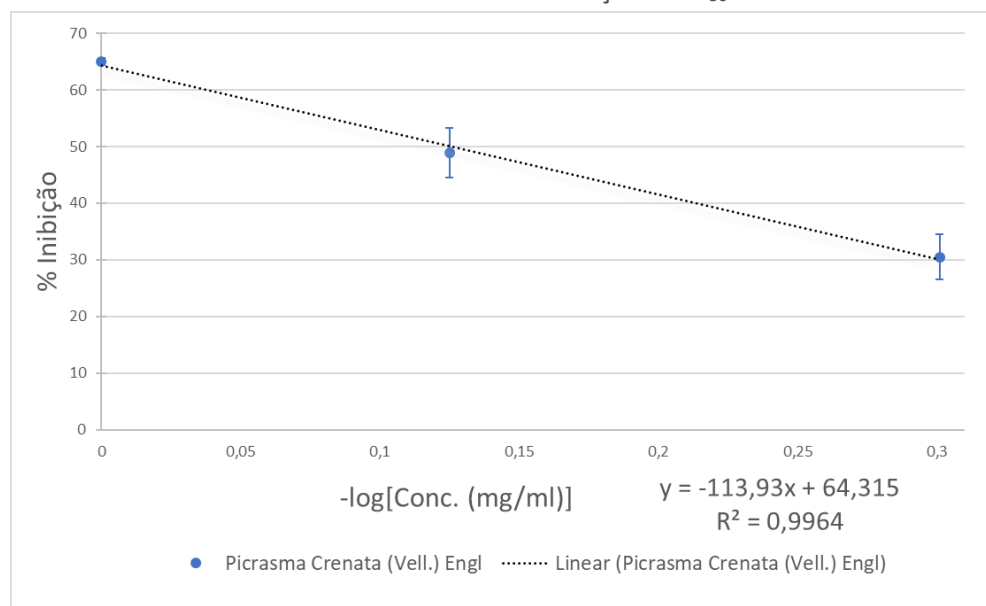
A curva de inibição foi obtida plotando-se a porcentagem de inibição em relação ao logaritmo negativo da concentração do inibidor presentes nas soluções do ensaio. Os parâmetros de regressão linear foram traçados, em software gráfico apropriado, para cada curva e o valor do IC₅₀ extrapolado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações da extração de alcaloides totais pelo método ácido-base do extrato bruto da espécie *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. forneceram um rendimento de 1,85% para a fração clorofórmica e 6,46% para a fração hexânica. A partir das frações, testou-se a bioautografia para alcaloides pelo reagente de *Dragendorff*, apresentando halo positivo para a fração clorofórmica rica em alcaloides, e halo negativo para a fração hexânica pobre em alcaloides.

O ensaio em microplaca utilizando o método de Ellman modificado por Rhee (Rhee et al., 2001), inusitadamente apresentou uma inibição de 66,17% na concentração de 1 mg/ml para a fração hexânica pobre em alcaloides enquanto para a fração clorofórmica rica em alcaloides não apresentou atividade nas concentrações avaliadas. Devido ao resultado promissor da fração hexânica, foi realizado outro teste com diferentes concentrações (1 mg/mL; 0,75 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,1 gm/mL) da fração hexânica em metanol. A partir dos percentuais de inibição encontrados, identificou-se a curva de inibição (Gráfico 1) plotando o % de inibição *versus* o logaritmo negativo da concentração das substâncias existentes na solução do ensaio, para a determinação do IC₅₀.

Gráfico 1 – Determinação do IC₅₀.



Fonte: Autoria própria (2018).

A partir da curva de inibição, os parâmetros de regressão linear foram traçados e os valores médios de IC₅₀ extrapolados para 748,7 µg/mL, obtido para a fração hexânica da espécie *Picroasma crenata* (Vell.) Engl.

Diante desse contexto, os resultados sugerem que a substância com atividade anticolinesterásica não é um alcaloide. Em uma pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase realizada por Claudia Seidl e colaboradores (2010), apresentou na triagem preliminar dos extratos em cromatografia de camada delgada para a espécie *Picroasma crenata* (Vell.) Engl. na concentração de 10 mg/mL, sutil mancha branca de inibição da solução contendo alcaloides (SEIDL, 2010). Como esta espécie é rica em quassinóides, com diversas atividades biológica associadas como antitumoral, antiúlcera e antimialárica (Novello, 2002), suspeita-se que a substância com atividade anticolinesterásica possa ser um quassinóide. Entre as substâncias na fração pode haver uma substância antagonista, devido aos resultados para as concentrações menores que 0,1 mg/mL apresentar indícios de ser um ativador da acetilcolinesterase. Com isso, o isolamento da substância com atividade anticolinesterásica pode vir apresentar resultados otimizados.

