

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA**

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE FRENTE AOS EXTRATOS
DAS FOLHAS DE *Pterodon pubescens* Benth**

AUTOR: CÍNTIA ALVES PORFIRO

**RIO VERDE- GO
Março – 2017**

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA - PPGAq

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE FRENTE AOS EXTRATOS
DAS FOLHAS DE *Pterodon pubescens* Benth**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA no programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde - Área de concentração Agroquímica.

Autora: Cíntia Alves Porfíro

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Agna Rita dos Santos
Rodrigues

RIO VERDE- GO
Março – 2017

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Porfiro, Cínthia Alves

P832a Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase
Frente aos extratos das folhas de *Pterodon pubescens* Benth/ Cínthia Alves Porfiro; orientador
Dr Paulo Sérgio Pereira; co-orientador Dr Agna Rita Santos Rodrigues. -- Rio Verde, 2017.

74 p.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde, 2017.

1. acetilcolinesterase. 2. compostos fenólicos. 3. flavonoides. 4. biopesticidas. I. Pereira,
Dr Paulo Sérgio, orient. II. Santos Rodrigues, Dr Agna Rita, co-orient. III. Título

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE FRENTE AOS EXTRATOS DAS
FOLHAS DE *Pterodon pubescens* Benth**

Autora: Cíntia Alves Porfiro
Orientador: Paulo Sérgio Pereira

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

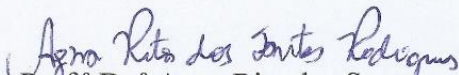
APROVADA em 31 de março de 2017.



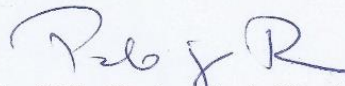
Prof. Dr. Paulo Eduardo Menezes
Silva
Avaliador externo
IF Goiano/RV



Prof.^a Dr.^a Cassia Cristina Fernandes
Alves
Avaliadora interna
IF Goiano/RV



Prof.^a Dr.^a Agna Rita dos Santos
Rodrigues
Avaliadora interna
IF Goiano/RV



Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira
Presidente da banca
IF Goiano/RV

Posso todas as coisas naquele que me fortalece.

Dedico este trabalho a Deus, a meus pais Antônio Batista Porfiro e Idelma Alves Silva Porfiro, a minha irmã Samara Alves Porfiro, e a todos que contribuíram para a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, amor, proteção e cuidado que é me dado a cada amanhecer.

A minha família, minha mãe Idelma Alves Silva Porfiro, meu pai Antônio Batista Porfiro, minha irmã Samara Alves Porfiro, pela paciência, amor, colaboração, motivação e cumplicidade nesses anos de estudo.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira, pelo estímulo constante, orientação, confiança e oportunidade.

A Prof.^a Dr.^a Agna Rita dos Santos Rodrigues, pela coorientação e intensa colaboração no projeto, paciência, motivação e amizade. Pelo auxílio e ajuda para realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Fabio Henrique Dyzy, pelo esclarecimento de dúvidas e ser sempre muito prestativo.

A Dr.^a Kellen Telles, pela compreensão, apoio e atenção.

A Dr.^a Altina Lacerda Nascimento, pelo incentivo e colaboração.

Ao Prof. Dr. Alan Carlos da Costa e Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva, por disponibilizarem o uso dos equipamentos do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de tecidos.

Aos colegas de trabalho, Leticia Siqueira da Silva pela amizade, companheirismo e por não poupar esforços para tornar mais fácil o meu trabalho. E a Ana Cláudia Cardoso Ataides, por ser sempre tão prestativa e atenciosa e a Sara Marques Araújo, por sua colaboração.

A todos os servidores, graduandos e pós-graduandos do Instituto Federal Goiano, que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

A todos do programa de pós-graduação em Agroquímica.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e tecnologia goiano – IF Goiano – campus Rio Verde.

À CAPES, pela bolsa concedida.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Cíntia Alves Porfiro, filha de Antônio Batista Porfiro e Idelma Alves Silva Porfiro, nasceu no município de Rio Verde- GO, no dia 10 de dezembro de 1986. Formou-se no curso de Bacharel em Farmácia e Bioquímica pela universidade de Rio Verde em agosto de 2008. Trabalhou na usina Serra do Caiapó no município de Montividiu no ano de 2009, concluiu a pós-graduação em Farmácia Clínica pela Associação de Farmacêuticos de Ribeirão Preto- São Paulo. Formou-se em licenciatura em Química no Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde- GO, em 2014. Foi estudante vinculado(a) ao Programa Institucional de Iniciação Científica, sob a orientação da Prof.^a Cassia Cristina Fernandes Alves, no desenvolvimento do projeto: “Extração de Óleo essencial de plantas de ocorrência no cerrado e análise da influência da secagem do material vegetal sobre o teor e composição do óleo essencial”, no período de 01/08/2012 a 31/07/2013. Desenvolveu o projeto: “Avaliação da qualidade d’água do córrego marimbondo do município de Rio Verde – GO”, sob a orientação da Prof.^a. Sandra Zago Falone, no período de 01/08/2013 a 31/07/2014.

INDÍCE

	Pag.
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO.....	1
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1 Biodiversidade como fonte de biomoléculas.....	3
1.2 Cerrado	4
1.3 Plantas como fonte de moléculas.....	4
1.4 Bioatividade das plantas	7
1.5 Perfil fitoquímico das plantas	7
1.6 <i>Pterodon pubescens</i> Benth (Leguminosae)	8
1.7 Enzimas.....	11
1.7. 1 Enzima acetilcolinesterase.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.1.1 Objetivo específico	20
3 CAPITULO I	21
3.1 Introdução.....	22

3.2 Material e métodos	24
3.2.1 Material botânico	24
3.2.2 Obtenção dos extratos.....	24
3.2.3 Análise dos extratos bruto por HPLC.....	25
3.2.4 Partição do extrato metanólico.	26
3.2.5 Purificação do extrato bruto acetato de etila.....	27
3.2.6 Ensaio de bioautografia	28
3.2.7. Ensaio de inibição acetilcolinesterase em microplaca 96 poços.	30
3.2.8. Análise estatística	31
3.3 Resultados e Discussão.....	31
3.3.1 Caracterização do perfil químico.....	31
3.3.1.2 Análise dos extratos por LCMS comparativa.....	35
4.1. Placas de CCD método de Marston	44
4.2. Estudo inibição acetilcolinesterase	47
5. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	52

ÍNDICE DE TABELAS

	PAGINA
TABELA 1: Quantificação dos compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}$) nas folhas de <i>Pterodon pubescens</i>	43
TABELA 2: Identificação do perfil fitoquímico dos extratos, fases e frações da espécie <i>P.p</i> e atividade inibitória da AChE relacionada.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1: <i>Pterodon pubescens</i> Benth. A: aspecto geral da planta, arbórea. B: Folhas Fonte: Cínthia Alves Porfiro.	09
FIGURA 2: Estrutura química compostos identificados por RMN das frações das folhas de <i>P.pubescens</i> . A: sitosterol. B: Estigmasterol. C: Kaempferol. D: Quercertina . E: Catequina. F: Luteolina. Fonte: Miranda etal. ,2014.	10
FIGURA 3: Representação estrutura química alcaloides presente na espécie, <i>Coptis chinensis</i> Franch (Ranunculaceae): 1A: Berberine, 1B: Palmatine, 1C: Coptisine. Fonte: KAUFMANN et al., 2016.	11
FIGURA 4: Hidrólise da acetilcolinesterase. Fonte: WIENER et al. , 2004	13
FIGURA 5: Fluxograma da partição do extrato metanólico e obtenção das fases orgânicas das folhas de <i>P. pubescens</i> .	26
FIGURA 6: Fluxograma caracterização do perfil químico	28
FIGURA 7: Reação da acetilcolinesterase com o acetato de naftila e a subsequente formação da coloração púrpura no ensaio de TLC. (MARSTON <i>et al.</i> , 2002).	29
FIGURA 8: CCDC de extratos bruto da espécie <i>Pterodon pubescens</i> BENTH; Padrão vitexina (1); Extrato bruto metanólico (2); Extrato bruto acetato etila (3); <i>Fase hidroalcoólica E.B.M</i> (4); <i>Fase acetato etila E.B.M</i> (5); fase hexânica <i>E.B.M</i> (6); Fase Móvel: Fase Móvel:CHCl ₃ :MeOH (9:1);Revelador NP: A – UV 254 nm; B – UV 365 nm.	32
FIGURA 9: CCDC de extratos bruto da espécie <i>Pterodon pubescens</i> BEN Padrão vitexina (1); Extrato bruto metanólico (2); Extrato bruto acetato etil; <i>Fase hidroalcoólica E.B.M</i> (4); <i>Fase acetato etila E.B.M</i> (5); fase hexi; <i>E.B.M</i> (6); Fase Móvel: BAW. Revelador NP: A – UV 254 nm; B – UV nm.	33
FIGURA 10: CCDC das frações do extrato bruto acetato de etila das espécies de <i>Pterodon pubescens</i> . Fase móvel: Hexano/acetato de etila	34

7:3v/v. **1.** Fr01. **2.**Fr02. **3.** Fr03.**4.** Fr04. **5.** Fr05. **6.** Fr06. Revelador:
Vanilina sulfúrica

FIGURA 11: Cromatografia em LCMS para o íon ácido gálico. A: Padrão. 36
B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico

FIGURA 12: Cromatografia em LCMS para o íon ácido ferúlico. A: 38
Padrão. B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico

FIGURA 13: Cromatografia em LCMS para o íon Apigenina. A: Padrão. 39
B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico.

FIGURA 14: Cromatografia em LCMS para o íon Kaempferol + 40
luteolina. A: Padrão. B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico.

FIGURA 15: Cromatografia em LCMS para o íon Quercetina. A: Padrão. 41
B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico.

FIGURA 16: Cromatografia em LCMS para o íon ácido rosmarínico A: 42
Padrão. B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico.

FIGURA 17: Cromatografia em LCMS para o íon rutina A: Padrão. B: 43
Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico.

FIGURA 18: Placas cromatográficas dos extratos brutos metanólico *P.p* e 44
AcOEt das folhas de *Pterodon pubescens*. (1) Extrato acetato de etila; (2) extrato metanólico. Fases móveis: (A) hexano:AcOEt (8:2), (B) CHCl₃:MeOH (9:1) e (C) BAW.(butanol + ácido acético, demonstrando o perfis (halos brancos) de inibição enzimática.

FIGURA 19: Placas de CCD. **A.** Fases extrato bruto metanólico.1. 45
Hidroalcoólica.2. Acetato de etila. 3. Hexânica. **B.** Frações extrato bruto acetato de etila. Fase móvel: CH₃Cl:MeOH: (9:1)v/v **1.** FR1.1.2.Fr1.2. **3.**FR1.3. **4.**FR3.1. **C.** Frações extrato bruto acetato de etila. Fase móvel: Hexano:acetato etila 7:3 (v/v). **1.** FR1.1.2. Fr1.2. **3.**FR1.3. **4.**FR3.1, demonstrando o perfis (halos brancos) de inibição enzimática

FIGURA 20: Porcentagem de inibição do extrato bruto acetato de etila e 47
metanólico frente a enzima acetilcolinesterase. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula para extratos e minúsculas para doses do mesmo extrato) não diferem entre si, pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

FIGURA 21: Porcentagem de inibição da fase acetato de etila e 49
hidroalcoólica frente a enzima acetilcolinesterase. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula para extratos e minúsculas para doses do mesmo extrato) não diferem entre si, pelo teste de tukey a 5% de probabilidade

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACIONES E UNIDADES

- Ach - Acetilcolina iodada
- AChE- Acetilcolinesterase
- AcOET- Acetato de etila
- BAW- Butanol, Ácido Acético e Água
- BSA- Albumina de Soro Bovina
- CCD- Cromatografia camada delgada
- CBs- Carbamatos
- ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoabsorção)
- Hex- Hexano
- LCMS- Cromatógrafo líquido acoplado ao espectro de massas
- MeOH- Metanol
- NP/PEG – difenilboriloxie tilamina
- Mg- miligramas
- OP- Organofosforados
- PNPA: Para- nitro fenil acetato
- Pp* - *Pterodon pubescens*
- µL: unidade volumétrica – microlitros (10^{-6} L).
- µg- unidade massa - microgramas
- %- Por /cento

RESUMO

PORFIRO, C.A. **Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase frente aos extratos das folhas de *Pterodon pubescens* Benth.** Orientador: Paulo Sérgio Pereira.

