

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO ANTICOLINESTERÁSICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Ocotea spixiana*

Janaína da Silva Ribeiro¹; Mariana Borges Botura²; Raquel Bianca Marchesine de Almeida³ e Rodrigo Souza Conceição⁴

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: janaafsa@gmail.com

2. Orientadora, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mbbotura@uefs.br

3. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelbma87@gmail.com

4. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rodrigoszcz@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Planta medicinal, *Ocotea spixiana*, butirilcolinesterase

INTRODUÇÃO

Os fármacos com ação anticolinesterásica têm sido utilizados no tratamento de doenças neurodegenerativas associadas à déficits de acetilcolina, principalmente da doença de Alzheimer. A maioria dos medicamentos disponíveis possuem afinidade apenas para a acetilcolinesterase (AChE), porém substâncias com capacidade de atuar sobre as duas colinesterases podem potencializar e prolongar o benefício do tratamento anticolinesterásico (Freitas *et al.*, 2009).

O gênero *Ocotea* representa um dos principais membros da família Lauraceae. No Brasil, este gênero é representado por cerca de 170 espécies distribuídas em várias regiões do Brasil, inclusive no Nordeste (Brotto e Baitello, 2012). Dentre as atividades biológicas relatadas para algumas espécies de *Ocotea*, pode-se destacar o efeito carrapaticida (Conceição *et al.*, 2017) e anticolinesterásico (Amoo *et al.*, 2012). Poucos relatos científicos têm sido encontrados sobre as atividades biológicas de *Ocotea spixiana*. Elevado efeito inibitório *in vitro* de diferentes extratos dessa espécie sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase foi descrito por Cassiano (2014).

O presente estudo teve como objetivos avaliar *in vitro* o efeito inibitório de frações de *O. spixiana* frente a butirilcolinesterase (BChE) e realizar a caracterização química da fração mais ativa.

METODOLOGIA

Coleta e identificação botânica: Caule de *O. spixiana* (aproximadamente 2 Kg) foram coletadas na região de Morro do Chapéu e identificadas no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), onde foi depositada a exsicata de número 205863.

Obtenção dos extratos: O material vegetal foi seco em estufa com temperatura controlada (40°C) e moído em moinho de facas (tipo Wiley). O material moído foi submetido à maceração com etanol e posteriormente filtrado. O extrato etanólico bruto foi fracionado por partição líquido-líquido com hexano e acetato de etila. Após este procedimento, os respectivos solventes foram evaporados utilizando rotoevaporador rotativo.

Avaliação *in vitro* da inibição da atividade da enzima butirilcolinesterase: O efeito do extrato bruto e frações de *O. spixiana* sobre a atividade da enzima butirilcolinesterase foi avaliado de acordo com o método de Ellman (1961) e modificado por Tan *et al.* (2014). A enzima utilizada foi a butirilcolinesterase obtida de soro equino. Nos poços de microplacas (96 poços) foram adicionados 140 µL de solução tampão fosfato contendo albumina sérica bovina (0,1%), 20 µL dos extratos em diferentes concentrações (diluídos em etanol a 10%), 20 µL da enzima (butirilcolinesterase 0,15 U/mL), e a placa foi incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 10 µL de solução de iodeto de butiriltiocolina (14 mM) e 10 µL de DTNB (10 mM). A eserina (50 µM) foi

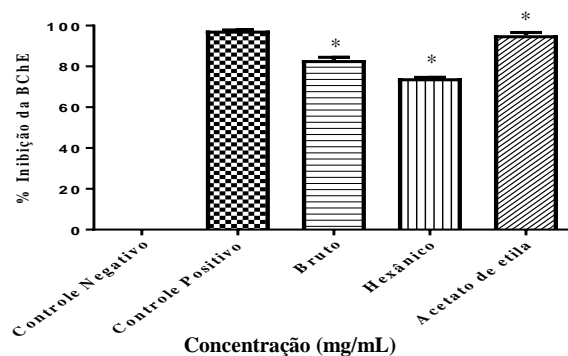
utilizada como controle positivo e os controles negativos consistiram na solução tampão fosfato 0,1 M e etanol (1%). A absorbância foi medida a 405 nm em leitor de microplaca nos tempos de 0 e 30 minutos. A porcentagem de inibição da colinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao controle negativo.

