

# **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE FRAÇÕES DE *O. glaziovii* FRENTE ÀS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE**

**Camila dos Santos Silva<sup>1</sup>; Mariana Borges Botura<sup>2</sup>; Raquel Bianca Marchesine de Almeida<sup>3</sup> e Rodrigo Souza Conceição<sup>4</sup>**

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mila.css@hotmail.com
2. Orientador, 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:** Ocotea; acetilcolinesterase; butirilcolinesterase.

## **INTRODUÇÃO**

As enzimas coletivamente conhecidas como colinesterases são responsáveis pela degradação da acetilcolina. Os dois tipos de colinesterases, a acetilcolinesterase (colinesterase específica ou eritrocitária) e a butirilcolinesterase, também denominada como pseudocolinesterase ou colinesterase inespecífica estão amplamente distribuídas pelo organismo. A acetilcolinesterase (AChE) é indispensável na degradação da acetilcolina, enquanto que a butirilcolinesterase (BuChE) desempenha um papel secundário na hidrólise deste neurotransmissor (GOLAN, 2014).

Os inibidores das colinesterases, os quais aumentam a função colinérgica central, são utilizados no tratamento de enfermidades neurodegenerativas, principalmente a Doença de Alzheimer (MOTA et al., 2012). O interesse em descobrir novas alternativas de tratamento para a Doença de Alzheimer tem impulsionado pesquisadores em diversas partes do mundo a realizarem testes *in vitro* e *in vivo* com produtos de origem natural para avaliar a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

O limitado número de fármacos anticolinesterásicos associado à ocorrência de efeitos adversos e elevado custo econômico, tem estimulado a pesquisa com plantas que apresentem efeito inibitório sobre a atividade das colinesterases (XIE et al., 2013). Um importante gênero de plantas encontrado no Brasil é o gênero *Ocotea*, que tem sido associado com diversas atividades farmacológicas. Investigações científicas observaram que as espécies *O. bullata*, *O. minor* e *O. ceanothifolia* apresentam ação inibitória *in vitro* sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AMOO et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2012).

Elevado efeito anticolinesterásico do extrato etanólico de *O. glaziovii* frente às duas colinesterases foram relatados por Lima (2016). O presente trabalho teve como objetivos avaliar *in vitro* o efeito inibitório de frações obtidas do extrato etanólico de *O. glaziovii* sobre as enzimas AChE e BuChE.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção do extrato etanólico de *O. glaziovii***

As folhas de *O. glaziovii* foram secas em estufa com temperatura controlada (40°C) e moídas em moinho de facas (tipo Wiley). O material moído foi submetido à maceração com etanol durante três dias. Após a extração, o solvente foi evaporado utilizando rotoevaporador rotativo.

### **Fracionamento do extrato etanólico de *Ocotea glaziovii***

O extrato etanólico de *O. glaziovii* (20 g) foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna (CC) utilizando-se sílica gel 60 (70-230 mesh, VETEC) como fase estacionária. O material foi eluído com os solventes hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade para obtenção das frações (52 frações). As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como eluente os seguintes sistemas de solvente: acetato de etila/hexano (5:5), acetato de etila/hexano (7:3), acetato de etila/hexano (8:2). Conforme o rendimento e perfil químico, foram selecionadas e unidas as seguintes frações: 16, 17 e 18 (Fração 6); 19, 20 e 21 (Fração 7); 28, 29 e 30 (Fração 8); 31, 32, 33 e 34 (Fração 9); 44, 45 e 46 (Fração 10).

### **Avaliação *in vitro* da atividade anticolinesterásica**

As atividades da AChE e da BuChE foram avaliadas de acordo com o método de Ellman (1961) modificado por Tan et al. (2014). O método de Ellman baseia-se na conversão da acetiltiocolina em tiocolina, a qual é catalisada pelas colinesterases. O produto da reação (tiocolina) interage com o DTNB, ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), formando um ânion amarelo cuja absorvância é medida em espectrofotômetro em 405 nm. Nestes ensaios *in vitro* foram utilizadas as enzimas acetilcolinesterase (*Electrophorus electricus* tipo VI) e butirilcolinesterase (enzima obtida de soro equino) adquiridas comercialmente da Sigma-Aldrich®.

