

sível e competitiva para inibir a acetilcolinesterase. A galantamina (**6**) é considerada mais efetiva no tratamento da doença de Alzheimer que a fisostigmina (**7**) e a tacrina (**8**)^{7,8}, que são as substâncias atualmente utilizadas. Esses medicamentos estão disponíveis no mercado a um preço relativamente oneroso, o que torna a busca de novos inibidores de origem vegetal uma alternativa interessante, na medida em que estes seriam economicamente mais viáveis.

Atualmente, há uma atividade de pesquisa relativamente intensa na busca de novos inibidores em extratos de plantas^{8,9}, com especial interesse no isolamento e na identificação de novos inibidores da AChE.

O presente trabalho descreve os resultados experimentais das atividades anticolinesterásica e larvicida de extratos de três espécies do gênero *Kalanchoe* e de flavonóides glicosilados isolados do extrato acetato de etila (AcOEt) de *K. brasiliensis*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio em CCD/AChE

A constatação da inibição da AChE é possível seguindo-se a metodologia de Elmann¹⁰, adaptada por Rhee et al.⁸, para cromatografia em camada delgada fina. Neste ensaio, utiliza-se a solução dos reagentes ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e iodeto de acetilcolina (ATCI) em tampão e, posteriormente, aplica-se a enzima AChE (3 U/mL). A visualização da inibição dá-se pela observação de halos brancos. A mistura dos flavonóides isolados do extrato AcOEt de *K. brasiliensis* foi bio-guiada pela inibição da enzima. A presença dos flavonóides ativos é confirmada pelo aparecimento de halo branco⁸.

Inibição da acetilcolinesterase em ensaio de microplaca

O ensaio enzimático em CCD é um teste qualitativo. Para obtenção de resultados quantitativos, é necessária a utilização dos ensaios em microplaca (absorbância a 405 nm). Das amostras testadas, os extratos AcOEt e metanólico (MeOH) de *K. brasiliensis* e o extrato AcOEt de *K. pinnata* apresentaram inibição de 100% no ensaio de microplaca na concentração de 2 mg/mL. A inibição apresentada pelo extrato de AcOEt de *K. gastonis-bournieri* Raym-Hamet et Perrier, na mesma concentração, 82%, indica esse extrato como promissor para futuros fracionamentos (Tabela 1).

O extrato AcOEt de *K. brasiliensis* foi então selecionado para fracionamento bio-guiado, por apresentar inibição enzimática de 100% em microplaca, nos extratos AcOEt e MeOH. Estudos realizados com reto abdominal isolado de sapos também demonstraram a propriedade inibitória da colinesterase pelo extrato hidroalcolóico³.

O extrato EtOAc de *K. brasiliensis* tem valor de $CI_{50} = 0,16$ mg, o potente inibidor da AChE, a galantamina, que já é utilizada como medicamento, apresenta o valor de $CI_{50} = 0,37 \times 10^{-3}$ mg.

Tabela 2. Porcentagem de mortes, em testes de atividade contra a larva do mosquito *Aedes aegypti* de folhas das espécies de *Kalanchoe*, com indicação dos extratos e das concentrações utilizadas

Espécie	Extrato					
	Hexânico (%)		AcOEt (%)			MeOH (%)
	500 ppm	250 ppm	500 ppm	250 ppm	100 ppm	500 ppm
<i>Kalanchoe brasiliensis</i> Camb.	100	25	100	100	0	40
<i>Kalanchoe pinnata</i> Pers.	100	3	100	13	-	0
<i>Kalanchoe gastonis-bournieri</i> Raym-Hamet et Perrier	100	0	100	0	-	44

Tabela 1. Resultados de microplaca (inibição) para extratos AcOEt e MeOH de espécies de *Kalanchoe*

Espécie (Exsicata)	Microplaca (%) 2 mg/mL	
	AcOEt	MeOH
<i>Kalanchoe brasiliensis</i> Camb.(14657)	100	100
<i>Kalanchoe pinnata</i> Pers. (31144)	100	15
<i>Kalanchoe gastonis-bournieri</i> Raym-Hamet et Perrier (13782)	82	2

Ensaio para 25 µL, testados com 1 e 5 mg em 1 mL de metanol.

