

## A IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE FITOQUÍMICA NA BUSCA DE NOVOS INIBIDORES DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (AChE) COM PLANTAS MEDICINAIS

D. C. Silva

Núcleo de Pesquisas em Biotecnologias – CEFET-PI  
Praça da Liberdade nº 1597, Centro CEP: 64.000-040 Teresina - Piauí  
E-mail: danielledcs@yahoo.com.br

C. M. Feitosa; F. J. B. Santos; A. A. C. M. Cavalcante

Núcleo de Pesquisas em Biotecnologias – CEFET-PI  
Praça da Liberdade nº 1597, Centro CEP: 64.000-040 Teresina - Piauí  
E-mails: chisfeitosa@yahoo.com.br; borgissantos@ig.com.br; ana\_ameliamelio@ibest.com.br

### RESUMO

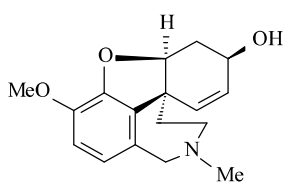
A pesquisa fitoquímica tem suas etapas envolvidas no bioensaio para busca de novos inibidores da acetilcolinesterase (AChE), enzima associada ao Mal de Alzheimer. O medicamento considerado mais efetivo no tratamento da doença é a galantamina, um alcalóide isolado de plantas da família Amaryllidaceae, que apresenta menos limitações que outras substâncias já utilizadas. O caminho fitoquímico envolve as etapas de coleta, preparação do material vegetal, extração, teste com AChE, fracionamento, isolamento, purificação de substâncias e determinação estrutural dos constituintes isolados. Foram coletadas trinta e quatro plantas medicinais no Núcleo de Plantas Aromáticas e Medicinais da Universidade Federal do Piauí – Nuplam/UFPI, em Teresina-PI. Das trinta e quatro espécies submetidas ao teste de inibição da AChE, apenas o extrato acetato de etila das espécies *Azadiractha indica*, *Plectranthus barbatus* e *Lippia sidoides* apresentaram resultado negativo. Cuidados foram tomados na coleta do material botânico para que fungos ou plantas doentes não fossem coletados. A secagem do material foi realizada em estufa com temperatura em torno de 45 °C. Na primeira extração, utilizou-se como solvente hexano para a retirada de lipídeos, ceras e pigmentos, seguindo com o acetato de etila para isolamento de flavonóides e outros metabólitos, a terceira extração, com metanol, foi realizada para obtenção de heterosídeos em geral. O bioensaio para busca de novos inibidores da AChE, é realizado através do método de Ellman, modificado por Rhee *et al.*, onde é visualizado um campo amarelo na placa de cromatografia em camada delgada (CCD) com manchas brancas, indicativo da inibição. Esta pesquisa está contribuindo para a implantação de novas tecnologias no CEFET-PI, possibilitando o isolamento de substâncias de relevante atividade farmacológica presentes nos vegetais da região e futuramente o desenvolvimento de fitoterápicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** análise fitoquímica; plantas medicinais; Mal de Alzheimer; inibidores; acetilcolinesterase (AChE); fitoterápicos.

## 1. INTRODUÇÃO

Drogas provenientes de produtos naturais, especialmente de plantas, são eficazes no tratamento de várias doenças e, como por exemplo, cita-se a doença de Alzheimer (DA). A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa que atinge a memória e a capacidade de raciocínio e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 35 milhões de pessoas em países industrializados sofrerão da doença até o ano de 2010. Uma das abordagens consiste no tratamento colinérgico da doença (Bartus, *et al.*, 1982; Bores, *et al.*, 1996), e o método que demonstrou maior eficácia clínica é o uso de inibidores diretos da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela desativação do neurotransmissor acetilcolina por hidrólise (Ballone, *et al.*, 2001). Acredita-se que a inibição da enzima AChE promova o aumento da concentração da acetilcolina, na sinapse, diminuindo ou retardando a progressão dos sintomas associados ao mal de Alzheimer.

A galantamina (1), um alcalóide isolado de plantas da família Amaryllidaceae, apresenta uma longa ação seletiva, reversível e competitiva para inibir a acetilcolinesterase, é considerada mais efetiva no tratamento da doença de Alzheimer por apresentar poucas limitações. O seu uso foi aprovado na Áustria para o tratamento de DA e figura entre as quatro drogas aprovadas pelo FDA como medicamento (Ingkaninan 2000), por isso a busca de novos alcalóides ou outros inibidores em plantas medicinais já utilizadas na medicina popular constitui em um estudo de grande importância.