Em microplacas de 96 poços foram pipetados 140µL de tampão fosfato 0,1M contendo albumina bovina sérica (BSA) 0,1%, 20µL da amostra (frações, 2mg/mL), controle positivo (eserina 500 µM) ou controles negativos (etanol a 10% e tampão fosfato) e 20µL da enzima acetilcolinesterase (AChE - 0,15 U/mL) diluída em tampão fosfato 0,1M. Após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 10µL de DTNB 10mM e 10µL de acetiltiocolina (ACTI) 14mM. O mesmo procedimento foi realizado para o ensaio de inibição da BuChE, com exceção da enzima e substrato utilizados: BuChE (0,15 U/mL) e butiriltiocolina (S-butiltiocolina) à 14 mM. As absorvâncias da reação enzimática foram obtidas a 405 nm em leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific®) nos tempos 0 e 30 min.

O percentual da atividade enzimática foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula: % Inibição =  $\{1 - [(T_{30} - T_0 \text{ amostra}) / (T_{30} - T_0 \text{ CN/TF})]\} \times 100$ .

% A = percentual de atividade enzimática;

T<sub>0</sub>: leitura da absorvância após o início da reação;

T<sub>30</sub>: leitura da absorvância no tempo de 30 minutos após o tempo da primeira leitura (T<sub>30</sub>).

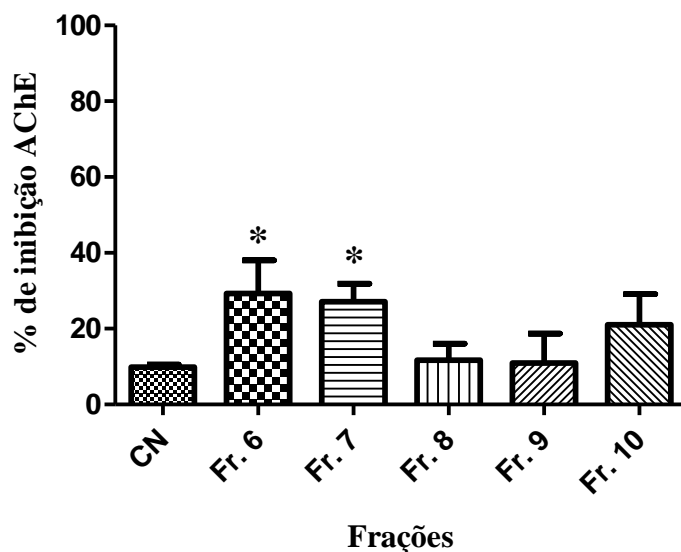
### **Análise Estatística**

Os resultados foram avaliados pela ANOVA seguido do teste de Tukey (5%) utilizando o programa estatístico Graphprism (versão 5.0).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O processo de fracionamento do extrato etanólico de *O. glaziovii* resultou na obtenção de 52 frações que foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada. Conforme o rendimento e perfil químico foram selecionadas e unidas as seguintes frações: 16, 17 e 18 (Fração 6); 19, 20 e 21 (Fração 7); 28, 29 e 30 (Fração 8); 31, 32, 33 e 34 (Fração 9); 44, 45 e 46 (Fração 10).

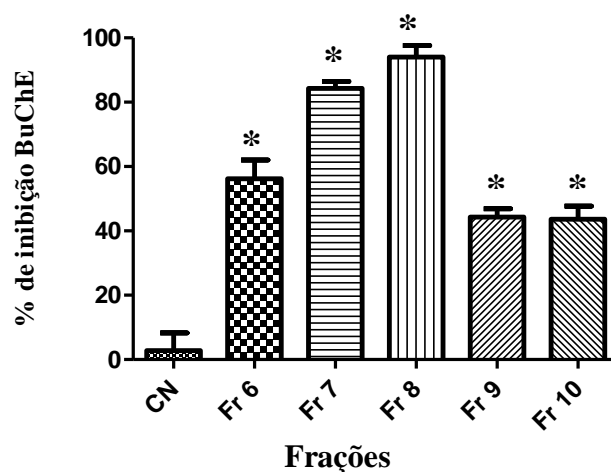
A figura 1 apresenta os percentuais de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) após o tratamento com as frações de *O. glaziovii*, na concentração de 2 mg/mL. Apenas as frações 6 e 7 promoveram redução significativa da atividade da AChE em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), sendo observado os seguintes percentuais de inibição: 29,33; 27,10; 11,71; 10,95 e 21,03 % para as frações 6, 7, 8, 9 e 10, respectivamente.