Observe-se que o resultado é bastante significativo por se tratar de um extrato bruto.

Ensaio de atividade larvicida

Os ensaios de atividade larvicida foram realizados utilizando-se a larva do mosquito *Aedes aegypti*. Os extratos das folhas de três espécies e dos flavonóides obtidos através do isolamento bio-guiado do extrato AcOEt de *K. brasiliensis* foram submetidos à investigação de atividade biológica em três concentrações diferentes, na ordem decrescente de 500, 250 e 100 ppm (Tabela 2).

Os extratos *n*-hexânicos das folhas de *K. brasiliensis* e *K. pinnata* revelaram, respectivamente, os valores de DL_{50} 269,15 e 301,99 ppm; os extratos AcOEt revelaram valores de DL_{50} 281,83 ppm para *K. pinnata*; na concentração de 250 ppm, foi letal ($DL_{50} < 250$ ppm) para *K. brasiliensis*. Esses resultados foram considerados significativos por se tratar de extratos brutos. Os flavonóides isolados de *K. brasiliensis* foram testados na concentração de 50 ppm e não apresentaram efeito larvicida.

Determinação estrutural dos flavonóides isolados do extrato AcOEt de *K. brasiliensis*

Os flavonóides 3,7-di-*O*- α -L-raminopiranosil-8-metoxiquercetina (**9**) e 3,7-di-*O*- α -L-raminopiranosil 8-metoxikanferol (**10**), isolados como uma mistura através de fracionamento bio-guiado, foram caracterizados principalmente com base nos espectros de RMN ¹H e ¹³C (Tabela 3), envolvendo comparação com valores descritos na literatura para o flavonóide **12**, isolado de *K. brasiliensis*⁴.

O espectro de RMN¹H mostrou os sinais dos átomos de hidrogênio do anel B de **9** em δ_H 7,43 (d, $J = 2,0$, H-2'), 6,97 (d, $J = 8,4$, H-5') e 7,39 (dd, $J = 8,4$ e 2,0, H-6'), e de **10** em δ_H 7,82 (d, $J = 8,8$, H-2'/H-6') e 6,98 (d, $J = 8,8$, H-3'/H-5'). A atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono de **9** e **10** baseou-se também em interações heteronucleares a longa distância de carbono e hidrogênio (² J_{CH} e ³ J_{CH}), reveladas pelo espectro 2D HMBC (Tabela 3).

Com base nas intensidades relativas reveladas pela integração computacional dos sinais dos átomos de hidrogênio H-5' (δ_H 6,97)

Tabela 3. Dados de RMN ¹³C e RMN ¹H dos flavonóides **9** e **10** e RMN ¹H de **11** comparados com os valores de **12**, usando CD₃OD como solvente. Deslocamentos químicos em δ_c e δ_H (ppm) e constantes de acoplamento (*J*, entre parênteses) em Hz*