O uso de pesticidas tem gerado preocupações, principalmente na saúde humana e contaminação ambiental. Os carbamatos e organofosforados são inseticidas sintéticos utilizados como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). Em virtude dessa problemática é relevante investigar novas alternativas com uso de produtos naturais. O bioma do Cerrado é vasto e abrange grande variedade em espécies vegetais com atividade biológica. A espécie *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae) é nativa do cerrado, conhecida popularmente como sucupira branca e rica em metabólitos bioativos. Objetivou-se com este trabalho avaliar atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase por extratos das folhas de *Pterodon pubescens* Benth. O perfil fitoquímico foi avaliado por cromatografia em camada delegada comparativa, para extratos brutos (metanol e acetato de etila), fases e frações, utilizou como revelador vanilina sulfúrica (terpenos) e NP (ácidos fenólicos e flavonoides). Os constituintes fenólicos e flavonoides foram quantificados por cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas (LCMS). O perfil inibitório enzimático, qualitativo e quantitativo, foi realizado por CCD e microplaca de 96 poços em leitora de ELISA a 405 nm. A análise estatística foi atingida com limite de significância de $p < 0.05$ aplicado pelo teste Tukey. Os componentes bioativos detectados foram: terpenoides, os constituintes fenólicos (ácido gálico, ácido ferúlico e ácido rosmarínico) e flavonoides (kaempferol, luteolina, apigenina, rutina e quercetina). Os resultados indicam que não houve diferença significativa de inibição entre os extratos bruto metanólico e acetato de etila e entre as fases hidroalcoólica e acetato de etila na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$. O perfil fitoquímico em CCD e os

constituintes identificados em LCMS estão relacionados ao efeito de inibição da acetilcolinesterase. Essa espécie é de importância para futuros estudos *in vivo*, purificação e isolamento de moléculas com possível efeito biopesticida.

PALAVRAS CHAVE: acetilcolinesterase, compostos fenólicos, flavonoides, biopesticidas.

ABSTRACT

The use of pesticides has generated concerns, especially in human health and environmental contamination. Carbamates and organophosphates are synthetic insecticides used as inhibitors of the acetylcholinesterase (AChE) enzyme. Due to this problem it is relevant to investigate new alternatives with the use of natural products. The Cerrado biome is vast and covers a wide range of plant species with biological activity. The species *Pterodon pubescens* Benth (leguminosae) is native in to the cerrado known popularly as white sucupira, rich in bioactive metabolites. The objective of this work was to evaluate the inhibition activity of acetylcholinesterase enzyme by extracts from leaves of *Pterodon pubescens* Benth. The phytochemical profile was evaluated by comparative delegated layer chromatography for crude methanolic and ethyl acetate extracts, phases and fractions, using the universal vanillin sulfuric developer and NP for flavonoids. The phenolic constituents and flavonoids were quantified by liquid chromatograph coupled to the mass spectrometer (LCMS). The qualitative and quantitative inhibitory profile was performed by CCDC and adapted 96-well microplate and ELISA reader at 405 nm respectively. The statistical analysis was reached with a significance limit of $p < 0.05$ applied by the Tukey test. The bioactive components detected were: Terpenoids, the phenolic constituents quantified (gallic acid, ferulic acid and rosmarinic acid) and flavonoids (Kaempferol, luteolin, apigenin, rutin and quercetin). The results indicate that there was no significant inhibition difference between crude methanolic and ethyl acetate extracts and in the hydroalcoholic and ethyl acetate phases at the recommended dose of 80 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The phytochemical profile in CCDC and components in LCMS are related to the inhibitory effect of acetylcholinesterase. This species is of great importance for future *in vivo* studies, purification and isolation of molecules with possible biopesticidal effect.

KEY WORDS: acetylcholinesterase, phenolic compounds, flavonoids, biopesticides.

INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira é um setor essencial para renda do país (Barros et al, 2009), que produz e exporta diversos alimentos como, fibras, café, soja, milho, açúcar, álcool e frutas em geral. Estimativas de prejuízos na produção desde meados do século 20 foram calculados. Os insetos causam perda de 7,7% em grãos gerando a perda anual de US \$ 14,7 bilhões na economia (OLIVEIRA et al, 2014). Os pesticidas sintéticos são utilizados na agricultura para prevenir e controlar diversas pragas. Os carbamatos, organofosforados e piretroides são compostos neurotóxicos, que em pequenas doses podem desenvolver toxicidade no ser humano (ZHANG et al., 2015).

O Brasil é considerado um dos maiores consumidores desses produtos, e consequentemente exemplificando na região Sul do país os resíduos de fungicidas, herbicidas alteraram os níveis hormonais tireoidianos em seres humanos, interferindo na qualidade de vida e saúde da população agrícola (PICOLLI et al., 2016). Devido ao uso indiscriminado desses produtos, tem ocasionado contaminação ambiental, resistência de insetos-pragas, toxicidade por contato direto ou indireto no ser humano. Com isso os inseticidas botânicos surgem como alternativa prática e sustentável para essa desordem (ZUHARAH et al., 2015).

Os recursos naturais renováveis estão distribuídos no bioma do Cerrado, composto por diversidades de espécies, com alto interesse biotecnológico para indústria farmacêutica, alimentícia e agrícola (MORZELLE et al. 2015). Nas plantas o metabolismo vegetal está condicionado aos processos fotossintéticos. Destes, resultam as substâncias do metabolismo primário, as quais irão originar os metabólitos secundários, produzidos para defesa e consequentemente para proteção contra pragas e microrganismos (Mello et al., 2014), que produzem diversas substâncias bioativas

precursoras, anabolizadas ou catabolizadas, como compostos fenólicos, terpenoides, compostos nitrogenados, alcaloides e flavonoides (MIRESMAILLI & ISMAN, 2014).

A espécie *Pterodon pubescens* Benth (Fabaceae) é conhecida popularmente como sucupira-branca, fava-de-santo-inácio e sucupira-lisa. É nativa do Cerrado brasileiro, suas cascas e sementes são comumente utilizadas na medicina popular pela ação farmacológica. Alguns terpenos detectados nessa espécie possuem efeito alelopático, inseticida e repelente, além de atividade anticolinesterásica. O extrato das folhas revelou compostos bioativos como flavonoides, saponinas, taninos, triterpenos e flavonas, com diversas propriedades biológicas (NEGRI et al., 2014). Alto teor de compostos fenólicos, como: ácido gálico, ácido ferúlico, ácido elágico, epicatequina e catequinas foram isolados da espécie *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae), e alguns exercem potente atividade antioxidante e efeito inibitório enzimático (LEMOS et al., 2012). Os extratos da espécie *Acacia nilotica* (Fabaceae) revelaram alto teor de ácido gálico (Sulaiman et al., 2013) e o kaempferol, glicosídeos de flavonol isolados, luteolina e apigenina detectado em outra espécie, ambos exibiram potente efeito inibitório frente a enzima acetilcolinesterase (LABED et al., 2016).

A enzima acetilcolinesterase, distribuída no sistema nervoso central tem papel de hidrolisar a acetilcolina, neurotransmissor presente nas fendas sinápticas, seus inibidores são utilizados com ação inseticida (HLILA et al., 2015). Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase frente aos extratos das folhas de *Pterodon pubescens* Benth.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Biodiversidade como fonte de biomoléculas

A Biodiversidade é definida como variedade e abundância de diversas formas de vida na terra, proveniente de bilhões de anos de evolução, abrange diversas espécies como: plantas, animais e microrganismos (NARDINI et al., 2010). A *Bacillus thuringiensis*, bactéria gram-positiva, torna-se uma alternativa para essa problemática, com capacidade de formar esporos e proteínas cristalinas, com efeito inseticida frente os coleópteros e lepidópteros (DEVIDAS et al., 2014). As plantas sintetizam uma diversidade de compostos bioativos, estes podem ser utilizados nas formas de óleos essenciais, extratos e pós que têm efeito de diminuir a população de pragas. O uso de extrato botânico, aleloquímicos e os óleos essenciais antecederam o uso de inseticidas orgânicos sintéticos para controle de insetos (REGNAULT-ROGER, 1997).

Os metabólitos secundários como o terpenoide limonoide, está presente em diversas famílias, os metabólitos secundários, entre estes os alcaloides encontrado em plantas da família Solanaceae, estricnina em sementes *Strychnos* spp, o neem (*Azadirachta indica*), família Meliaceae quimicamente identificado como terpenoide limonoide), tem atividade biológica contra pragas e doenças. Os monoterpenos, citronelal e geraniol, presente em óleos essenciais são compostos majoritários com atividade bioativa pesticida, antibacteriano, antisséptico e fungicida (OOTANI et al., 2013). O efeito de toxicidade dos óleos nos insetos se dá por toxicidade de contato, repelência, entre outros (MIRESMAILLI & ISMAN, 2014). Com isso surge a perspectiva de investigar essa fonte inesgotável de compostos naturais, que contribui no progresso da tecnologia e biologia molecular (BERKOV et al. , 2014).

1.2 Cerrado

A região neotropical da América do Sul, representa um terço da biodiversidade botânica mundial (DESMARCHELIER, 2010), e o Brasil é o maior representante. O ecossistema é classificado em Mata Atlântica, Pampa, Floresta Amazônica, Cerrado e Caatinga com representação de 10 a 20% do mundo (OLIVEIRA et al. , 2012). Existe grande diversidade vegetal com espécies diferentes e extensa microbiota ainda desconhecida, que podem ser fontes promissoras para produção de vários compostos (DUARTE et al. , 2013).

O Cerrado abrange mais de 204 milhões de hectares na região central do Brasil, considerado o segundo maior bioma extenso da América do Sul. Com cerca de 4400 espécies de plantas é identificado como um dos hotspots de biodiversidade do mundo (BAILÃO et al. , 2015). Distribuído nos estados Bahia, Mato Grosso, Goiás Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas, Paraná e São Paulo entre outros, sendo que 40% da área do cerrado está ocupada em terras diferentes como, pastagens e culturas agrícolas ocupando cerca de 26% e 10,5% deste bioma respectivamente, com distribuição heterogênea (SANO et al., 2008). O cerrado contém solos pobres em nutrientes, acidez associada e elevados níveis de alumínio os quais interferem na baixa fertilidade do solo (HARIDASAN, 2008). O clima é dividido em período de seca de abril a setembro e úmido de outubro a março. Algumas espécies tem sua adaptação no período de seca e as queimadas são frequentes que influenciam a germinação de algumas sementes e permite sincronização da floração em algumas espécies (NOVAES et al., 2013).

1.3 Plantas como fonte de moléculas

As plantas encontradas no cerrado vêm se destacando quanto a fonte de compostos bioativos (KROYMANN, 2011), diversas espécies possuem atividade inseticida, fungicida, fitotóxica e farmacológica, que são utilizadas no mercado por meio de óleos essenciais e extratos de raízes e folhas (WINK, 2010). Os compostos naturais têm grande importância na interferência das plantas com meio ambiente, o ambiente biótico tem função de atrair polinizadores ou dispersores de sementes na defesa de inimigos naturais, podem também agir como aleloquímicos na competição com outras plantas

(KROYMANN, 2011). Entre as classes de substâncias, destaca-se os compostos fenólicos, que são comumente encontrados em espécies vegetais do cerrado, provenientes da exposição ao estresse hídrico, alta radiação, herbívora e infecções por fungos. Essas classes de metabólitos incluem diversas atividades biológicas, ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e citoproteção. Assim, o Bioma do cerrado torna-se um ótimo candidato para estudos de bioprospecção (BAILÃO et al., 2015).

