

Estudo Fitoquímico e Avaliação Biológica do Extrato Hexânico das Folhas de *Dioclea virgata*.

**Carol Anne Pereira Silva¹; Diego Mota da Costa²; Danielle Figuerêdo da Silva³,
Clayton Queiroz Alves⁴ e Vania Rastelly de Sousa⁵.**

1. Bolsista PIBIC/PROBIC, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: carolanneps@gmail.com
2. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: diegocost@live.com
3. Doutoranda em Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: danyfigs@hotmail.com
4. Orientador, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: cleiroz@gmail.com
5. Orientadora, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: vaniaras@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: *Dioclea virgata*; Fitoquímica; Atividade Anticolinesterásica,

INTRODUÇÃO

O gênero *Dioclea* pertence à família Leguminosae (Fabaceae) e possui cerca de 50 espécies distribuídas em zonas tropicais, sendo a maioria encontrada na América Central e do Sul, especialmente na Amazônia. Diversas espécies deste gênero têm sido estudadas através da análise de proteínas, sendo descrito na literatura o isolamento de lectinas das sementes destas espécies com atividade anticancerígena (PEREZ, 1990). As espécies deste gênero são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversos males, como no tratamento de doenças dos rins e da próstata (OLADOSU, *et al.*, 2010). Apesar do grande interesse pelo estudo de plantas com reconhecida atividade medicinal, ainda existem espécies do gênero *Dioclea* que não foram estudadas do ponto de vista fitoquímico, nem avaliadas quanto ao seu potencial biológico (PINTO, *et al.*, 2010). A elucidação dos compostos ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, a bioquímica e a farmacologia. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico (MACIEL, 2002). Um teste de atividade *in vitro* que está sendo difundido é o teste de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase (AChE) (ELLMAN, 1986). Uma das mais promissoras abordagens no tratamento da Doença de Alzheimer está no aumento dos níveis de acetilcolina (ACh) no cérebro. A AChE é a principal enzima envolvida na hidrólise do neurotransmissor ACh, consequentemente substâncias capazes de inibir a AChE têm sido utilizadas para o tratamento dessa doença. Artigos recentes têm reportado que alguns extratos de plantas possuem atividade inibitória da AChE (DOHI *et al.*, 2009). Esta pesquisa tem como tema o Estudo Fitoquímico e Atividade Anticolinesterásica de *Dioclea virgata* (Rich) amsh, onde o objetivo principal é fazer o estudo dos constituintes químicos presentes no extrato hexânico das folhas desta espécie e a avaliação da atividade anticolinesterásica das suas frações.

METODOLOGIA

Nas colunas cromatográficas utilizadas para separação dos constituintes químicos foram empregadas sílica gel 60 com o diâmetro de partícula entre 0,063-

0,200µm. Nas cromatografias em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas placas pré fabricadas 20x20 de gel de sílica 60. As cromatoplasmas foram reveladas com irradiação da luz ultravioleta de comprimentos de onda de 254 e 366 nm e vapor de iodo. Para eliminação dos solventes das frações com grandes volumes foi utilizada destilação sob pressão reduzida em evaporador rotatório Heidolph. As frações menores foram evaporadas com o auxílio ventilação sem aquecimento ou utilizando capela.

Fracionamento do extrato hexânico das folhas de *D. virgata*:

Para o desenvolvimento deste trabalho foram estudadas 10 frações do extrato hexânico das folhas de *D. virgata*. As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e então reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em 8 frações. Foram reunidas as frações 5-6 e as frações 8-10, sendo essas últimas escolhidas para iniciar o fracionamento. Desse fracionamento foram obtidas 100 frações, que foram analisadas por CCDC, sendo agrupadas em 10 frações que devido ao fato de apresentarem difícil resolução cromatográfica nos sistemas de solventes testados, foram reservadas para estudo posterior.