(1) galantamina

O método para determinação da inibição da AChE foi baseado no ensaio enzimático descrito por Ellman *et al.* (Ellman *et al.*, 1961). O método de Ellman é um procedimento fidedigno para atividade de colinesterase e pode ser rotineiramente empregado para avaliar a atividade inibitória de compostos desconhecidos. Enquanto este método é altamente preciso, o teste de grande número de compostos é um trabalho bastante intensivo. Um método mais rápido para analisar um largo número de compostos para detecção qualitativa da atividade de inibidores foi desenvolvido.

A análise fitoquímica com plantas de uso popular que está sendo desenvolvida no CEFET-PI tem as etapas envolvidas no bioensaio para busca de novos inibidores da enzima acetilcolinesterase e a padronização das etapas é importante, pois poderá haver interferência no isolamento de inibidores ou estes poderão ser degradados.

A seleção das plantas utilizadas para o “screening” geralmente tem como base principalmente relatos da literatura sobre ações antioxidantes, antiinflamatórias e inseticidas destes vegetais. Pesquisas demonstram que o tratamento a base de antioxidantes corrigem a memória, o aprendizado e a cognição provocados por envelhecimento em memória e, ainda que o uso de antiinflamatórios têm diminuído a progressão da doença de Alzheimer. Os inibidores são citados ainda como poderosos inseticidas.

## 2. METODOLOGIA

Na Tabela I constam os solventes previamente escolhidos, compatíveis com as substâncias a serem extraídas, considerando-se a ordem crescente de polaridade dos diversos metabólitos vegetais de interesse. As trinta e quatro plantas medicinais foram coletadas no Núcleo de Plantas Aromáticas e Medicinais (NUPLAM) do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Piauí/UFPI-PI, Campus de Teresina (Tabela II). Cuidados foram tomados para que fungos ou plantas doentes não fizessem parte do material botânico coletado.

Inicialmente, o material botânico foi coletado em partes específicas (partes aéreas, folhas, raízes e látex). Coletou-se cerca de 50-100g de cada planta medicinal selecionada.

Em seguida, realizou-se a secagem das espécies em estufa, com uma temperatura em torno de 45°C.

Na etapa seguinte, as espécies foram maceradas, para a obtenção dos extratos brutos utilizados no “screening” com os solventes: hexano, acetato de etila e metanol, com as espécies coletadas. Na primeira extração, utilizou-se como solvente hexano para a retirada de lipídeos, ceras e pigmentos de pouco interesse ao ensaio presente, seguindo com o

acetato de etila, para isolamento de flavonóides e outros compostos secundários bioativos, e na terceira extração, realizada com metanol para obtenção de heterosídeos em geral.

**Tabela I: Solventes adequados para extração de substâncias bioativas de plantas medicinais (Simões, *et. al.*, 2000)**

Solventes	Substâncias Extraídas
1-Éter de petróleo, hexano;	1-Lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas;
2-Tolueno, diclorometano, clorofórmio;	2-Bases livres de alcalóides, antraquinonas, óleos voláteis;
3-Acetato de etila, butanol;	3-Flavonóides e cumarinas;
4-Etanol, metanol;	4-Heterosídeos em geral;
5-Misturas hidroalcoólicas, água;	5-Saponinas e taninos;
6-Água acidificada;	6-Alcalóides;
7-Água alcalinizada;	7-Saponinas;