As plantas estão condicionadas a diversos fatores bióticos e abióticos que evoluíram para ter a sua sobrevivência, as rotas de biossíntese sintetizam e acumulam variedade de metabólitos secundários. Os metabólitos têm conexão química entre a planta e meio ambiente, entretanto a sua síntese é sucessivamente afetada por condições ambientais tais como, salinidade, temperatura, condições de umidade, nutrientes minerais (KUTCHAN et al, 2001). Todavia a síntese dessas diferentes classes de metabólitos em respostas a estas condições é algo para adaptação da planta para tolerar aos estresses bióticos e abióticos (RAMAKRISHNA, & RAVISHANKAR, 2011). Com as variações climáticas que ocorrerem durante todo o ano, tem-se buscado período adequado para obter melhores extrações em termos de rendimento e concentrações de compostos bioativos (CASTELO et al., 2012). Os metabólitos secundários são identificados nos órgãos das plantas incluindo folhas, flores, raízes, sementes, cascas e grãos de pólen, porém os compostos majoritários são encontrados em folhas e raízes e também são distribuídos conforme a sua rota biossintética (WU et al., 2009).

Os óleos essenciais são obtidos de plantas pelo método de destilação por arraste à vapor de água. Os óleos essenciais têm natureza terpênica, característica volátil e seus constituintes químicos majoritários têm baixo peso molecular, como monoterpenos, sesquiterpenos e compostos aromáticos. Alguns fatores são interferentes na composição química desses compostos como, clima, época do ano, condições geográficas, horário de coleta, técnica de destilação, obtenção e seu armazenamento (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

Os óleos essenciais sintetizados nas plantas estão relacionados com sua volatilidade para a atração de polinizadores, diminuição da perda d'água, proteção da planta contra predadores e patógenos, além de inibidores da germinação. Têm ação atraente e repelente aos organismos vivos, facilidade de obtenção e análise, toxicidade mínima aos animais como os mamíferos. Os óleos essenciais têm mostrado potencialidade como precursor de novas moléculas inseticidas, cujos modos de ação

podem variar de acordo com os seus constituintes químicos. Entretanto, têm se constatado efeitos por fumigação, contato e repelência (WANG et al., 2014).

O método de extração químico, tem finalidade de extrair substâncias do metabolismo secundário das plantas. A extração é um processo importante, pois a escolha do método utilizado pode definir a constituição e rendimento dos extratos. A utilização de extratos botânicos é uma das formas de obtenção de moléculas biorracionais com atividade pesticida, o solvente utilizado e sua polaridade tem influência sobre a extração dos componentes da planta, que conseqüentemente podem afetar quantitativamente e qualitativamente a atividade biológica (MARTINS et al., 2013).

Os extratos são denominados aquosos quando o solvente é água e orgânicos quando se utiliza metanol, etanol, acetona, álcool, hexano, dentre outros. Os extratos orgânicos são compostos por complexa mistura de compostos ativos. O uso de extratos de plantas é alternativa para controle de insetos fitófagos, ação fungitóxica, além de ter baixo custo operacional, facilidade de preparação e segurança para o meio ambiente (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

O método cromatográfico distingue-se entre os vários métodos de separação e de análise, sendo o mais escolhido em resultados satisfatórios e mais rico em número de variadas técnicas para identificação de substâncias bioativas. A bioautografia em camada delgada (TLC), está interligada com a separação cromatográfica com atividade biológica *in situ* e é capaz de identificar de maneira rápida e direta compostos ativos em extratos complexos. Esses compostos podem ser separados em superfície planar em placas com fase estacionária feitas de sílica. É de baixo custo, fácil operação e é necessária pequena quantidade de solvente (YANG et al., 2015).

A Cromatografia de Líquidos ou HPLC (High Performance Liquid Chromatography) consiste num método analítico que tem por função separar distintas espécies químicas presentes numa amostra. A separação processa-se por meio de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas do soluto (amostra) e duas fases, uma estacionária e outra móvel. A fase estacionária refere-se à coluna cromatográfica, ou seja, um cilindro rígido (normalmente de aço ou vidro) no interior do qual se encontra um material de enchimento formado por pequenas partículas. A fase móvel ou solvente flui continuamente através do sistema, arrastando a amostra injetada pela coluna e pelo detector. (CHUST, 1990).

1.4 Bioatividade das plantas

O gênero *Schinus* da família Anacardiaceae engloba cerca de 600 espécies como *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Schinus molle* Hort, *Schinus lentiscifolius* Marchare são espécies comumente usadas na medicina para diferentes problemas de saúde, com atividade antimicrobiana, medicamentos antissépticos, para inflamação uterina, feridas e ação analgésica (GEHRKE et al 2013). Estudos fitoquímicos demonstraram compostos isolados dessa espécie como sesquiterpenos, triterpenos, flavonoides e saponinas (Dias et al., 2008). A família Lauraceae é composta por aproximadamente 3000 espécies distribuídas em 52 gêneros encontradas em regiões tropicais e subtropicais quentes. O gênero *Ocotea* é considerado o maior dessa família, contém 350 espécies predominantemente encontradas em regiões neotropicais (TAKAKU et al., 2007). Atividade antibacteriana e antifúngica têm sido encontrada nesse gênero e espécies (Bruni et al., 2004) e também anticolinesterásica (YAMAGUCHI et al., 2012).

O gênero de *Ocimum* da família Lamiaceae contém compostos como fenilpropanoides, terpenos. A característica inseticida de óleos essenciais e seus constituintes têm sido alvo de pesquisas pelas característica de controle de diferentes pragas agrícolas e vetores de doenças. Os compostos foram aplicados nos insetos e apresentaram efeito fumigante, deterrente, tóxico e efeito deletério as pragas (KIM, LEE, 2014). Diante desse contexto, o uso de espécies do cerrado em estudos envolvendo atividade fitotóxica e inseticida se mostra promissora.

1.5 Perfil fitoquímico das plantas

Os terpenos são as maiores classes de metabólitos secundários presentes nas plantas, são substâncias hidrofóbicas localizadas em flores, raízes, tecidos vegetativos e sua via metabólica é a partir do acetil-COA, ácido mevalônico ou moléculas glicosídicas como o piruvato (WINK, 2010). Sua estrutura carbônica é formada por resíduos de isopreno, sendo classificado pelo número de carbonos presentes: monoterpenos (dez carbonos), sesquiterpenos (quinze carbonos), diterpenos (vinte carbonos), triterpenos

(trinta carbonos), tetraterpenoides ou carotenoides (quarenta carbonos) (ZWENGER e BASU, 2008).

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem um anel aromático, contêm um ou mais substituinte hidroxilas. Sua estrutura química pode variar de moléculas simples como ácidos fenólicos (ácido gálico) ou polímeros de elevada massa molecular (taninos), e são classificados como compostos solúveis em água (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides e quinonas) e não solúveis (taninos, ligninas). A rota biossintética é por meio da via do ácido chiquímico e do mevalônico (HAMINIUK et al., 2012).

Os compostos nitrogenados são alcaloides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não proteicos e são bastante comuns nos vegetais. Sua característica química é ter nitrogênio na molécula em um ou mais anéis heterocíclicos de carbono, e são sintetizados por aminoácidos como lisina, triptofano e tiamina. Tem característica alcalina e solúvel em água. Os alcaloides têm sido isolados de microrganismos, fungos e plantas, e são os compostos majoritários de maior interesse nos vegetais (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Existe uma semelhança entre atividade biológica desses grupos. Alguns terpenos possuem efeito alelopático, inseticida e repelente, além de atividade anticolinesterásica. Os compostos fenólicos contêm diversas atividades medicinais, ação de inibir enzimas, antioxidante, bactericida e fungicida. O efeito antioxidante deve-se a capacidade redutora da hidroxila ligada ao anel aromático dos fenóis. Os compostos nitrogenados como por exemplo os alcaloides têm efeito inseticida, muitos têm ação contra herbívoros e patógenos bem como inibição de espécies de plantas (alelopatia) (OOTANI et al., 2013).

1.6 *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae)

Dentre as dicotiledôneas a família Fabaceae (Leguminosae) é considerada umas das maiores, é subdividida em três subfamílias como: Papilionoideae, Caesalpinoideae e Mimosoideae. São distribuídas em 3200 espécies nos principais biomas brasileiros, no cerrado contêm cerca de 777 espécies e 101 gêneros (ALVES et al. , 2013).

O gênero *Pterodon* é pertencente à família Fabaceae amplamente distribuído sobre as savanas do centro e sul do Brasil. *Pterodon pubescens* Benth (sinônimo *Pterodon*

emarginatus Vogel. e *Pterodon polygalaeflorus* Benth.) é conhecida como “sucupira”, “sucupira-branca” ou “faveira”. É uma espécie nativa do Cerrado brasileiro e distribuída nos estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo que pode atingir de 8 a 15 m de altura (Hansen et al., 2010), como demonstrado na (Figura 1). O período de floração ocorre entre setembro e outubro, a maturação de seus frutos entre junho e julho em um período de seis meses (LORENZI, 2008).

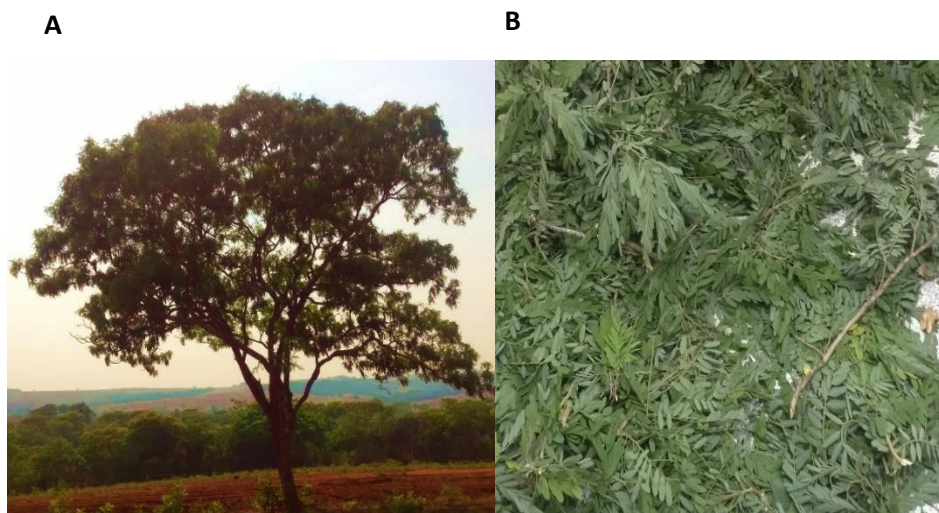


Figura 1: *Pterodon pubescens* Benth. **A:** aspecto geral da planta, arbórea. **B:** Folhas
Fonte: Cíntia Alves Porfiro.

Diversas classes de metabólitos secundários como alcaloides, isoflavonas e diterpenos são encontrados em espécies desse gênero (SERVAT et al., 2012). Em estudos fitoquímicos realizados por Miranda et al. (2014) na parte aérea de *P. pubescens* verificaram alguns compostos isolados como sesquiterpenos, flavonoides, esteroides, feofitina e ácido benzoico. No extrato etanólico das folhas, foram identificados compostos como: saponinas, taninos, triterpenos e esteroides descritos por Arrais-Silva et al., (2014). No extrato etanólico das sementes de *Pterodon pubescens* (EEPp), foi encontrado terpenos, tais como: farnesol, geranilgeraniol e diterpenos (HOSCHEID et al., 2013). As sementes também são comercializadas para fins medicinais com propriedades antirreumática, analgésica, anti-inflamatória e antimicrobiana (MENNA-BARRETO et al., 2008). Através do processo de purificação realizada em sílica, as frações das folhas de *P. pubescens* foram identificadas por RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) algumas substâncias: kaempferol, quercetina, catequina, luteolina, rutina, feofitina β -sitosterol, estigmasterol, ácido *p*-hidroxibenzoico, como demonstrada na (Figura 3) sequencialmente (MIRANDA et al., 2014).