Caracterização química da fração mais ativa: A fração mais ativa (acetato de etila) foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC/DAD) em cromatógrafo líquido Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000, coluna ACE RP 18 (150 x 4,6 nm).

Análise Estatística: Os resultados foram avaliados pela ANOVA seguido do teste de Tukey ($p > 0,0001$), utilizando o programa estatístico Graphprism (versão 5.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação *in vitro* do efeito inibitório do extrato bruto e frações da *O. spixiana* sobre a atividade da butirilcolinesterase (BChE), foi observado, na maior concentração testada (1 mg/mL), os seguintes percentuais de inibição: 83,14; 74,22 e 95,29% para o extrato bruto e frações hexânica e acetato de etila, respectivamente (Figura 1). Todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle negativo (etanol 1%) ($p > 0,0001$).



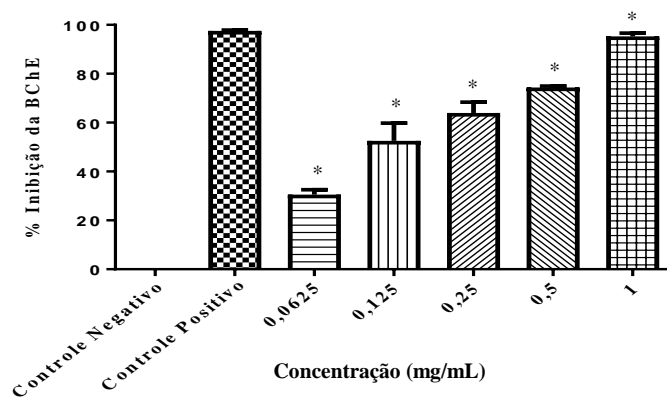
* $p > 0,0001$ comparado ao Controle Negativo

Figura 1: Média e desvio padrão do percentual de inibição da atividade da butirilcolinesterase após exposição ao extrato bruto e frações hexânica e acetato de etila de *Ocotea spixiana*

A fração acetato de etila apresentou melhor atividade inibitória sobre a BChE, e foi selecionada para a realização de novos ensaios com diferentes concentrações (0,0625 a 1 mg/mL) para avaliação da relação concentração-dependência. Na figura 2, observa-se um aumento do efeito inibitório da fração acetato de etila frente a BChE em concentrações mais elevadas, demonstrando uma ação concentração-dependente. Os resultados desta fração na concentração de 1 mg/mL não diferiram estatisticamente ($p > 0,0001$) do controle positivo (eserina/50 μ M).

De acordo com Vinutha *et al.* (2007), a atividade anticolinesterásica de um extrato pode ser considerada como potente quando o percentual de inibição da atividade enzimática for maior ou igual a 50%, moderada quando estiver entre 30 e 50% e fraca quando menor que 30%. No presente estudo, os tratamentos com o extrato e frações de *O. spixiana* resultaram em inibição da BChE superior a 50%. O estudo anterior sobre o efeito *in vitro* de extratos das folhas de *O. spixiana* (1 mg/mL) frente a acetilcolinesterase também revelou atividade anticolinesterásica para os seguintes extratos: etanólico (45,79%), hexânico (58,55%) e acetato de etila (50,73%) (Cassiano, 2014). No entanto, esses percentuais de inibição foram inferiores aos resultados encontrados no presente trabalho. Estas variações podem estar

relacionadas com as diferenças do material vegetal (folhas e caule) e com o tipo de colinesterase avaliada.



* $p > 0,0001$ comparado ao Controle Negativo

Figura 2: Média e desvio padrão do percentual de inibição da atividade da butirilcolinesterase após exposição à fração acetato de etila de *Ocotea spixiana*

A fração de *O. spixiana* mais ativa (acetato de etila) foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e foi possível identificar a presença dos compostos benzaldeído, galoil éster (tanino) e calycosin (isoflavona). A identificação destas substâncias (Figura 3) foi realizada com base na análise dos seus espectros em comparação com dados da literatura (Tabela 1). Outros estudos têm relatado a presença de compostos fenólicos associados ao efeito anticolinesterásico (Cassiano, 2014) e isoflavonas com ação bactericida (Oliveira, 2014) em espécies de *Ocotea*.