CONCLUSÕES

A fração hexânica da espécie *Picroasma crenata* (Vell.) Engl. Apresentou resultados promissores na avaliação colinesterásica. Devido ao possível efeito antagonista entre as substâncias, tornam-se indispensáveis o isolamento e a caracterização da substância que apresentou atividade anticolinesterásica. O isolamento será feito por cromatografia em coluna ou cromatografia preparativa planar e a caracterização por ressonância magnética nuclear.



REFERÊNCIAS

NIA, **Progress report on Alzheimer's disease: moving discovery forward.** National Institute of Aging. National institute of Health. U.S. Department of Health and Human Services. 52p. 2009.

IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de população e Indicadores Sociais. **Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período de 2000/2060.** 1 p. 2018. Disponível em: < <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/21837-projecao-da-populacao-2018-numero-de-habitantes-do-pais-deve-para-de-crescer-em-2047>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

ORHAN G, ORHAN I, SENER B 2006. **Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease.** Lett Drug Design Discov 3: 268-274[4] VIEGAS C, Bolzani VD, Barreiro EJ, Fraga CAM 2005. **New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: The role of the natural acetylcholinesterase inhibitors.** Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 5: 915-926.

RACCHI M, MAZZUCHELLI M, PORRELLO E, LANNI C, GOVONI S 2004. **Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules.** Pharmacol Res 50: 441-451.

REICHMAN WE 2003. **Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease.** Ann Gen Hospital Psychiatry 2: 1-14.

VIEGAS C, BOLZANI VD, BARREIRO EJ, FRAGA CAM 2005. **New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: The role of the natural acetylcholinesterase inhibitors.** Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 5: 915-926.

BRYNE, G. J. A.; **Treatment of cognitive impairment in Alzheimer's disease.** Australuan J Hospital Pharmacy, v. 28, p. 261-266, 1998.

SEIDL, C. **Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterases.** Diss. de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 85 fls., 2010.

RINALDI, M. V. N. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquiolínicos de annon hypoglauca Mart.** Diss. De mestrado, Universidade de São Paulo faculdade de ciências Farmacêuticas, São Paulo, SP., 2007.

REICHMAN, W. E.; **Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease.** Ann Gen Hospital Psychiatry v. 2, p. 1-14, 2003.



ANEKONDA TS, REDDY PH 2005. **Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease?** Brain Res Rev 50: 361-376.

MINETT, T. S. C.; BERTOLUCCI, P.H.F. **Terapia colinérgica na doença de Alzheimer.** Ver. Neurociências. v. 8, n. 1, p. 11-14, 2000.

MUFAMADI, M. S.; CHOONARA, Y. E.; KUMAR, P.; MODI, G.; NAIDOO, D.; VUUREN, S. V.; NDESENDO, V. M. K.; DU TOIT, L. C.; IYUKE, S. E.; PILLAY, V. **Ligand-functionalized nanoliposomes for targeted delivery of galantamine** Original International Journal of Pharmaceutics, v. 448, n. 1, p. 267-281, 2013.

PARDRIDGE, W. M. **The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development.** NeuroRx. v. 2, p. 3-14, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 4.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. da UFSC. Org. 2003.

BARBOSA-FILHO JM, MEDEIROS KCP, F.M. MDF, BATISTA LM, ATHAYDE-FILHO PF, SILVA MS, CUNHA EVLD, ALMEIDA JRGS, QUINTANS-JÚNIOR LJ 2006. **Natural Products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase.** Rev Bras Farmacogn 16: 258-285.

HOWES, M. J.; HOUGHTON, P. J.; **Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function.** Pharmacol Biochem Behav v. 75, p. 513- 527, 2003.

KHALID A.; ZAHEER-UL-HAQ; GHAYUR, M. N.; FERROZ, F.; ATTA-UR-RAHMAN, GILANI, A. H.; CHOUDHARY, M. I. **Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids.** Journal of Steroid Biochem v. 92, p. 477-484, 2004.

NOVELLO, C. R.; FERREIRA, A. G.; MARQUES, L. C.; CORTEZ, D. A. G. **Quassinoids from picrasma crenata.** Natural Prod Res. v. 17, n. 3, p. 145-148, 2002.

RHEE I. K.; VAN DE MENT M.; INGGANINAN K.; VERPOORTE R. **Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining.** J Chromatogr A 915: p. 217-223, 2001.

RHEE, I. K.; van RIIN R. M.; VERPOORTE, R. **Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography.** Phytochem Anal v. 14, p. 127-131. 2003b.



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.