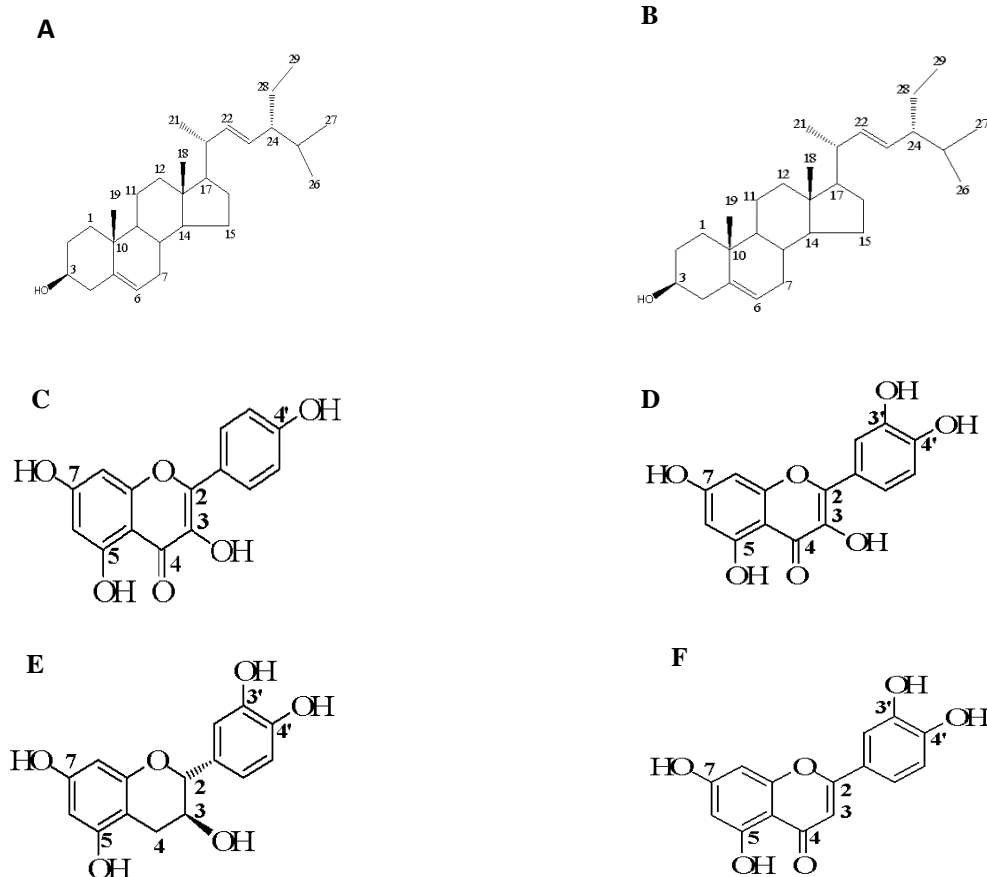


Figura 2: Estrutura química compostos identificados por RMN das frações das folhas de *P. pubescens*. A: sitosterol. B: Estigmasterol. C: Kaempferol. D: Quercertina .E: Catequina. F: Luteolina. **Fonte:** Miranda etal. ,2014.

Diversas famílias como: Rutaceae e Meliaceae incluem diversos compostos bioativos, os alcaloides por exemplo têm atividade inseticida (NEBO et al.,2014). O potente efeito inibitório da enzima acetilcolinesterase foi detectado frente a diversas plantas como: *Berberis bealei* Carrière (Berberidaceae), *Coptis chinensis* Franch (Ranunculaceae) e *Phellodendron chinense* Scheid (Rutaceae). A característica fitoquímica dos alcaloides nos extratos bruto dessas espécies estão relacionados a atividade inibição da enzima. Análises realizadas por HPLC detectaram na espécie *Coptis chinensis* Franch (Ranunculaceae) compostos como: berberine, palmatine e coptisine que revelaram forte inibição da enzima acetilcolinesterase, demonstrado na figura 4. A forte característica inibitória dessa classe está relacionada ao nitrogênio carregado positivamente, pode se ligar ao sítio ativo da acetilcolinesterase ocasionando o efeito inibitório (KAUFMANN et al., 2016).

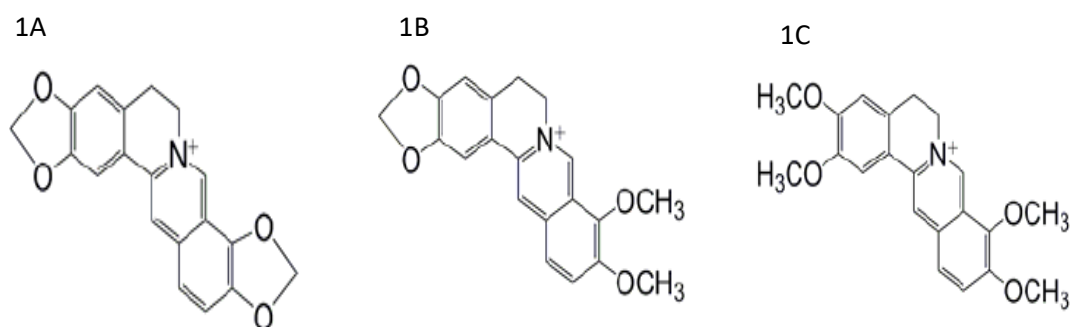


Figura 3: Representação estrutura química alcaloides presente na espécie, *Coptis chinensis* Franch (Ranunculaceae): 1A: Berberine, 1B: Palmatine, 1C: Coptisine. Fonte: KAUFMANN et al., 2016.

Novas classes de sesquiterpenos têm sido investigado em diversas espécies, em *Amberboa ramosa* (Asteraceae) foram isolados e classificados como lactonas sesquiterpênicas, testes biológicos detectaram atividade inibitória da acetilcolinesterase (IBRAHIM et al., 2013). Os extratos aquoso e etanólico de *Pulmonaria officinalis* e *Centarium umbellatum* constatarem a presença de diversos flavonoides, como polifenóis, flavonas e proantocianidinas que têm forte característica antioxidante, anticancerígeno, anti-inflamatório e antimicrobiano, todavia os resultados para atividade anticolinesterásica mostraram que o extrato etanólico de ambas espécies teve maior inibição frente a enzima AChE comparando com extrato aquoso, isso se deve ao alto teor de flavonas presente na amostra (NEAGU et al. , 2016). Essas classes de metabólitos têm sido utilizadas para diversas atividades biológicas como citada anteriormente, os efeitos destes compostos como bioinseticida indicam algo promissor no combate de pragas agrícolas

1.7 Enzimas

Enzimas são proteínas globulares e catalisadores biológico, agem como dispositivos moleculares que determinam padrões de transformação químico no sistema biológico. A atividade enzimática está relacionada com a estrutura tridimensional, e sua função é realizar as reações químicas no organismo. A potência e sua especificidade é

uma característica marcante. O sítio ativo é local em que ocorre a catálise enzimática, sua especificidade é determinada pela característica hidrofílica e hidrofóbica do substrato (WHITEHURST e OORT, 2010). As esterases são classes de enzimas de grande importância atualmente, têm função de quebrar grupamento de ésteres de colina, faz parte do sistema de defesa dos xenobióticos e têm sido foco nas pesquisas do metabolismo e resistência aos inseticidas, são empregadas no metabolismo de hormônios e feromônios e no desenvolvimento dos insetos (OAKESHOTT et al., 2005). Alguns inibidores enzimáticos estão relacionados a essa classe de enzimas citadas acima. Inibidores enzimáticos são moléculas que diminuiu ou interrompem a catálise, os organofosforados e carbamatos são tipos de inseticida sintéticos que inibem as esterases principalmente a acetilcolinesterase, que têm ação específica no sistema nervoso central (STENERSEN, 2004).

Existem dois tipos de inibição relacionados as enzimas, as reversíveis e irreversíveis. Na inibição irreversível o inibidor liga-se covalentemente ao sítio ativo da enzima, ocasionando modificações químicas e destruição no grupo funcional ocasionando sua inativação. Na inibição reversível, ocorre ligação não covalente entre inibidor e a enzima, após a dissociação com inibidor a enzima retorna a sua atividade (NELSON & COX, 2011). Na inibição competitiva, a enzima se liga ao substrato formando complexo enzima-substrato (ES) ou enzima-inibidor (EI), o inibidor se assemelha ao substrato normal, que ao se ligar no sítio ativo, impede sua ação enzimática. Com isso o inibidor diminui a taxa de catálise reduzindo a proporção de moléculas de enzimas ligadas ao substrato. A reação não competitiva é um contraste à inibição competitiva, o inibidor se liga diretamente ao complexo enzima-substrato, a enzima não se assemelha ao substrato e não se torna livre, isto provavelmente distorce o sítio ativo tornando a enzima cataliticamente inativa (MARANGONI, 2003).

1.7. 1 Enzima acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE E.C. 3.1.1.7) é uma enzima que pertence à família das esterases, que está localizada em fibras sensoriais, neurônios motores, tecidos musculares condutores e atua especificamente em locais que ocorre sinapses nervosas. Contém propriedades catalíticas, com dois subsítios, um esterásico e um sítio aniônico

demonstrado na (Figura 5). Seu mecanismo de ação é hidrolisar o neurotransmissor colinérgico acetilcolina (ACh), responsável pela propagação de impulso nervoso no Sistema Nervoso Central. Com processo de hidrólise da ACh, a fenda sináptica ficará disponível para receber novas transmissões sinápticas colinérgicas antes da chegada de um novo impulso elétrico (SHAH et al., 2016). Esse neurotransmissor colinérgico sintetizado é armazenado em vesículas do neurônio pré-sináptico que ao ser hidrolisado tem como produto a acetato e colina (MOTA et al.; 2012).

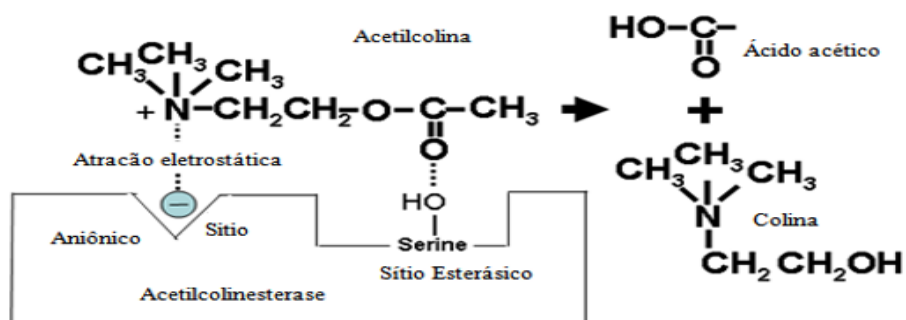


Figura 4: Hidrólise da acetilcolinesterase. Fonte: WIENER et al., 2004

A ACh contém dois tipos de receptores no sistema nervoso central, os receptores muscarínicos e os nicotínicos, e são reclassificados de acordo com a localização no corpo. A ação da ACh é exercida quando se liga a esses receptores. Em geral, os receptores muscarínicos se localizam no sistema nervoso central, glândulas exócrinas e órgãos inervados pelo sistema nervoso autônomo parassimpático. Na membrana pós-sináptica, acontece a união do receptor nicotínico, que permite a abertura de canais de íons Na⁺, despolarizando a membrana, propagando o impulso nervoso. Se houver inibição da AChE não ocorrerá hidrólise da ACh nas sinapses, provocando acúmulo anormal causando alterações comportamentais no ser humano e insetos.

Os organofosforados (OPs), carbamatos (CBs) são importantes classes de inseticidas orgânicos, que persistem no meio ambiente por tempo relativamente curto e exercem toxicidade aguda, provocando perigo para vida selvagem (OTERO; KRISTOFF, 2016). Do ponto de vista toxicológico são compostos que exercem inibição da enzima AChE, culminando em acúmulo de ACh nas junções neuromusculares, resultando em hiperativação, broncoconstrição, alteração nos reflexos motores, espasmos de respiração, ataxia, tremores e fechamento do centro de controle respiratório do cérebro. Dependendo do grau de intoxicação, pode levar a morte mamíferos e insetos (COBAN et al., 2016).

Os organofosforados (OPs) são inibidores irreversíveis da AChE e seu efeito de causar letalidade depende da dosagem. Esse efeito está relacionado a ligação covalente entre fósforo do composto e oxigênio pertencente ao grupo hidroxila de serino catalítica (Ochoa et al., 2016). Os carbamatos (CBs) são xenobióticos típicos, agem no mesmo sítio ativo dos organofosforados, a hidrólise da AChE acontece mais rápida comparando aos OPs (STENERSEN, 2004). São considerados inibidores reversíveis que concorrem com o neurotransmissor acetilcolina pelo sítio ativo da acetilcolinesterase, sua toxicidade é menor comparando aos organofosforados (ASSIS, 2011).