**Tabela II - Plantas medicinais escolhidas para realização do screening (NUPLAM/UFPI-PI, 2005)**

Nome científico	Nome vulgar	Indicações/ usos populares
<i>Azadiractha indica</i>	Neem indiano	Controle de pragas/carrapaticida
<i>Aloe Vera L.</i>	Babosa	Queimaduras externas, hemorróidas
<i>Equisetum sp</i>	Cavalinha	Diurético, afecções dos rins e bexiga
<i>Lepidium sativum</i>	Mastruz	Vermes, catarro no peito, contusões
<i>Altemanthera brasiliiana</i>	Terramicina	Antiinfecioso
<i>Justicia pectoralis</i>	Chambá	Bronquite, tosse, gripe e dores
<i>Plectranthus barbatus</i>	Malva santa	Azia, gastrite e má digestão
<i>Plectranthus amboinicus</i>	Malvariço	Dor na garganta e tosse
<i>Lippia sidoides</i>	Alecrim pimenta	Doenças da pele, mucosas
<i>Cimbopogon nardus</i>	Capim citronela	Perfumes, cosméticos, repelente de insetos
<i>Cissus sicyoides</i>	Insulina/anil trepador	Açúcar na urina e gripe
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Aroeira	Gastrite e úlcera gástrica
<i>Vitex agnus</i>	Pau-da-angola	Afrodisíaco, impotência
<i>Spondias mombim</i>	Cajazeira	Antiviral, vírus da herpes
<i>Bauhinia forficata</i>	Pata-de-vaca	Diabetes
<i>Arrabidaea chica</i> Verlot	Pariri ou crajiru	Adstringente, feridas, anemia, leucemia
<i>Euphorbia tirucalli L.</i>	Aveloz	Câncer, verrugas, calos, sífilis
<i>Cenostigma macrophyllum</i>	Caneleiro	Males do estômago e intestino
<i>Moringa oleifera</i>	Moringa	Ferimentos, hipoglicemiante, diurética
<i>Kalanchoe pinnatum</i>	Courama	Antiinflamatória
<i>Gomphrena globosa</i>	Perpétua roxa	Palpitação no coração
<i>Lippia geminata</i>	Erva-cidreira	Diarréia, pressão alta e insônia.

<i>Pfafia glomerata</i>	Acônito da terra	Tônico, febre
<i>Capraria biflora</i> L.	Chá do rio	Infecções
<i>Acmella uliginosa</i>	Agrião bravo	Dor de dente, afitas dolorosas
<i>Ocimum sp</i>	Manjerição de folha graúda	Banhos, perfumes, fricções
<i>Athemisia absinthium</i> L.	Losna/Artemisia	Fígado, mal estar, vermífugo, calmante
<i>Ocimum sp</i>	Manjerição de folha miúda	Banhos, perfumes, fricções
<i>Ocimum gratissimum</i>	Alfavaca	Mal hálito, ferimentos na boca
<i>Eleuthera plicata</i>	Coquinho/ Palmeirinha	Cólicas intestinais
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga	Diarréia, gripe
<i>Mentha x vilosa</i>	Hortelã Rasteiro	Diarréia com sangue, corrimento, tontura
<i>Mentha piperate</i>	Hortelã Pimenta	Cólicas
<i>Kalanchoe gastonis</i>	Courama	Artrite, antiinflamatório

## 2.1 Ensaio em Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos brutos foram dissolvidos em metanol para obter uma concentração 10 mg/mL e as substâncias puras serão dissolvidas também em metanol para uma concentração de 1 mg/mL. Então 1,5-2,5 µl de cada amostra foi aplicada na cromatofolha de sílica gel com alumina e eluída em clorofórmio: metanol 9:1. Depois da placa desenvolvida, e com o solvente evaporado, a atividade inibitória do spot foi detectada utilizando revelador baseado no método de Ellman. A placa foi pulverizada com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico])/ATCI (Iodeto de acetiltiocolina) (1 mM DTNB e 1 mM ATCI em tampão A) até ficar saturada com o reagente, mas não deixando escorrer. Depois de seca por 3-5 minutos, pulverizou-se 5 units/mL da enzima. Finalmente, as placas que se apresentaram amarelas e com manchas brancas depois de 5 minutos, mostraram inibição (Ingkaninan, *et. al.*, 2000; Rhee, *et. al.*, 2001).

## 2.2 Reagentes para ensaio em CCD e teste com AChE

Iodeto de acetiltiocolina (ATCI) e 5,5'-Dithiobis-(2- ácido nitrobenzóico) (DTNB) foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA). Para ensaio em CCD foi utilizado 1 mM (2,89 mg) de ATCI e 1 mM (3,96 mg) de DTNB em 10 mL de tampão A. Utilizou-se a enzima acetilcolinesterase (AChE) na concentração de 5 U/mL em tampão A.

Acetilcolinesterase (tipo VI-s, liofilizada, 292 U/mg sólida, 394 U/mg proteína) foi obtida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA). A enzima liofilizada foi dissolvida em tampão A para se ter uma solução estoque 1000 U/mL da enzima para ensaio em cromatofolhas. Diluiu-se a solução estoque utilizando-se o tampão A para obtenção de 5 U/mL da enzima, concentração adequada para ensaio em cromatografia em camada delgada (CCD).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização do teste com a enzima AChE, obteve-se os seguintes resultados dispostos na tabela III.