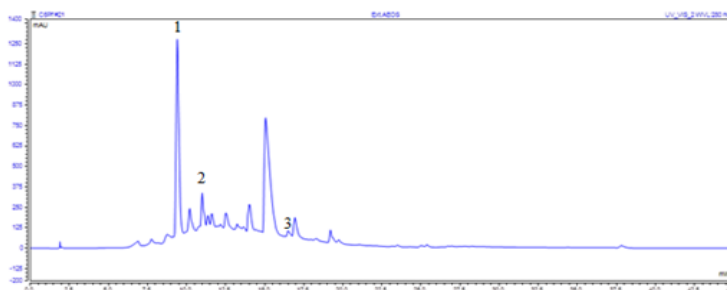


Figura 3: Cromatograma (HPLC-DAD) obtido a partir da fração acetato de etila de *Ocotea spixiana*

Tabela 1. Identificação dos compostos a partir da fração acetato de etila de *Ocotea spixiana*.

Picos	Tr (min)	UV λ_{max} (nm)	Identificação	Referência
1	9,39	242,5 - 281,7	Benzaldeído	Kumar <i>et al.</i> (2006)
2	11,01	225,3 - 281,8	Galoil éster	Bochi <i>et al.</i> (2015)
3	16,51	230,6 - 267,3	Calycosin	Yen <i>et al.</i> (2012)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que a espécie *Ocotea spixiana* possui pronunciado efeito inibitório *in vitro* frente a enzima butirilcolinesterase,

sendo a fração acetato de etila a mais ativa. A análise química desta fração indicou a presença de compostos fenólicos, que podem estar associados com o efeito anticolinesterásico desta espécie vegetal.

REFERÊNCIAS

- AMOO, S.O. 2012. Antioxidant and acetylcholinesterase-inhibitory properties of long-term stored medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12(1): 1-9.
- BOCHI, V. S.; GODOY, H. T.; GIUSTI, M. M. 2015. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. *Food Chemistry* 176(5): 234-243.
- BROTTO, M.L., BAITELLO, J.B. 2012. Uma espécie nova de Lauraceae da floresta atlântica do Brasil. *Rodriguésia* 63(3): 579-585.
- CASSIANO, D. S. A. 2014. Estudo bioguiado através da atividade anticolinesterásica e da análise por CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM/EM DE *Ocotea* spp. (Lauraceae). Universidade Estadual de Feira de Santana, Tese.
- CONCEIÇÃO, R.S. 2017. *In vitro* acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. *Ticks and Tick-borne Diseases* 8: 275–282.
- ELLMAN, G. L. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* (7): 88-95.
- FREITAS, H. F.; PAZ, O. S.; CASTILHO, M. S. 2009. Estudos de QSAR 3D para um conjunto de inibidores de butirilcolinesterase humana. *Química Nova* 32(8): 13-22.
- KUMAR, S. 2006. Spectroscopy of Organic Compounds in Organic Chemistry. India: Ebooks.
- OLIVEIRA, R. P. R. F. 2014. Desenvolvimento de nanoemulsões contendo flavonoides de *Ocotea notata* (Nees) Mez e avaliação de atividades biológicas. Universidade Federal Fluminense, Tese.
- TAN, W.N.; KHAIRUDDEAN, M.; WONG, K.C.; KHAW, K.Y.; VIKNESWARAN, M. 2014. New cholinesterase inhibitors from *Garcinia atroviridis*. *Fitoterapia* 97: 261–267.
- VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S. L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMITA, A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. 2007. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 109(3) 65-71.
- YEN, M.; YANG, W. Z.; X, D. K. CHENG, B. J.; FENG, J. A.; ZHAON, Y.Y. 2012. Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var. *hirsutissima*. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 24(2) 35–42.