\*  $p < 0,05$  comparado ao Controle Negativo

**Figura 1:** Média e desvio padrão do percentual de inibição da atividade da acetilcolinesterase após exposição às frações de *Ocotea glaziovii*

Na avaliação do efeito das frações frente à enzima butirilcolinesterase (BuChE), observou-se que os tratamentos com todas as frações resultaram em inibição da atividade da BuChE, diferindo estatisticamente do controle negativo ( $p < 0,05$ ). As frações 7 e 8 foram as mais ativas, com percentuais de inibição igual a 84,29 e 94,08%, respectivamente (Figura 2).



\*  $p < 0,05$  comparado ao Controle Negativo

**Figura 2:** Média e desvio padrão do percentual de inibição da atividade da butirilcolinesterase após exposição às frações de *Ocotea glaziovii*

A classificação da potência da atividade anticolinesterásica de extratos de plantas proposta por Vinutha et al. (2007), considera como inibidores potentes quando o percentual de inibição for maior que 50%, inibidores moderados com percentuais de inibição entre 30-

50% e inibidores fracos com percentuais de inibição menor 30%. Conforme este parâmetro, pode-se inferir que todas frações avaliadas são inibidores fracos da AChE e as frações 6, 7 e 8 são inibidores potentes da BuChE. Estudos prévios realizados com o extrato etanólico de *O. glaziovii*, extrato utilizado para a obtenção das frações deste estudo, demonstraram elevada atividade anticolinesterásica sobre a AChE (99,3%) e BuChE (87,7%) (LIMA, 2016). Estes dados diferem dos resultados obtidos no presente trabalho, no qual observou-se alta atividade apenas sobre a BuChE. Essas diferenças podem estar relacionadas com as diferenças na composição química entre o extrato e as frações avaliadas.

Durante o desenvolvimento da Doença de Alzheimer há um declínio dos níveis de expressão de AChE, associada a uma marcante elevação dos níveis de BuChE. Esses resultados sugerem que, em pacientes com Doença de Alzheimer, os níveis de acetilcolina sejam controlados, principalmente, pela BuChE. Nesse contexto, fármacos que inibam tanto AChE quanto BuChE podem ter efeitos benéficos no tratamento sintomático de DA (FREITAS; PAZ; CASTILHO, 2009). As frações de *O. glaziovii* foram mais ativas frente à enzima BuChE em comparação com a AChE. Este achado pode estar relacionado com diferenças nas estruturas da AChE e BuChE. Freitas; Paz; Castilho, (2009) relatam que o volume interno do sítio ativo da AChE é menor que o da BuChE, o que pode interferir na ligação de diferentes moléculas aos sítios das colinesterases.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As frações avaliadas da espécie *O. glaziovii* possuem maior efeito anticolinesterásico *in vitro* frente à enzima butirilcolinesterase, e a fração 8 é a mais ativa. Para uma melhor caracterização desse efeito biológico torna-se necessário a realização de estudos farmacológicos *in vivo* e identificação dos constituintes químicos bioativos presentes na fração ativa.

## REFERÊNCIAS

- AMOO, S. O. et al. Antioxidant and acetylcholinesterase-inhibitory properties of long-term stored medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, p.1-9, 2012.
- 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.
- GOLAN, David E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- LIMA, F.A. 2016. **Determinação *in vitro* da atividade anticolinesterásica de extratos de *Ocotea glaziovii***. Universidade Estadual de Feira de Santana, Monografia.
- MOTA, W. M. et al. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.4, p.624-628, 2012.
- STEENKAMP, V.; ADEWUSI, E.A. In vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. p. 829-835, 2011.
- TAN, W.N.; KHAIRUDDEAN, M.; WONG, K.C.; KHAW, K.Y.; VIKNESWARAN, M. 2014. New cholinesterase inhibitors from *Garcinia atroviridis*. **Fitoterapia** 97: 261–267.
- XIE, S. S. et al. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 64, p. 540-553, 2013.
- YAMAGUCHI, K. K. L, ALCÂNTARA, J. M., VEIGA JÚNIOR, V. F. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, Amazonas, v. 42, p. 541-546, 2012.