Com a diversidade de metabólitos detectados nas folhas, sementes, frutos de *Pterodon pubescens* e relatos desses compostos com ampla atividade biológica, torna-se algo promissor investigar e avaliar atividade inibição enzimática dessa espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. F. et al. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 224–229, 2013.

AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n.11, p.1720–1731, 2011.

ASSIS, C. R. D. Acetilcolinesterase cerebral e eritrocitária como biomarcadores in vitro da exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos. **Universidade Federal De Pernambuco Centro de Ciências Biológicas Doutorado em Bioquímica E Fisiologia Acetilcolinesterase**, p. 198, 2011.

BARROS, G. S. DE C.; SPOLADOR, H. F. S.; BACCHI, M. R. P. Supply and demand shocks and the growth of the Brazilian agriculture. **Revista Brasileira de Economia**, v. 63, n. 1, p. 35–50, 2009.

BAILÃO, E. et al. Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23760–23783, 2015.

BERKOV, S.; MUTAFOVA, B.; CHRISTEN, P. Molecular biodiversity and recent analytical developments: A marriage of convenience. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1102–1110, 2014.

BRUNI, R. et al. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam ... Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea qu.* **Food Chemistry**, p. 415–421, 2004.

CASTELO, A. V. M.; MENEZZI, C. H. S. DEL; RESCK, I. S. Seasonal Variation in the Yield and the Chemical Composition of Essential Oils from Two Brazilian Native Arbustive Species. **Journal of Applied Sciences**, v. 12, n. 8, p. 753–760, 2012.

COBAN, A. et al. Comparison of inhibition kinetics of several organophosphates, including some nerve agent surrogates, using human erythrocyte and rat and mouse brain acetylcholinesterase. **Toxicology Letters**, v. 248, p. 39–45, 2016.

CHUST, R. B. Introdução Cromatografia de Líquidos. **Boletim Sociedade Portuguesa De Química**, p. 43–54, 1990.

DUARTE, S. H. et al. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 377–381, 2013.

DESMARCHELIER, C. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: why isn't South American biodiversity on the crest of the wave? **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 791–799, 2010.

GEHRKE, I. T. S. et al. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 486–491, 2013.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of “sucupira” (*Pterodon* spp.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 607–616, 2010.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Phenolic compounds in fruits - an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023–2044, 2012.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 3, p. 183–195, 2008.

HOSCHEID, J. et al. Inhibitory Effect of the Hexane Fraction of the Ethanolic Extract of the Fruits of *Pterodon pubescens* Benth in Acute and Chronic Inflammation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

HLILA, M. B. et al. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of roots extracts from the Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 62–69, 2015.

IBRAHIM, M. et al. Acetyl and butyryl cholinesterase inhibitory sesquiterpene lactones from *Amberboa ramosa*. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 1, p. 116, 2013.

KAUFMANN, D. et al. Extracts from Traditional Chinese Medicinal Plants Inhibit Acetylcholinesterase, a Known Alzheimer's Disease Target. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1161, 2016.

KIM, S.; LEE, D. Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 1, p. 13–17, 2014.

KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 125, n. 1, p. 58–60, 2001.

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 3, p. 246–251, 2011.

LEMOS, M. R. B. et al. The effect of roasting on the phenolic compounds and antioxidant potential of baru nuts [*Dipteryx alata* Vog.]. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 592–597, 2012.

LABED, A. et al. Compounds from the pods of *Astragalus armatus* with antioxidant, anticholinesterase, antibacterial and phagocytic activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3026–3032, 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa – Instituto Plantarum. 2ª ed. p. 576, 2008.

MARANGONI, A. G. Reversible Enzyme Inhibition. In _____. **Enzyme kinetic. A Modern Approach**. New Jersey, Pais: Canada: Copyright. p.61-70, 2003.

MELLO, M. B. DE et al. Atividade inseticida do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* no controle de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). **Revista Agrogeoambiental**, v. 6, n. 1, p. 13, 2014.

MORZELLE, M. C. et al. Caracterização Química e Física de Frutos de Curriola, Gabiroba e Murici Provenientes do Cerrado Brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 96–103, 2015.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Anti-Trypanosoma cruzi activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 111–117, 2008.

MIRANDA, M. L. D. et al. Sesquiterpenes and other constituents from leaves of *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 473–476, 2014.

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M. B. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 1, p. 29–35, 2014.

MOTA, W. M. et al. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 4, p. 624–628, 2012.

NEAGU, E. et al. Antioxidant activity, acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of *Pulmonaria officinalis* and *Centarium umbellatum* extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2016.

NEBO, L. et al. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 226–232, 2014.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª edição. Editora Artmed, p.1273 2011.

NOVAES, P. et al. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 839–855, 2013.

NEGRI, G.; MATTEI, R.; MENDES, F. R. Antinociceptive activity of the HPLC- and MS-standardized hydroethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel leaves. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8–9, p. 1062–1069, 2014.

NARDINI, E.; KISAND, V.; LETTIERI, T. **Microbial genetic biodiversity and molecular approach**. Luxembourg: European Union, p. 1-49, 2010.

OCHOA, R.; RODRIGUEZ, C. A.; ZULUAGA, A. F. Perspectives for the structure-based design of acetylcholinesterase reactivators. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 68, p. 176–183, 2016.

OAKESHOTT J.G. et al. Biochemical Genetics and Genomics of Insect Esterases. In _____. **Insect control biological and synthetic agents**. Oxford: Elsevier BV. All rights reserved. p. 309-312. 2005.

OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170–179, 2012.

OOTANI, M. A. et al. Use of Essential Oils in Agriculture Use of Essential Oils in Agriculture. **journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. March 2013, p. 162–174, 2013.

OTERO, S.; KRISTOFF, G. In vitro and in vivo studies of cholinesterases and carboxylesterases in *Planorbarius corneus* exposed to a phosphorodithioate insecticide: Finding the most sensitive combination of enzymes, substrates, tissues and recovery capacity. **Aquatic Toxicology**, v. 180, p. 186–195, 2016.

OLIVEIRA, C. M. et al. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50–54, 2014.

PICCOLI, C. et al. Pesticide exposure and thyroid function in an agricultural population in Brazil. **Environmental Research**, v. 151, p. 389–398, 2016.

REGNAULT-ROGER, C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 2, n. 1, p. 25–34, 1997.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. **Annual Review of Entomology**, v. 57, n. 1, p. 405–424, 2012.

SANO, E. E. et al. Notas Científicas Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 43, n. 1, p. 153–156, 2008.

SHAH, M. S. et al. Cholinesterases inhibition and molecular modeling studies of piperidyl-thienyl and 2-pyrazoline derivatives of chalcones. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 4, p. 615–624, 2017.

SERVAT, L. et al. *Pterodon pubescens* Benth: Stability Study of Microencapsulated Extract and Isolated Compounds Monitored by Antinociceptive Assays. **journal Brazilian chemical Society**, v. 23, n. 7, p. 1244–1253, 2012.

STENERSEN, J. Chemical pesticides mode of action and toxicology. Boca Raton London New York Washington, p. 274, 2004.

SULAIMAN, C. T. et al. Chromatographic Studies and in vitro Screening for Acetyl Cholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of three Acacia Species from South India. **Analytical Chemistry Letters**, v. 3, n. 2, p. 111–118, 2013.

TAIZ, K., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre. Editora Artmed, p.918, 2013.

TAKAKU, S.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of Ocotea (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 8, p. 525–532, 2007.

WANG, X. et al. Fumigant, contact, and repellent activities of essential oils against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 1, p. 75–75, 2014.

SCHWAN-ESTRADA, et al. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, p.88-93, 2008.

WHITEHURST, R. J. & OORT. **Enzymes in Food Technology Second edition Edited by**. 2. ed. Singapura:, 2010.

WINK, M. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. In: **Annual Plant Reviews Volume 40**. 2. ed. [s.l.] Wink M. Wiley - Blackwell, 2010. v. 40p. 1–19.

YAMAGUCHI, et al. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 541–546, 2012.

YANG, Y. et al. Rapid Identification of α -Glucosidase Inhibitors from *Phlomis tuberosa* by Sepbox Chromatography and Thin-Layer Chromatography Bioautography. **Plos one**, p. 1–13, 2015.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnolog and Molecular Biology Reviews**, v. 3, p. 1–7, 2008.

ZHANG, Y. et al. A novel layer-by-layer assembled multi-enzyme/CNT biosensor for discriminative detection between organophosphorus and non-organophosphorus pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 287–295, 2015.

ZUHARAH, W. F. et al. Toxicity and sub-lethal effect of endemic plants from family Anacardiaceae on oviposition behavior of *Aedes albopictus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 612–618, 2015.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase frente aos extratos metanólicos e em acetato de etila de *Pterodon pubescens* Benth.

2.1.1 Objetivo específico

- ✓ Avaliar atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase frente ao extrato de *Pterodon pubescens* Benth pelo método qualitativo de cromatografia camada delgada comparativa e quantitativo em microplaca 96 poços;
- ✓ Purificar os extratos brutos e identificar o perfil químico.

3 CAPÍTULO I

PORFIRO, C.A. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO. 2017. **Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase por extratos das folhas de *Pterodon pubescens* Benth.** Orientador: Paulo Sérgio Pereira.

RESUMO

Em virtude da resistência e os danos causados pelos agrotóxicos comerciais, investigações na área de produtos naturais vêm sendo estudadas. Existem oportunidades de avanço com uso racional dos produtos naturais, disponíveis na vasta flora brasileira. Além disso, tem realizado um importante papel no controle de pragas, por meio de síntese de novas moléculas para uso na agricultura. Algumas moléculas biorracionais agem como inibidores de enzimas, como exemplo a acetilcolinesterase, que atua no sistema nervoso central e periférico. Ao inibir a enzima danificará o funcionamento normal desse sistema, que pode levar a morte do inseto. Com isso, objetivou-se avaliar atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase por extratos das folhas de *Pterodon pubescens* Benth. O extrato bruto metanólico e acetato de etila foram caracterizados quanto ao perfil fitoquímico através de análises por cromatografia em coluna e em camada delgada CCDC, bem como as fases acetato de etila, hidroalcoólica e hexânica, os constituintes fenólicos e flavonoides foram quantificados por LCMS. A Avaliação do perfil inibitório qualitativo e quantitativo, foi realizado por CCDC e microplaca de 96 poços adaptado e em leitora de ELISA a 405 nm respectivamente. A análise estatística foi avaliada com limite de significância de $p < 0.05$ aplicado pelo teste Tukey. Os componentes detectados foram: Terpenoides, os constituintes fenólicos quantificados ácido gálico, ácido ferúlico, ácido rosmarínico e flavonoides: kaempferol, luteolina, apigenina, rutina e quercetina.

Os resultados indicam que não houve diferença significativa de inibição entre os extratos bruto metanólico, acetato de etila e nas fases hidroalcoólica e acetato de etila na dose recomendada de 80 µg/mL, com valores inibitórios seguidos de 73%, 77%, 79% e 70 %, respectivamente. O perfil fitoquímico detectado é pertinente a resposta inibitória avaliada frente a acetilcolinesterase. Isso relata a importância dessa espécie vegetal para o setor agrícola, sendo uma fonte promissora para futuros estudos de compostos bioativos sobre a enzima presente nos insetos.

PALAVRAS-CHAVE: atividade enzimática, inseticidas botânicos, perfil fitoquímico

3.1 Introdução

Os organofosforados e carbamatos são pesticidas comercializados em todo mundo, atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável por hidrolisar o neurotransmissor colinérgico acetilcolina, responsável pela propagação de impulso nervoso no sistema nervoso central. O uso desses inseticidas altera as sinapses colinérgicas, ocasionando alterações comportamentais, hiperatividade, asfixia e possivelmente a morte do inseto. A utilização para controle e prevenção de insetos-pragas na agricultura, tem ocasionado transtornos ambientais e problemas na saúde humana e animal (King & Aaron, 2015).