**Tabela III- Plantas submetidas a teste de inibição da enzima AChE**

Nome científico	Tipos de Extratos		Nome Científico	Tipos de Extratos	
	AcOEt	MeOH		AcOEt	MeOH
<i>Azadiractha indica</i>	N	P	<i>Cenostigma macrophyllum</i>	P	P
<i>Aloe Vera</i> L. (folha)	P	P	<i>Moringa oleifera</i>	P	P
<i>Aloe Vera</i> L. (látex)	P	P	<i>Kalanchoe pinnatum</i>	P	P
<i>Equisetum</i> sp	P	P	<i>Gomphrena globosa</i>	P	P
<i>Lepidium sativum</i>	P	P	<i>Lippia geminata</i>	P	P
<i>Altemanthera brasiliiana</i>	P	P	<i>Pfafia glomerata</i>	P	P
<i>Justicia pectoralis</i>	P	P	<i>Capraria biflora</i> L.	P	P
<i>Plectranthus barbatus</i>	N	P	<i>Acmella uliginosa</i>	P	P

<i>Plectranthus amboinicus</i>	P	P	<i>Ocimum sp</i>	P	P
<i>Lippia sidoides</i>	N	P	<i>Athemisia absinthium L.</i>	P	P
<i>Cimbopogon nardus</i>	P	P	<i>Ocimum sp</i>	P	P
<i>Cissus sicyoides</i>	P	P	<i>Ocimum gratissimum</i>	P	P
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	P	P	<i>Eleuthera plicata</i> (folha)	P	P
<i>Vitex agnus</i>	P	P	<i>Eleuthera plicata</i> (amêndoa)	P	P
<i>Spondias mombim</i>	P	P	<i>Eugenia uniflora</i>	P	P
<i>Bauhinia forficata</i>	P	P	<i>Mentha x vilosa</i>	P	P
<i>Arrabidaea chica</i> Verlot	P	P	<i>Mentha piperate</i>	P	P
<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	P	P	<i>Kalanchoe gastonis</i>	P	P

AcOEt – Acetato de Etila; MeOH – Metanol; P – Positivo; N – Negativo.

Das trinta e quatro espécies submetidas ao teste de inibição da AChE, apenas o extrato acetato de etila das espécies *Azadiractha indica*, *Plectranthus barbatus* e *Lippia sidoides* apresentaram resultado negativo. Após um novo levantamento bibliográfico será selecionada a espécie mais promissora, as etapas seguintes serão: fracionamento, isolamento, purificação de substâncias e determinação estrutural dos inibidores isolados. Esta pesquisa está contribuindo para a implantação de novas tecnologias no CEFET-PI, possibilitando o isolamento de substâncias de relevante atividade farmacológica presentes nos vegetais e possivelmente o desenvolvimento de fitoterápicos.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ballone, G. J., **Doença de Alzheimer**, 2000. Disponível em <http://www.psiqweb.med.br/geriat/alzh.html>, acesso em 15 de agosto de 2001.

Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., Lippa, A. S. **The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction.** *Science* 217, 408-411, 1982.

Bores, G. M., Huger, F. P., Petko, W., Mutlib, A., Camacho, F., Rush, D. K., Selk, D. E., Wolf, V., Kosley, R. W, Jr., Davis, L., Vargas, H. M. **Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine.** *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics* 277, 728-738, 1996.

Ellman, G. L., Courtney, D. K., Andres, V. Jr., Featherstone, R. M. (1961). **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.

Ingkaninan, K., **"Novel procedures for lead finding in plant extracts"**. PhD thesis. 2000. Leiden University, The Netherlands.

Ingkaninan, K., Hazekamp, A., Hoek, A. C., Balconi, S., Verpoorte, R. **Application of Centrifugal Partition Chromatography in a general separation and dereplication procedure for plant extracts.** *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* 23, 2195-2208, 2000.

Rhee, I. K., van Rijn, R. M., Verpoorte, R. **Qualitative Determination of false-positive effects in acetylcholinesterase assay using thin-layer chromatography.** Submitted.2001.

Simões, M.O et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da Universidade UFSC. 2ª ed. Porto Alegre/Florianópolis, 2000