Dessa forma para dar continuidade ao estudo, as frações iniciais foram reavaliadas por cromatografia em camada delgada comparativa, em um sistema de solvente hexano/acetato de etila (7:3) e reveladas com o reagente Liebermann-Burchard. A fração HFDV 1E 5-6 apresentou uma melhor resolução cromatográfica quando comparada com as demais, sendo escolhida para dar continuidade aos estudos. A fração foi submetida a uma CC de sílica gel 60 e eluída com misturas de solventes hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol, em gradiente crescente de polaridade, foram recolhidas 27 frações de 50mL cada. Dentre estas frações, 3 apresentaram cristais e foram purificadas adicionado-se alternadamente os solventes hexano, acetato de etila e metanol, com o objetivo de lavagem dos cristais para a retirada das impurezas. A impureza foi solúvel nestes solventes e os cristais permaneceram insolúveis. Após esse processo de extração das impurezas, as frações purificadas foram dissolvidas e submetidas à análise por CCDC, e como apresentaram o mesmo perfil cromatográfico quando relevadas em UV e em Liebermann-Burchard, elas foram reunidas, tendo o código HFDV 1E3-5-7, e enviadas para análise de RMN de ^1H e ^{13}C . As outras frações foram avaliadas por CCDC e reunidas posteriormente em 12 frações, que foram submetidas ao teste de atividade anticolinesterásica.

Teste de atividade anticolinesterásica:

O efeito inibitório sobre atividade da enzima acetilcolinesterase *in vitro* foi avaliada por uma adaptação do método espectrofotométrico de Ellman e colaboradores (1961), de acordo com os procedimentos descritos por Moyo e colaboradores (2010). A análise quantitativa da atividade anticolinesterásica foi feita nas 12 frações oriundas do fracionamento de 1E. Primeiramente, foi adicionado nas cavidades das microplacas 140 µL de tampão fosfato pH 7,5, 20 µL da enzima acetilcolinesterase (0,5 U/mL), 20 µL das amostras a serem testadas (1 mg/mL para os extratos e frações; 500 µmol para as substâncias isoladas e para o padrão eserina). A placa foi então incubada a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos sendo, em seguida, adicionado 10 µL de ácido 5-5'-ditiobis-[2-

nitrobenzólico] (10 mM) e 10 µL de iodeto de acetilcolina (15 mM). A absorbância foi monitorada após 10 minutos, em $\lambda = 405$ nm em leitor de microplacas Multiskan™ GO 3.2. Os resultados foram comparados com o padrão comercial eserina (fisiostigmina). A atividade anticolinesterásica (%I) foi calculada de acordo com a seguinte equação: %IACHe = $[(\Delta \text{ Controle negativo} - \Delta \text{ Amostra}) / \Delta \text{ Controle}] \times 100$, onde Δ do controle negativo equivale a variação da absorbância final menos a variação da absorbância inicial do controle negativo, ou seja, sem a presença do inibidor, menos a variação com a presença do inibidor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fracionamento do Extrato Hexânico das Folhas de *Dioclea virgata*:

Dos fracionamentos realizados do extrato hexânico das folhas de *D. virgata*, foram obtidos cristais na fração 1E3-5-7 que foi submetida à análise por RMN de ^1H e ^{13}C . Através da análise dos espectros e comparação com dados da literatura foi possível identificar a amostra como sendo β -sitosterol.

Atividade Anticolinesterásica:

Como mostrado no gráfico 1, houve uma variação significativa do potencial inibitório das frações frente a enzima anticolinesterase, quando comparadas entre si, sendo as frações HFDV 1E5 -10-12, HFDV 1E6 – 13-14, 1E7 15-16, 1E8 17 que apresentaram melhor atividade anticolinesterásica, com inibição enzimática acima de 60%. A enzima anticolinesterase é a principal enzima envolvida na Doença de Alzheimer (DA), por degradar a acetilcolina (MARQUES, *et al*, 2013). Um promissor tratamento para doença é o aumento do nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores da acetilcolinesterase (AChE), justificando as pesquisas por novos agentes mais eficazes e com menor custo para a saúde humana (SÁ, *et al*, 2012).