	9		10		11	12
	δ _c	δ _H	δ _c	δ _H	δ _H	δ _c
C						
2	160,00	-				159,6
3	136,40	-				136,3
4	179,99	-				179,8
5	157,69	-				150,0
6	100,03	6,67 (s)	100,05	6,67 (s)	6,65 (s)	130,8
7	156,35	-				156,2
8	130,98	-				99,7
9	150,11	-				157,6
10	107,38	-				107,2
1'	122,80	-				122,8
2'	117,21	7,43 (d, 2,0)	132,15	7,82 (d, 8,8)	7,83(d, 2,0)	117,0
3'	146,44	-	116,84	6,98 (d, 8,8)		146,3
4'	150,11	-				149,9
5'	116,74	6,97 (d, 8,4)	116,84	6,98 (d, 8,8)	6,91(d, 8,6)	116,4
6'	123,31	7,39 (dd, 8,4; 2,0)	132,15	7,82 (d, 8,8)	7,75(dd, 8,6, 2,0)	123,2
1''	103,62	5,34(s)			5,57 (s)	103,6
2''	71,88	4,23(s)			4,10 (s)	71,9
3''	72,11	3,79(dd, 3,2;9,3)			3,91 (dd, 3,3, 9,3)	72,0
4''	73,22	3,36(t,9,3)			3,52 (t, 9,3)	73,2
5''	72,20	3,43 (qd,9,3;6,0)			3,69 (qd, 9,3, 6,0)	72,0
6''	17,69	0,96 (d,6,0)			1,27 (d, 6,0)	17,6
1'''	100,43	5,67(s)				100,3
2'''	71,74	4,14(s)				71,7
3'''	72,24	3,93(dd, 3,3;9,6)				72,1
4'''	73,56	3,53 (t,9,6)				73,5
5'''	71,52	3,67(qd,9,6,6,2)				71,4
6'''	18,12	1,26 (d, 6,2)				18,1
CH ₃ -6	-					62,3
CH ₃ -8	62,64	3,98 (s)			3,94 (s)	-

* O número de átomos de hidrogênio ligado a cada carbono foi deduzido com base na análise comparativa dos espectros de RMN¹³C{¹H} e RMN¹³C-DEPT. Espectros 2D homonuclear ¹H-¹H-COSY e heteronuclear HMQC e HMBC foram também utilizados na atribuição dos deslocamentos químicos de **9** e **10**. Os valores dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento (*J*) dos átomos de hidrogênio foram obtidos do espectro 1D de RMN ¹H; s=singlete; t=tripleto; d=dublete; dd=duplo dublete; qd=quadruplete; *J* em Hertz.

de **9** e H-2'/H-6' (δ_H 7,82) de **10** no espectro 1D de RMN ¹H da mistura calcularam-se as percentagens aproximadas dos dois flavonóis: 90% (**9**) e 10% (**10**).

A comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono de **9** e **12**⁴ (Tabela 3) revela valores praticamente idênticos. Verificam-se atribuições discordantes para os átomos de carbono C-5 [δ_c 157,69 (**9**) e 150,0 (**12**)] e C-9 [δ_c 150,11 (**9**) e 157,6 (**12**)], o que se justifica pelo efeito mesomérico decorrente da presença em posição *orto* do grupo metoxílico em C-8 (**9**, C-5 livre do efeito mesomérico de proteção do metoxílico em posição *orto*, δ_c 157,69) e C-6 (**12**, C-5 protegido mesomericamente pela presença do metoxílico em posição *orto*, δ_c 150,0) na hipótese das duas serem realmente diferentes. A localização definitiva do grupo metoxílico no átomo de carbono C-8 de **9** baseou-se no espectro 2D HMBC, que mostrou acoplamento heteronuclear do carbono C-5 (δ_c 157,69) com o hidrogênio H-6 (δ_H 6,67, ²J_{CH}), e no deslocamento químico δ_c 100,03 atribuído ao carbono metínico CH-6, que é significativamente diferente do deslocamento químico do CH-8 de flavonóis sustentando três substituintes oxigenados no anel A^{4,11-14}. Os dados obtidos dos espectros 1D e 2D de RMN permitiram também a atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono de **9** e **10** (Tabela 3) e, obviamente, não afas-

tam a possibilidade de **9** e **12** serem idênticas e sugerem reavaliação da estrutura proposta anteriormente⁴.

O flavonóide 3-*O*-α-L-raminopiranosil-3,3',4',5,7-pentaidroxi-8-metoxiflavona (**11**), isolado do extrato AcOEt de *K. brasiliensis*, não inibiu a AChE e a estrutura proposta (**11**) foi especulativamente proposta baseada somente no espectro de RMN ¹H (Tabela 3), que se apresenta também em consonância biogenética com os flavonóides glicosilados **9** e **10** isolados da mesma espécie vegetal.