Com isso tem gerado busca por produtos naturais, que exerçam atividade inseticida. Diversas plantas localizadas no Cerrado brasileiro podem desempenhar papel no desenvolvimento da agricultura sustentável e pesticidas biológicos (Brum et al., 2014). Os extratos de Neem, Kortummam, tabaco são utilizados por agricultores para controlar e repelir pragas na cultura. Os ingredientes ativos provenientes dos extratos de plantas podem ser utilizados para controlar multiplicidade de pragas e insetos. Os extratos de plantas não exercem desequilíbrio e não têm efeito residual (BAKER et al., 2015).

A pesquisa de produtos naturais tem experimentado um avanço tecnológico, que permite investigação inesgotável de produtos bioativos (Berkov et al., 2014). As plantas por meio do metabolismo bioquímico, sintetizam metabólitos com atividade biológica. A *Pterodon pubescens* Benth é conhecida como sucupira branca e pertencente à família Fabaceae, sendo localizada no Cerrado brasileiro. Esta espécie contém diversos

compostos bioativos como terpenos, alcaloides, flavonoides e compostos fenólicos. No óleo extraído dos frutos da *Pterodon pubescens*, foram isolados e identificados os furanditerpenos, que exercem diversas atividades biológicas (HOSCHEID et al., 2012). A atividade anticolinesterásica moderada foi detectada, proveniente dos diterpenos isolados da espécie *Dodonaea viscosa* (L.) (Sapindaceae) (MUHAMMAD et al., 2016).

Os testes fitoquímicos do extrato bruto etanólico das cascas de *Pterodon emarginatus*, detectaram a presença de flavonoides, saponinas e triterpenoides (BUSTAMANTE et al., 2010). Os taninos, saponinas, terpenos e flavonoides, identificados em diferentes extratos da espécie *Rhizophora spp*, revelaram atividade inibitória significativa sobre enzima acetilcolinesterase (WAHYUNI et al., 2015). Diversas espécies pertencentes à família (Fabaceae) são constituídas por compostos tais como: ácido gálico e quercetina que foram isolados da espécie *Schotia brachypetalea* e exerceram atividade antioxidante (EL-HAWARY et al., 2015). Os compostos ácido ferúlico, ácido gálico, luteolina, kaempferol e apigenina foram identificados em extratos provenientes nas espécies *Genista tinctoria* e *Genistella sagittalis* (HANGANU et al., 2016). A resposta inibitória frente a acetilcolinesterase foi satisfatória, e a presença de ácidos fenólicos citados anteriormente influenciaram na resposta inibitória (SZWAJGIER & BOROWIEC, 2012). Já os flavonoides quercetina e kaempferol resultante do extrato *Cleistocalyx operculatus* exibiram efeito anticolinesterásico moderado (MIN et al., 2010).

Com isso, objetivou avaliar a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase frente aos extratos brutos: acetato de etila e metanólico, bem como suas respectivas fases hidroalcoólica e acetato de etila de *Pterodon pubescens* Benth. Diante do exposto, investigações nesse sentido podem servir para seleção de diferentes princípios ativos que sejam eficazes, fornecendo informações que no futuro, possam contribuir na elaboração de biopesticidas.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material botânico

O material vegetal foi coletado em outubro de 2015 em áreas de Cerrado no município Monte Alegre-GO (S16° 46'59.1" e W51° 07'.24.2"). Utilizou o podão manual para coletar as folhas de *P. pubescens*, que foram acondicionadas sem a nervura principal em sacos de papel, sob temperatura ambiente, e transportadas para o Laboratório Binete do IF Goiano – Campus Rio Verde. A espécie foi depositada no herbário do IF Goiano – Campus Rio Verde, mantida em exsiccata sob numeração 507 e identificada por Cristiana Vieira Teles.

3.2.2 Obtenção dos extratos

As folhas de *P. pubescens* foram secas na estufa a 40°C por 72h e em seguida moídas até obter um pó fino. Para preparação do extrato foliar em acetato de etila, foram utilizados 1.000 g de folhas previamente moídas e 5 L de acetato de etila, que foram acondicionadas para frascos erlenmeyer de vidro com capacidade para 3 L. As amostras foram mantidas em repouso sob temperatura ambiente por 24h. Após este período, as amostras foram filtradas e as soluções obtidas foram rotaevaporadas (rotaevaporador rotativo Tecnal, TE 210), sendo o extrato foliar bruto em acetato de etila reservado em frasco de vidro. O acetato de etila remanescente do processo de rotaevaporação foi retornado para cada frasco erlenmeyer original. O processo de repouso, filtragem e rotoevaporação foi repetido por mais duas vezes, para cada amostra a fim de obter maior quantidade de extrato bruto.

O solvente metanol foi adicionado nesses respectivos frascos vidros contendo a biomassa resultante do extrato bruto acetato de etila (1 litro metanol a cada 200g de amostra). Todo procedimento utilizado para obtenção do extrato acetato de etila, foi mantido para o extrato bruto metanólico.

Os extratos foliares de acetato de etila e metanólico foram mantidos em capela de exaustão de gases até a massa dos extratos pesada ser constante. Posteriormente, retirou a umidade pelo processo de liofilização e foram armazenados na geladeira até a sua

utilização nos ensaios bioquímicos. Realizou avaliação dos extratos brutos por meio de LCMS (cromatógrafo líquido acoplado ao espectrometro de massas).

3.2.3 Análise dos extratos bruto por HPLC.

Amostras dos extratos foliares de acetato de etila e metanólico foram analisadas em cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas (LCMS) para identificação e quantificação de ácido gálico, ácido ferúlico, apigenina, rutina, kampherol+luteolina, ácido rosmarínico e quercetina. Os limites de quantificação (LQ), considerado como o primeiro ponto da curva que gerou sinal/ruído superior a 5, em ppb, são: ácido gálico – 25; ácido ferúlico – 50; Apigenina 25; Kaempferol + luteolina 25; quercetina 250; ácido rosmarínico – 25 e rutina 250. A solubilização dos compostos foi realizada em triplicata, adicionando-se 3 mL de metanol ou 4 mL de acetato de etila em 200 mg do extrato, obtendo-se os extratos metanólico e acetato de etila, respectivamente. Os extratos foram filtrados em filtro de nylon de 0,45 micrômetro antes da análise. Para preparo da curva foram utilizados padrões com concentrações que variaram de 25 a 3000 ppb. A separação dos compostos foi realizada em Coluna reversa C18 250 mm x 4,6 mm x 5 µm e, para quantificação, utilizou-se espectrômetro de massas SQ 300 MS (Perkin Elmer)[®]. Os solventes utilizados na eluição foram: A - água + ácido acético (0,1%) e B – metanol. O tempo total de corrida foi de 32 minutos, sendo 2 minutos de equilíbrio com 60 % do solvente A e 40% do solvente B. A corrida iniciou com 60% do solvente A e 40% do solvente B, evoluindo para 100% do solvente B, dentro de 25 minutos. Permaneceu-se com 100% do solvente B por 5 minutos, voltando à condição inicial (60% solução A e 40 % solução B) para equilíbrio por 2 minutos antes da próxima injeção.

3.2.4 Partição do extrato metanólico.

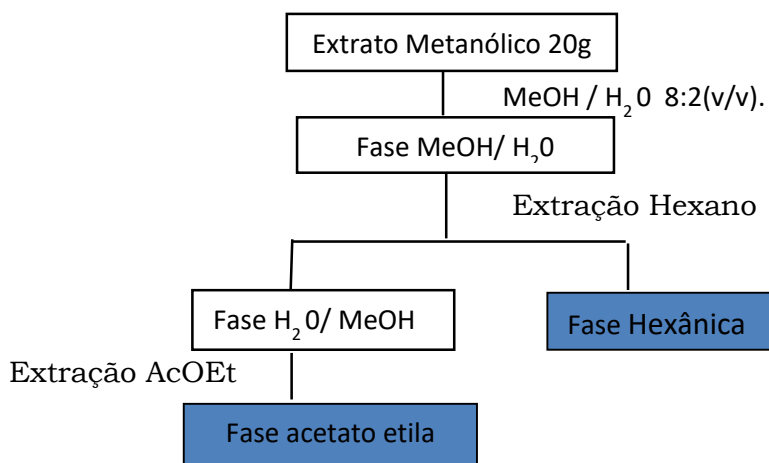


Figura 5: Fluxograma da partição do extrato metanólico e obtenção das fases orgânicas das folhas de *P. pubescens*.

Inicialmente, foram dissolvidos 20 g do extrato bruto liofilizado em 50 mL de metanol + água (MeOH/H₂O) na proporção 8:2 v/v. Esta solução foi transferida para um funil de separação e homogeneizada (Figura 5). Para obter a fase hexânica, adicionou 50 ml de hexano na fase hidroalcoólica. A solução formada foi homogeneizada e observou formação de fases no funil, a fase hexânica foi rotaevaporada e transferida para frasco âmbar. Este procedimento foi repetido por três vezes. O frasco contendo a fase hexânica foi mantido aberto em capela de exaustão de gases para permitir a evaporação do solvente. Após a evaporação, o frasco foi vedado com tampa e armazenado.

Na fase hidroalcoólica previamente utilizada, adicionou 50 mL de acetato de etila, este procedimento foi repetido mais duas vezes em funil de separação, Obteve-se as fases acetato de etila e hidroalcoólica, posteriormente foram rotaevaporadas e transferido para frasco âmbar. Os frascos foram mantidos em capela de exaustão de gases, após a evaporação do solvente foram vedados com tampa e armazenados.

Para a detecção de compostos fenólicos, as três fases orgânicas foram solubilizadas em metanol, na proporção de 1mg/mL e aplicadas em cromatografia em camada delgada, utilizou como fase móvel clorofórmio:metanol (9:1) v/v e BAW (n-butanol:ácido acético:água, 4:1:5) e foram visualizadas por lâmpadas de UV (254 e 365 nm) e reveladas através de reações com revelador NP (0,5%). O revelador foi preparado com 250 mg de 2-aminoetil difenilborinato e 50 mL de metanol. O revelador NP

(difenilboriloxietilamina) é um reagente característico para compostos fenólicos, pois reage com estes formando complexos derivados fluorescentes, muito utilizado pela sua sensibilidade e especificidade. A vitexina foi preparada à 1mg/mL em metanol, que foi utilizada como padrão positivo. O ensaio de inibição de acetilcolinesterase em CCD descrito por Martson (2002), sendo que as placas foram eluídas em fase móvel clorofórmio/metanol (8:2, v/v) e as amostras em que foram detectados inibidores posteriormente foram submetidas ao ensaio em microplaca de 96 poços.

3.2.5 Purificação do extrato bruto acetato de etila

Empacotou a coluna com sílica gel 60 (0-270 mesh ASTM, 0,05-0,20mm), macerou e homogeneizou 1 grama do extrato bruto acetato de etila em 3 gramas sílica gel. Em seguida aplicou o extrato na coluna e adicionou a fase móvel hexano/acetato etila 8:2 v/v (200mL), o aumento da polaridade foi crescente, 7:3 v/v (200mL), 1;1 v/v (200mL) e 95:5 v/v (200mL). Coletou 59 frascos com volume de 13 ml de amostra e deixou na capela de exaustão para evaporar. Preparou placa CCDC com amostras pares com fase móvel Hexano/acetato 8:2 v/v e visualizou no UV 254 e 365 nm, em seguida revelou com vanilina sulfúrica a 1%. A visualização da coloração intensa violácea e amarela é um indício de possíveis terpenos, flavonoides e esteroides. As amostras foram reunidas conforme o perfil químico, sendo obtido um total de seis frações: AF 01, AF02, AF 03, AF 04, AF 05 e AF 06. As frações AF 01 e AF 03 foram selecionadas para a etapa de semipurificação devido intensa coloração. O tipo de sílica gel 60 0-270 mesh ASTM, 0,05-0,20mm foi usado na purificação. As frações semipurificadas AF1.1 a AF1.3 e AF3.1 foram submetidas ao teste de ensaio de inibição da AChE em CCD.

