

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DE *Dioclea virgata*

Priscila Pinto Costa¹ e Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves²

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduanda de Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: priiscilacosta@hotmail.com

2. Orientador, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: cleiroz@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Dioclea virgata*. Fitoquímica. Atividade Anticolinesterásica. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

INTRODUÇÃO

Diversas plantas são responsáveis por produzirem uma grande variedade de compostos químicos, os quais são divididos em dois grupos, os metabólitos primários e os metabólitos secundários. Esses metabólitos primários e secundários são identificados e caracterizados através de estudos fitoquímicos, visto que a quantificação de substâncias biologicamente ativas é uma etapa importante para a segurança e eficácia na utilização em produtos alimentícios e farmacêuticos (MANTOVANI; PORCU, 2009).

Desde os primórdios, as plantas medicinais são utilizadas para tratamento, cura e prevenção de doenças, uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (USTULIN et al., 2009). Nos países industrializados cerca de 25% dos fármacos advêm de produtos naturais (YUNES et al., 2004). As plantas e os extrativos vegetais são de grande importância quanto à utilização de suas substâncias tanto para a descoberta de novos fármacos quando para a obtenção de adjuvantes como fonte de matérias-primas, os quais são elaborados a base de apenas extratos vegetais (SIMÕES, 2004). Assim, a evolução do conhecimento científico, intensificaram os estudos das plantas medicinais, relacionando a sua composição química com os seus efeitos, a fim de confirmar ou não a indicação terapêutica das mesmas, advindas do conhecimento popular. Outro fator importante que induz as pesquisas com plantas medicinais consiste em avalia-las quanto a sua toxicidade, visto que podem causar sérios problemas à saúde daqueles que a ingerem de maneira inadequada.

O número de espécies vegetais utilizadas para fins farmacológicos crescem cada dia mais, em torno de 74% dos produtos medicinais mais utilizados foram descobertos por meio de resultados concluídos pela medicina popular (BRAZ FILHO, 2010). Com o advento de novas doenças e a crescente busca por substâncias mais eficazes, que apresentem baixo ou nenhum efeito colateral, diversas técnicas tem sido utilizadas de modo a permitir uma rápida seleção de substâncias ou misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas.

Com o intuito de avaliar esse percentual de inibição, faz-se necessário submeter a espécie estudada ao teste de atividade anticolinesterásica, pois através deste, pode-se constatar um valor de inibição da enzima consideravelmente alto. Assim, tem crescido o interesse na busca por compostos bioativos oriundos de plantas para o tratamento desta doença (INGKANINAN et al., 2003). Diversas pesquisas sobre a utilização de plantas em tratamentos terapêuticos têm sido realizadas. Contudo, ainda há muito a se avaliar sobre o uso terapêutico, segurança e eficácia dos produtos derivados de plantas.

Substâncias bioativas têm sido isoladas de espécies do gênero *Dioclea*, como o Dioclimidazol, isolado das sementes de *Dioclea reflexa*, que demonstrou atividade antibacteriana e anticolinesterásica (OLADOSU et al., 2010). O gênero *Dioclea* possui cerca de 50 espécies que são distribuídas em zonas tropicais, visto que a maioria são encontradas na América Central e do Sul, principalmente na Amazônia (MOTA et al., 2011). A espécie

Dioclea virgata é uma planta pertencente à família Fabaceae, popularmente conhecida como "cipó-pixuma" ou "feijão-de-boi" (ALVES, 2012).

Diversas espécies de *Dioclea* têm sido estudadas através da análise de proteínas, onde foram isoladas das sementes de espécies deste gênero lectinas com atividade anticancerígena (PINTO et al., 2010). Porém, embora seja relatado uso popular com fins medicinais, a espécie é pouco explorada cientificamente (AGRA et al., 2007), despertando dessa maneira, interesse em estudá-la quanto às suas propriedades mais a fundo.