Os resultados obtidos desse estudo, mostraram que o extrato hexânico de *D. virgata* possui atividade anticolinesterásica, ressaltando a importância da continuidade da pesquisa científica da espécie, principalmente pelas limitações de oferta de terapias farmacológicas para o tratamento da DA.

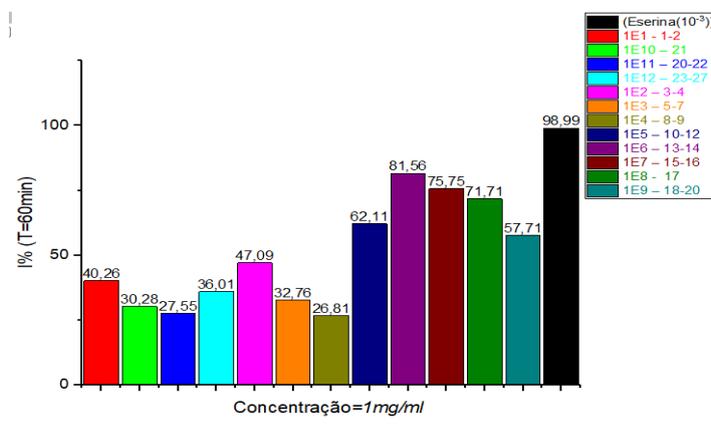


Figura 1: Efeito da inibição das frações HFDV 1E 1 à HFDV 1E 12 sobre a enzima AChE. Para as frações foi utilizada uma concentração de 1mg/mL e para o padrão eserina foi utilizada uma concentração de 20µL de AChE (0,5µ/mL).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos fracionamentos realizados do extrato trabalhado foi obtida a substância β -sitosterol.

O estudo sugere que as frações podem demonstrar resultados inibitórios sobre a atividade da AChE *in vitro*, com potencial aplicação em doenças neurodegenerativas que dependem da modulação desta enzima, incluindo a DA. As frações apresentaram diferenças de potencial inibitório da enzima anticolinesterase quando comparadas entre si, sendo possível observar que as amostras testadas possuem atividade anticolinesterásica considerável, já que as porcentagens de inibição da enzima foram, em sua maioria, acima de 40%, onde 4 frações apresentaram percentual de inibição da AChE acima de 70%.

Além disso, os resultados indicam a necessidade de trabalhar com as frações que apresentaram atividade inibitória da AChE com o objetivo de isolar as substâncias responsáveis por essa atividade.

REFERÊNCIAS

- DOHI, S., TERASAKI, M., MAKINO, M. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils. **J Agric Food Chem**, v.57, n. 43, 2009.
- ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. J., FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, **Biochem. Pharmacol.**, v.7, n.88, 1961.
- MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA JR, V. F., GRYNBERG, N. F., ECHEVERRIA, A. Plantas Mediciais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v.25, n. 3, p.429-438, 2002.
- MARQUES T. H. C.; Santos, P. S.; Melo, C. H. S.; Carvalho, R. B. F.; Lima, L. S.; David, J. M.; David, J. P. L.; Freitas, R. M.; **Quim. Nova**, v.36, n. 549. 2013.
- OLADUSU, I. A., ECHEME, J.O., ZUBAIR, M.F. Bioactive of Dioclimidazole from *Dioclea reflexa* Seeds. **Middle East J Sci Res**,v. 6, n.6, p. 575-579, 2010.
- PEREZ, G., Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*. **Phytochemistry**, v.29, p.1745-1749, 1990.
- PINTO, V. P. T., TEIXEIRA, E. H., TEIXEIRA, A. H., CARNEIRO, V. A., CRISTINO-FILHO, G., DUS, D., DEBRAY, H., SAMPAIO, A. H., CAVADA, B. S.. Lectins isolated from Brazilian beans as markers of membrane glycoconjugates of human colon cancer cells. **JCREO**, v.2, n.5, p.54-59, 2010.
- SÁ, C. G.; Cardoso, K. M. F.; Freitas, R. M.; Feitosa, C. M.; **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v.33, p.211, 2012.