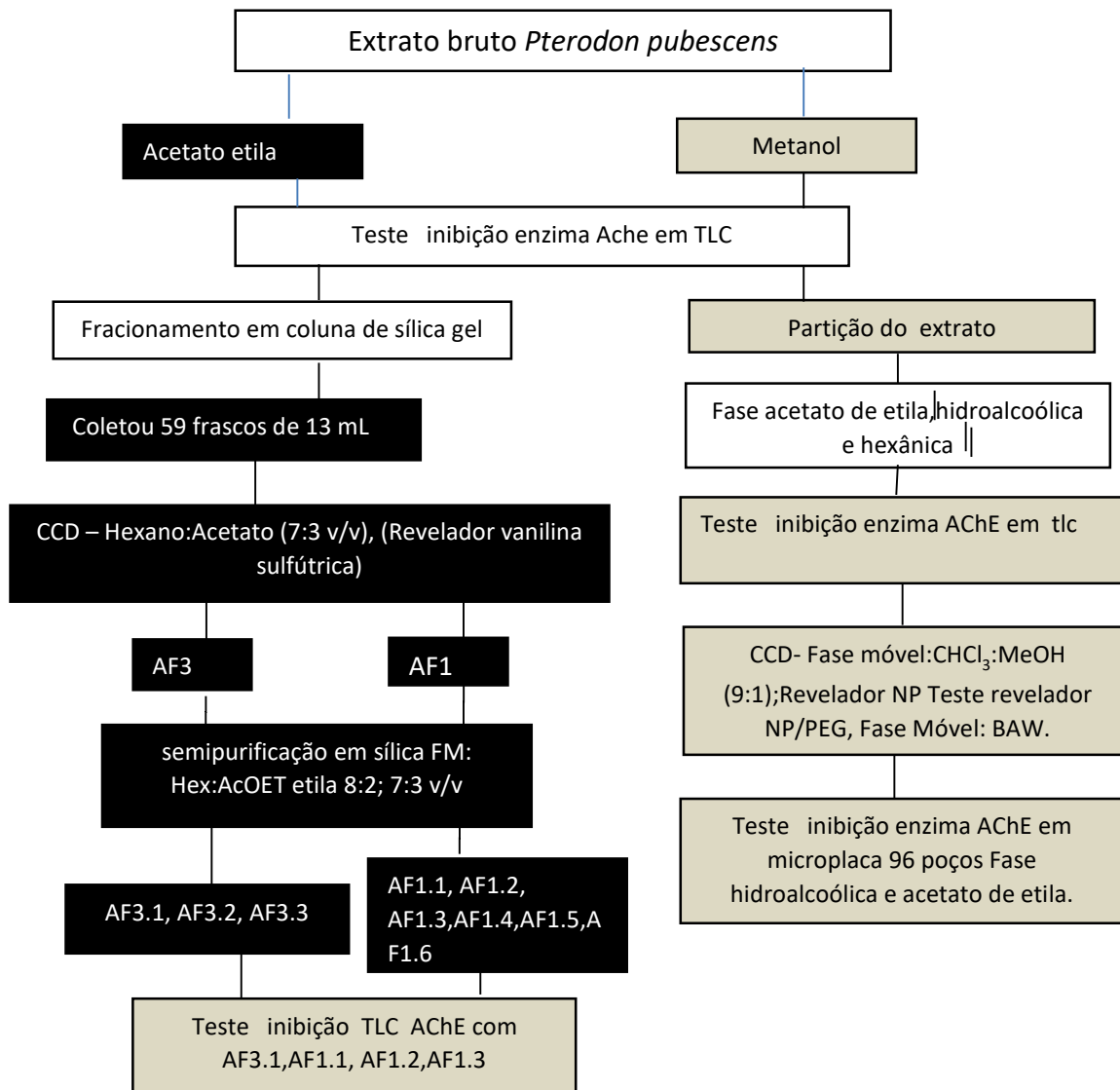


Figura 6: Fluxograma caracterização do perfil químico

3.2.6 Ensaio de bioautografia

A caracterização de inibidores de acetilcolinesterase foi realizada conforme a metodologia descrita por Marston et al (2002). Utilizou a enzima acetilcolinesterase (500 U) dissolvida em 75mL de tampão Tris-HCL 0,05 M (pH 7.8), adicionou albumina de soro bovina (BSA) (75 mg) na solução para estabilização da enzima (solução preparada). Amostras do extrato bruto acetato de etila e metanólico bem como suas fases (acetato de etila, hidroalcoólica e hexânica) das folhas de *Pterodon pubescens* Benth foram aplicadas em placas de CCD (5 x 10 cm, Si₂₅₀F®) com fase móveis: Hexano:AcOEt (7:3),

Clorofórmio:Metanol (9:1) e BAW (n-butanol:ácido acético:água, (4:1:5, fase superior) para o extrato bruto. Clorofórmio:Metanol (8:2) foi utilizado para as fases hidroalcoólica e acetato de etila, e para as frações do extrato bruto acetato de etila utilizou duas fases móvel Clorofórmio:Metanol (9:1) e Hexano:AcOEt (7:3). As placas secas foram borrifadas com solução estoque da enzima, em seguida incubou e acondicionou em câmara climatizada a 37°C por 20 minutos para estabilização da enzima. A solução A foi com acetato de naftila (25mg) em 10mL etanol e solução B sal Fast Blue B (100mg) em água destilada (40 mL). Ao final da incubação, 1mL da solução A e 4mL da solução B foram misturadas e borrifadas na placa para observação de halos brancos de inibição após 24 horas.

Este teste se baseia na clivagem pela acetilcolinesterase com 1-acetato de naftila para formar o 1-naftol, este último reage com o sal Fast Blue B para dar a coloração púrpura de diazônio. É um método que oferece rápido acesso a informações sobre a atividade e a localização da atividade relacionada à espécie, pois os constituintes separados podem ser diretamente detectados nas placas de CCD, uma vez que as regiões da placa que contêm inibidores da acetilcolinesterase aparecem como marcas brancas no fundo púrpura (MARSTON ET AL, 2002).

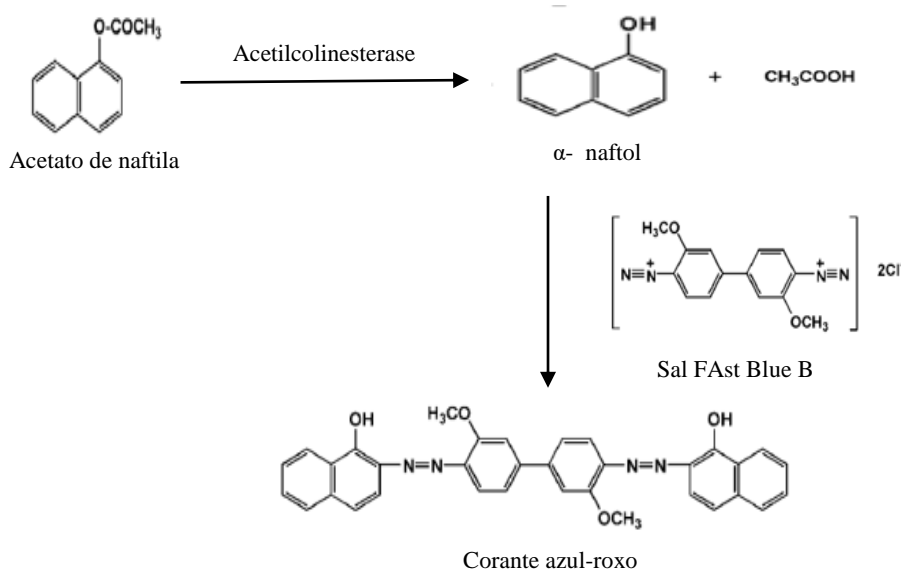


Figura 7: Reação da acetilcolinesterase com o acetato de naftila e a subsequente formação da coloração púrpura no ensaio de TLC. (MARSTON *et al.*, 2002).

3.2.7 Ensaio de inibição acetilcolinesterase em microplaca 96 poços.

O ensaio foi realizado pelo método de Fosberg (1984) adaptado, os quais diferiram em amostras e concentrações das mesmas. A enzima acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7 electric ell, código C3389), foi adquirida pela sigma Aldrich em 2 KU. A enzima AChE foi diluída em 30 mL tampão A (Tris HCl pH: 7,8 a 50 mM), resultando em uma concentração de 66,6 U/mL. Em seguida adicionou 1% albumina para sua estabilização e aliquotou para armazenamento em congelador em eperdorfs de 2 mL. Foi preparado o tampão B: fosfato de sódio 0,067M em pH 6,85. A acetonitrila foi solvente utilizado para preparo do substrato acetato para- nitrofenila a 1mM, o qual é insolúvel acima de 3 mM. As concentrações dos extratos bruto em acetato de etila e metanólico e suas respectivas fases hidrolacóica e acetato de etila foram preparadas primeiramente em DMSO em 40 mg/mL (solução estoque) para posteriormente realizar nova diluição e ter solução 8 mg/mL para preparar as diluições seriadas. Para otimizar o ensaio de inibição as concentrações utilizadas foram adicionadas no tampão B, sendo que na primeira diluição colocou-se 979 μ L do tampão e 21 μ L do inibidor à 8 mg/mL em DMSO. E em seguida fez-se diluições seriadas em fator de 2 totalizando seis concentrações diferentes. A concentração final maior no poço foi de 160 μ g/mL de forma decrescente. Na primeira etapa da reação: no controle da enzima (94 μ L tampão B, 6 μ L enzima com albumina a 1%); branco do controle da enzima (94 μ L tampão B, 6 μ L tampão tris HCl com 1% albumina); para oferecer as mesmas condições da enzima, no branco do inibidor colocou 94 μ L tampão B contendo inibidor, 6 μ L tampão tris HCl com 1% albumina e no teste do inibidor 94 μ L tampão B contendo inibidor e 6 μ L enzima com 1% albumina a 2U/mL. Em seguida acondicionou na B.O.D a 25°C por 10 minutos para interagir o inibidor com a enzima. Na segunda etapa, completou o volume de reação com 98 μ L tampão B e 2 μ L do substrato PNPA a 1 mM, que foi adicionado de 20 a 20 segundos. Após completar a reação com volume de 200 μ L aguardou os 2 minutos e 30 segundos para se iniciar as leituras no leitor de placas de Elisa de 20 a 20 segundos no período de 5 minutos no comprimento de onda 405 nm. A coloração amarela é o produto formado para-nitrofenol, proveniente da hidrólise do acetato de nitrofenila pela acetilcolinesterase.

3.2.8 Análise estatística

Os resultados apresentados correspondem à média de três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão da média. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de $p < 0.05$, aplicado pelo teste Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o programa Sisvar Versão 5.6 Build 86 e os gráficos confeccionados no programa Sigma plot 12.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Caracterização do perfil químico

Os fatores climáticos e geográficos podem interferir na composição e propriedades biológicas dos metabólitos secundários. No processo de extração o solvente utilizado é de suma importância pela sua polaridade, muitos estudos confirmam que o rendimento de flavonoides entre outros metabólitos são influenciados pela polaridade do solvente orgânico. Nas figuras 8 a 9, exibe o perfil químico por CCD para identificação de compostos flavonoides, notou-se que nas figuras 8A, 8B, 9A, 9B é visível as substâncias eluidas com fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ e BAW, com indícios de compostos fenólicos. No extrato bruto metanólico e suas respectivas fases hidroalcoólica e acetato de etila é possível notar substâncias através da absorção a luz UV a (254 nm) e (356 nm) nas figuras 8B e 9B. Ao aplicar o revelador NP/PEG foi visível a presença de compostos fenólicos, o NP (difetilboriloxietilamina) é um reagente característico para esta classe de compostos, pois ao reagir forma derivados fluorescentes. Este revelador é muito utilizado pela sua sensibilidade e especificidade, a vitexina sintética foi utilizada como padrão positivo.