CONCLUSÕES

Das três espécies testadas, a *K. brasiliensis* apresentou os resultados mais satisfatórios, o que justificou a seleção do extrato AcOEt para o fracionamento bio-guiado. O estudo do extrato AcOEt, que inibiu a enzima em 100%, apresentando resultado positivo em CCD e potencial larvicida com DL₅₀ < 250 ppm, levou ao isolamento da mistura dos flavonóides ativos: 3,7-di-*O*-α-L-raminopiranosil 8-metoxiquercetina (**9**) e 3,7-di-*O*-raminosil 8-metoxikanferol (**10**). Confirmou-se, assim, a suposição de Fonteles de que a presença de flavonóides glicosídeos, detectada na abordagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *K. brasiliensis*, poderia ser a responsável por esse efeito inibitório da colinesterase³.

Apesar de inibir a enzima acetilcolinesterase, a mistura destes flavonóides não apresentou atividade larvicida na concentração de 50 ppm.

PARTE EXPERIMENTAL

Plantas

As folhas das espécies *K. brasiliensis*, *K. pinnata* e *K. gastonis* foram coletadas no Horto de Plantas Mediciniais Francisco José de Abreu Matos, pertencente à Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, e as exsiccatas encontram-se depositadas no Herbarium Prisco Bezerra, do Departamento de Biologia – UFC.

Procedimento para obtenção dos extratos

O material vegetal foi seco em estufa a 50 °C (quantidade inicial = 1,43 kg; quantidade final = 110 g) e, posteriormente, submetido à extração a frio com os solventes n-hexano, acetato de etila e metanol, sucessivamente. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, obtendo-se então os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico das folhas.

Isolamento dos flavonóides de *Kalanchoe brasiliensis*

As folhas secas (110 g) de *K. brasiliensis* foram submetidas à extração a frio com os solventes n-hexano, AcOEt e metanol, resultando três extratos distintos. Posteriormente, estes extratos foram testados para avaliar a inibição da AChE em CCD. O teste com o extrato AcOEt, positivo para a referida inibição, foi então submetido à partição com os solventes n-hexano, diclorometano e AcOEt. Da fração AcOEt, que apresentou atividade em AChE positiva, obtida da partição, foram realizadas sucessivas colunas cromatográficas usando-se gel de sílica como adsorvente e solventes convencionais, como n-hexano, diclorometano, AcOEt e metanol, em forma pura ou mistura binária. A fração n-hexano-diclorometano (2:8) e n-hexano-diclorometano (8:2) forneceu 3 mg do flavonóide **11** e 20 mg de uma mistura dos dois flavonóides **9** e **10**. Esta mistura apresentou resultado positivo para inibição de AChE.

Medida da atividade de acetilcolinesterase

Soluções padrões

As seguintes soluções foram preparadas: (1) 50 mM Tris/HCl pH 8; (2) 50 mM Tris/HCl pH 8, contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) fração V; (3) 50 mM Tris/HCl pH 8, contendo 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl₂·6H₂O; (4) 3 mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman), (5) 15 mM de iodeto de acetilcolina (ACTI), (6) 1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman) e (7) 1 mM de iodeto de acetiltiocolina (ACTI).

A enzima AChE liofilizada foi dissolvida na solução tampão (1) para fazer uma solução estoque 1000 U/mL. Deixou-se a enzima na solução por 20 min e, posteriormente, para obtenção de uma solução homogênea, procedeu-se à agitação por mais um período de 10-15 min. Para as diluições posteriores, utilizou-se a solução tampão (2).