Deste modo, justifica-se a importância do aprofundamento no estudo fitoquímico da espécie *Dioclea virgata*, visando um conhecimento ampliado das classes de metabólitos produzidos por esta espécie, tal como a busca de compostos bioativos oriundo de plantas. Contudo, o presente estudo tem por objetivo realizar o estudo fitoquímico do extrato clorofórmico do caule de *Dioclea virgata*, bem como avaliar *in vitro* a atividade anticolinesterásica do extrato, frações e substâncias isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

A espécie *Dioclea virgata* foi coletada no campus da Ondina na Universidade Federal da Bahia (UFBA) nos meses de agosto e setembro de 2015 e sua exsiccata depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). O material coletado (partes aéreas e raízes) passou por processo de secagem em estufa a 50°C até peso constante.

O material seco foi triturado em liquidificador industrial, no qual o pó resultante da trituração passou por processo de extração por maceração, utilizando-se álcool metílico como solvente extrator. O filtrado da maceração foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida para a obtenção do extrato bruto, que foi seco e submetido ao processo de partição através de um funil de separação, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio e acetato de etila).

O extrato clorofórmico obtido foi fracionado através da técnica de Cromatografia em Coluna (CC), no qual foi utilizada sílica gel 60 (MERCK) como fase estacionária e como fase móvel utilizou-se clorofórmio e metanol em ordem crescente de polaridade, resultando em diferentes frações. Foram obtidas 31 frações que, após análise em CCD e revelação em luz ultravioleta (254nm), foram agrupadas em 13 frações (Tabela 01), conforme perfil apresentado.

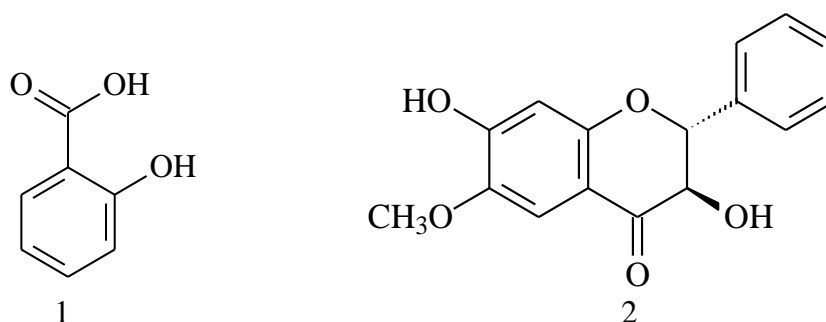
A fração CCDV 01 foi submetida a CC tendo como fase estacionária Sephadex LH-20, e como fase móvel uma mistura de diclorometano e metanol na proporção 1:1. Desta coluna foram obtidas 24 frações, que foram agrupadas após análise em CCD reveladas em câmara de UV e borrifadas com uma solução de cloreto férrico 5% (reativo para fenólicos), fornecendo após o agrupamento um total de 19 frações.

As frações CCDV 01E-4 e CCDV 01E-7 foram enviadas para aquisição dos espectros de Ressonâncias Magnéticas Nucleares por apresentarem-se puras quando reveladas em CCD. O extrato clorofórmico do caule de *D. virgata*, bem como frações deste extrato foram submetidos ao teste de Atividade Anticolinesterásica *in vitro* empregando-se a metodologia descrita por Ellman (1961) e colaboradores. Para realização do teste, foram adicionados 140µL de solução tampão em uma placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se 20µL da enzima AChE (5U/mL) e 20 µL da amostra ou padrão diluídos em etanol. Posteriormente foi acrescentado 10µL de DTNB (10 mM) e após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente foi realizada a primeira leitura em 405 nm em leitor de microplaca. Após a adição 10µL de ATCI (15mM), foi realizada uma nova leitura. Assim, as reações foram acompanhadas até o tempo final de 30 minutos. O resultado foi comparado com padrão comercial Eserina (Fisiostigmina) na concentração de 500 µMol. As análises foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Após preparo e secagem do extrato do caule de *D. virgata*, foi obtida uma massa total de extrato bruto de 107,05g resultando um rendimento de 5,66%. O extrato metanólico bruto foi particionado com solventes de diferentes polaridades, foram obtidos para os extratos hexânico, clorofórmico e acetato de etila, 7,03g, 3,654g e 1,28g, respectivamente.

Os espectros de RMN de ^1H das frações CCDV 01E-4 (ANEXO A) e CCDV 01E-7 (ANEXO B) foram analisadas pelo Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves, e tiveram suas estruturas identificadas através dos seus deslocamentos químicos, constantes de acoplamento e comparação com dados da literatura. Estão representadas na figura 06 as estruturas das substâncias isoladas do extrato clorofórmico do caule de *Dioclea virgata*. A fração CCDV 01E-7 foi identificada como sendo o ácido salicílico e a fração CCDV 01E-4 o flavonoide 3,7-dihidroxi-6-metoxiflavanona.



Figuras 01: Estrutura do Ácido Salicílico (1) e do 3,7-dihidroxi-6-metoxiflavanona (2)

A determinação da Atividade Anticolinesterásica dos extratos brutos foi realizada através dos cálculos de acordo com a fórmula $\%I = [(AChE - AChI) / AChE] \times 100$, no qual AChI trata-se da absorbância final – absorbância inicial obtida na presença do inibidor e a AChE na ausência do inibidor, entretanto, o mesmo não apresentou resultado positivo para as frações testadas. Contudo, novos testes deverão ser realizados a fim de avaliar se a espécie *Dioclea virgata* há percentual de inibição frente à Anticolinesterase, bem como as substâncias isoladas, as quais não foi possível realizar o teste, pois ainda se encontram em processo de análise em RMN.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Através deste trabalho foi possível o isolamento e identificação do ácido salicílico e do flavonoide 3,7-dihidroxi-6-metoxiflavanona. Não foi possível detectar por meio do teste de atividade anticolinesterásica *in vitro* o percentual de inibição da espécie em estudo, logo, o mesmo será realizado novamente, tanto com os extratos brutos da espécie quanto com as substâncias isoladas da mesma.

Com base nos resultados alcançados nos experimentos foi possível analisar os constituintes químicos presentes na espécie *Dioclea virgata*. As substâncias isoladas não puderam ser testadas, pois ainda encontram-se na central de análises de RMN. Assim, este trabalho contribuiu para a quimiotaxonomia das espécies do gênero *Dioclea*.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F., DE FREITAS, P. F., BARBOSA FILHO, J. M. Sinopse das plantas conhecidas como medicinais e venenosas no Nordeste do Brasil. **Rev. Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1. Paraíba, 2007.

- ALVES, C. Q. **Estudo Químico e Avaliação Biológica de Duas Espécies de Leguminosae: Dioclea virgata e Cenostigma macrophyllum** [Tese de Doutorado]. Salvador-BA: Universidade Federal da Bahia, f. 227, 2012.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- INGKANINAN, K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 261-264, 2003.
- MANTOVANI, D.; PORCU, O. M. Avaliação fitoquímica de extrato de Lippia Alba para utilização como antioxidante natural em alimentos. **Revista Tecnológica**, v. 18, p. 69-74, 2009.
- MOTA, V. G. et al. Antinociceptive Activity of the Chloroform Fraction of Dioclea Virgata (Rich.) Amshoff (Fabaceae) in Mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011.
- Oladosu, I. A., Echeme, J.O., Zubair, M.F. Bioactive of Dioclimidazole from Dioclea reflexa Seeds. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 6, p. 575-579, 2010.
- PINTO, V. P. T. et al. Lectins isolated from Brazilian beans as markers of membrane glycoconjugates of human colon cancer cells. **Journal of Cancer Research and Experimental Oncology**, v. 2, p. 54-59, 2010.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.
- USTULIN, M. et al. Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande-MS. Rev. **Brasileira de Farmacognosia**. Jul/Set. 2009.
- YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos Anti-Inflamatórios. Ribeirão Preto SP: **Tecmedd**, p. 24, 2004.