Ensaio na microplaca

Para a reação enzimática no ensaio de microplaca, utilizou-se uma leitora de microplaca Bio-Rad, modelo 3550 UV, absorvância a 405 nm, baseado no método de Ellman¹⁰. A enzima hidrolisou o substrato acetiltiocolina, gerando como produto a tiocolina, que

reage com o reagente de Ellman, produzindo 2-nitrobenzoato-5-mercaptopiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato, que podem ser detectados a 405 nm. Nas 96 cavidades da placa, adicionaram-se 25 µL de (5); 125 µL de (4); 50 µL de (2); 25 µL da amostra a ser analisada, dissolvida em MeOH, diluída 10 vezes em (1); mediu-se a absorvância a cada 13 s por 5 vezes. Adicionaram-se 25 µL da enzima (0,22 U/mL); mediu-se novamente a absorvância a cada 13 s por 8 vezes. Calculou-se a velocidade das reações utilizando-se o software Microplate Manager version 4.0 (Bio-Rad Laboratories). Corrigiram-se os aumentos em absorvância, devido à hidrólise espontânea, por meio da subtração da velocidade da reação antes de se adicionar a enzima da velocidade da reação depois de se adicionar a enzima. A porcentagem de inibição foi calculada pela comparação das velocidades das amostras em relação ao branco (10% MeOH no tampão 1).

Ensaio em cromatografia de camada delgada (CCD)

As amostras (1,5 - 2,5 µL) foram aplicadas em CCD, DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0,2 mm Merck. Borrifou-se a placa com as soluções (6) + (7), deixando por 3 min. Após secar, borrifou-se a enzima 3 U/mL e, em 10 min, apareceu a coloração amarela. Onde houve inibição da enzima, observou-se um halo branco⁷. Em cerca de 20 a 30 min, a coloração desapareceu.

Ensaio de atividade larvicida contra a larva do mosquito *Aedes aegypti*

Os testes com os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico foram realizados nas concentrações de 500, 250 e 100 ppm (Tabela 2). As amostras foram dissolvidas em 0,3 mL de dimetilsulfóxido, completando-se o volume com água e larvas do mosquito no 3.º estágio, até a obtenção de 20 mL. Após 24 h, as larvas mortas foram contadas. Realizaram-se os ensaios em duplicatas e em diferentes concentrações para posterior cálculo de DL₅₀ (concentração da amostra capaz de matar 50% da população de larvas). O dimetilsulfóxido foi utilizado como controle na mesma concentração utilizada para dissolução da amostra.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. F. J. de A. Matos, pelo fornecimento das plantas, e aos órgãos financiadores CNPq, CAPES, FUNCAP e FAPERJ, pelas bolsas e auxílios concedidos.

REFERÊNCIAS

1. Matos, F. J. A.; *Plantas da medicina popular do Nordeste; propriedades atribuídas e confirmadas*, Edições UFC: Fortaleza, 1999.
2. Bergmann, B. R.; Costa, S. S.; Moraes, V. L. G.; *Nat. Prod. Res. in Brazil* **1997**, *49*, 395.
3. Fonteles, M. C.; Capelo, R. L.; Rao, V. S. N.; *VII Simpósio de Plantas Mediciniais*, Brasil, 1982.
4. Bodo, J. B.; Costa, S. S.; Souza, M. L. M.; Moraes, V. L. G.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1503.
5. Bryne, G. J. A.; *Aust. J. Hosp. Pharm.* **1998**, *28*, 261.
6. Perry, E. K.; *British Medicinal Bulletin* **1986**, *42*, 63.
7. Ingkaninan, K.; de Best, C. M.; van der Heidjen, R.; Hofte, A. J. P.; Karabatak, B.; Irth, H.; Tjaden, U. R.; van der Greef, J.; Verpoorte, R.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *872*, 61.
8. Rhee, I. K.; Meent, M. V.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *915*, 217.
9. Trevisan, M. T. S.; Macedo, F. V. V.; Meent, M. V.; Rhee, I. K.; Verpoorte, R.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 301.
10. Ellman, G. L.; *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.
11. Wu, T. S.; Furukawa, H.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1061.
12. Roitman, J. N.; James, L. F.; *Phytochemistry* **1985**, *24*, 835.
13. Merfort, I.; Wendisch, D.; *Planta Med.* **1987**, *5*, 434.
14. Aritomi, M.; Komori, T.; Kawasaki, T.; *Phytochemistry* **1986**, *25*, 231.