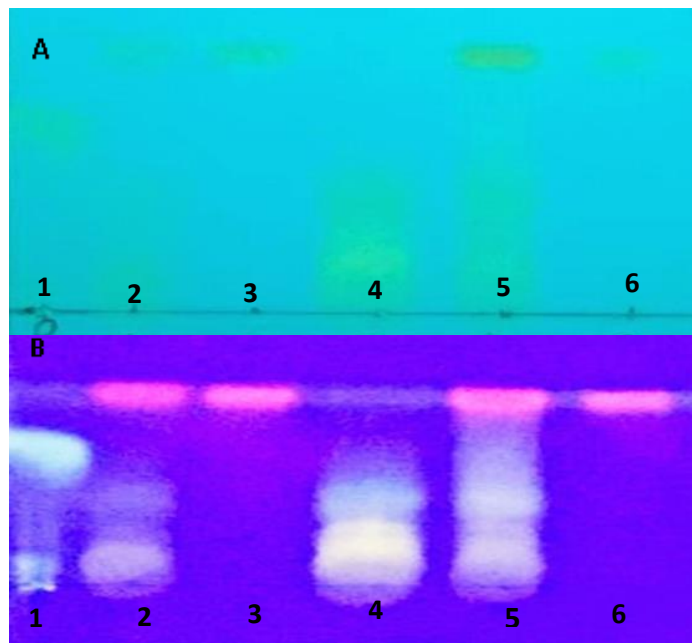


Figura 8. CCDC de extratos bruto da espécie *Pterodon pubescens* BENTH; Padrão vitexina (1); Extrato bruto metanólico (2); Extrato bruto acetato etila (3); Fase hidroalcoólica *E.B.M* (4); Fase acetato etila *E.B.M* (5); fase hexânica *E.B.M* (6); Fase Móvel: Fase Móvel:CHCl₃:MeOH (9:1);Revelador NP: A – UV 254 nm; B – UV 365 nm.

Na fase CHCl₃:MeOH a amostra 1, coloração azul-esverdeada é vitexina (padrão). Na amostra 2 a 6, é possível observar clorofila na parte superior da placa, na fase hidroalcoólica e acetato de etila há vestígios de glicosídeos de flavonol pela coloração amarelada, e, possível vitexina devido a coloração levemente azul, comparada com a amostra 1 padrão.

Na fase móvel (BAW), por causa da maior polaridade a capacidade de arraste de substâncias é possível notar compostos flavonoides, maior intensidade no extrato bruto metanólico (amostra 2) e em ambas as fases (amostra 4 e 5) na extremidade da placa, na fase hexânica não observou resquícios destes compostos. Ao comparar com o padrão vitexina, mostra que a coloração amarelada tende a indicar glicosídeos de flavonol. A coloração azul indica a presença de possíveis ácidos carboxílicos, fenólicos e cumarinas. A cromatografia em camada delgada ou CCD é um método muito aplicado para monitoramento fitoquímico das substâncias. Esta metodologia é de fácil e rápida execução, custo acessível, reproduzível e consta em diversas monografias das Farmacopeias (WAGNER & BLADT, 1996). A capacidade de arraste de substâncias está relacionada com a fase móvel, sendo que CHCl₃:MeOH arrasta substâncias menos polares e (BAW) mais polares.

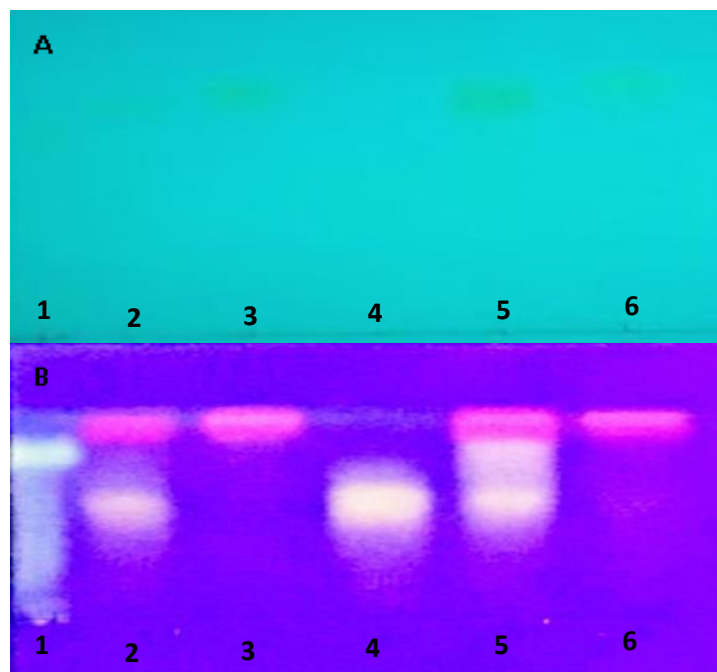


Figura 9. CCDC de extratos bruto da espécie *Pterodon pubescens* BENTH; Padrão vitexina (1); Extrato metanólico (2); Extrato bruto acetato etila (3); Fase hidroalcoólica E.B.M (4); Fase acetato etila E.B.M (5) hexânica E.B.M (6); Fase Móvel: BAW. Revelador NP: A – UV 254 nm; B – UV 365 nm.

Os polifenóis são encontrados em vegetais, cereais com várias atividades como controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (YIGIT, & MAVI, 2009). Estudos realizados por Dutra et al. (2009) com sementes da *Pterodon emarginatus Benth* relata que constituintes fenólicos têm efeito antioxidante, ocasionados pelas suas propriedades de redução, que agem como agentes redutores e doadores de hidrogênio. Essas propriedades estão interligadas com o efeito inibitório da enzima acetilcolinesterase. A literatura relata que flavonoides sintéticos e naturais têm alto efeito frente atividade de inibição da enzima AChE e baixo efeito de toxicidade. Entre os principais grupos se destacam as flavonas, chalconas, flavonóis e isoflavonas (Uriarte-PUEYO & CALVO, 2011). A presença de glicosídeos de flavonol, ácidos carboxílicos e fenólicos detectados nesse método é de grande importância pelas diversas atividades biológicas e terapêuticas. Estas classes de moléculas estão relacionadas a proteção contra radiações ultravioletas e microrganismos patogênicos nos vegetais que pode interferir em alto grau de defesa (FERREIRA, 2014).

Estudos realizados por Sousa et al. (2017), relata que no extrato bruto metanólico das folhas de *Maytenus robusta* da família Celastraceae consta alguns glicosídeos de flavonol, kaempferol e quercetina. Esses compostos foram avaliados em ensaio *in vitro*

quanto a ação anticolinesterásica, com efeito de 66% e 80% inibição respectivamente. Estudos realizados com a semente da espécie *Pterodon polygalaeflorus* foram revelados diversos compostos, tais como diterpenos, os quais estão associados a diversas atividades biológicas, principalmente anticolinesterásica (ARRIAGA et al, 2000). Em especial o taxifolin (dihidroquercetina), flavonoide bioativo natural da mesma classe dos dihidroflavonol, tem efeito inibitório frente isoenzimas e principalmente frente a acetilcolinesterase (GOCER et al., 2016). Assim os resultados observados em diferentes fases móveis tanto para o extrato bruto quanto as fases, relata possíveis compostos flavonoides, estudos citados anteriormente relata o perfil fitoquímico da *Pterodon pubescens*, relacionados estes com a atividade inibitória enzimática.

Na figura 10, mostra o perfil fitoquímico por CCDC das frações do extrato bruto acetato de etila eluída com Hexano/acetato de etila (7:3 v/v). Ao aplicar o revelador vanilina sulfúrica na placa, observou que diversas substâncias mostraram reações de coloração indicando flavonoides (amarelo) nas frações 1, 4 e 6, terpenos (azul, violácea) nas frações 3, 4 e 5. Por meio da caracterização fitoquímica, obteve-se total de 6 frações, sendo que fr 01 e fr 03 passaram processo de semipurificação e posteriormente seguidas ao ensaio inibição acetilcolinesterse em CCDC.

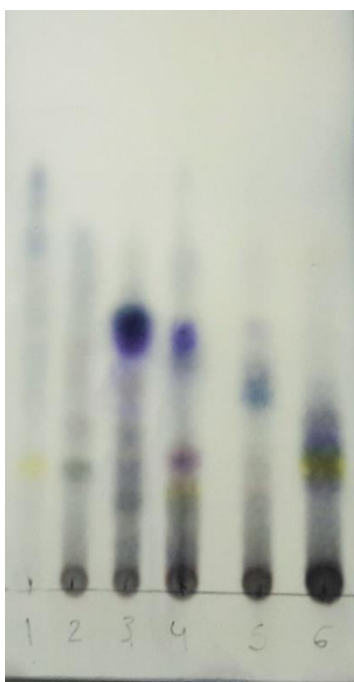


Figura 10: CCDC das frações do extrato bruto acetato de etila das espécies de *Pterodon pubescens*. Fase móvel: Hexano/acetato de etila 7:3v/v. 1.Fr01. 2.Fr02. 3. Fr03.4. Fr04. 5. Fr05. 6. Fr06. Revelador: Vanilina sulfúrica

Estudos realizados por Oliveira et al., (2016) com o óleo dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel da família Fabaceae, identificou variedade de terpenos como: sesquiterpenos e diterpenos. Sabe-se que o diterpeno é considerado potente substância bioativa com potencial de atividade larvicida, neste contexto detectou que a nanoemulsão do óleo essencial dessa espécie tem potente efeito larvicida frente ao *Aedes aegypti*, resultante da inibição reversível da enzima acetilcolinesterase. Pesquisas relatam que os monoterpenoides têm efeito inibitório frente essa enzima (LOPEZ et al., 2010). No pó das cascas de *Pterodon emarginatus* Vogel, foi detectado alguns flavonoides, triterpenos e heterosídeos saponínicos, que têm potente atividade antimicrobiana e anti-inflamatória entre outras (Bustamante et al., 2010). Existe relação desses compostos com efeito antioxidantes e principalmente atividade anticolinesterásica. No extrato aquoso e etanólico de duas plantas medicinais *P. officinalis* e *C. umbellatum*, o perfil fitoquímico dos polifenólicos (flavonoides), estão correlacionados ao potencial de inibição frente a AChE (NEAGU et al., 2016). Em relação aos resultados de diversos autores, nota-se que os metabólitos e suas características estruturais químicas têm conexão frente ao efeito anticolinesterásico.

3.3.1.2 Análise dos extratos por LCMS comparativa

Nas amostras analisadas por LCMS comparativa, com os extratos de *Pterodon pubescens* Benth, foi detectado a presença de ácidos fenólicos e flavonoides, sendo que as amostras foram comparadas com os padrões: ácido gálico, ácido ferúlico, kaempferol+luteolina, quercetina, ácido rosmarínico, rutina e apigenina. A quantificação em $\mu\text{g/g}$ de folha foi realizada e apresentada na tabela 1. A figura 11 representa cromatograma e o tempo de retenção (13,6 min) do ácido gálico para o íon selecionado em 168,7. Nas figuras 11b e 11c, entre os tempos de retenção de 12 a 15 min verificou a presença dos picos referente ao ácido gálico e nos tempos anterior e posterior os derivados desse composto. Nos extratos metanólico e acetato de etila, houve a extração do ácido gálico, sendo este extraído em maior quantidade utilizando metanol. A quantificação do íon no extrato metanólico e acetato de etila foi 2556,85 e 1863,79 $\mu\text{g/g}$, respectivamente (Tabela 1).

Estudos realizados por Muthukrishnan et al (2016) com extrato etanólico das folhas de *Eryhrina variegata* (Fabaceae) detectou o ácido gálico por LC-UV em tempo de retenção de 5,858 min e concentração de 2 ppm.

Segundo Ceylan et al (2016) alto teor de ácido gálico foi detectado no extrato bruto metanólico de *Cytisopsis dorycniifolia* e *Ebenus hirsuta* da família Fabaceae, sendo respectivamente 13,89 e 22,69 µg/g. A quantificação de fenólicos totais foi de 76.03 e 46,57 mg ácido gálico/g extrato, respectivamente. Neste estudo, foram detectados e quantificados diversos compostos fenólicos, bem como avaliados a capacidade antioxidante e efeito inibitório em atividades enzimáticas. O efeito anticolinesterásico encontrado nessas espécies estão relacionados ao teor fenólico.

Conforme Nag (2011), o extrato metanólico de *Terminalia chebula*, *Terminalia bellirica* e *Embllica officinalis*, foi analisado frente a atividade anticolinesterásica, o efeito inibitório detectado está relacionado ao ácido gálico detectado.

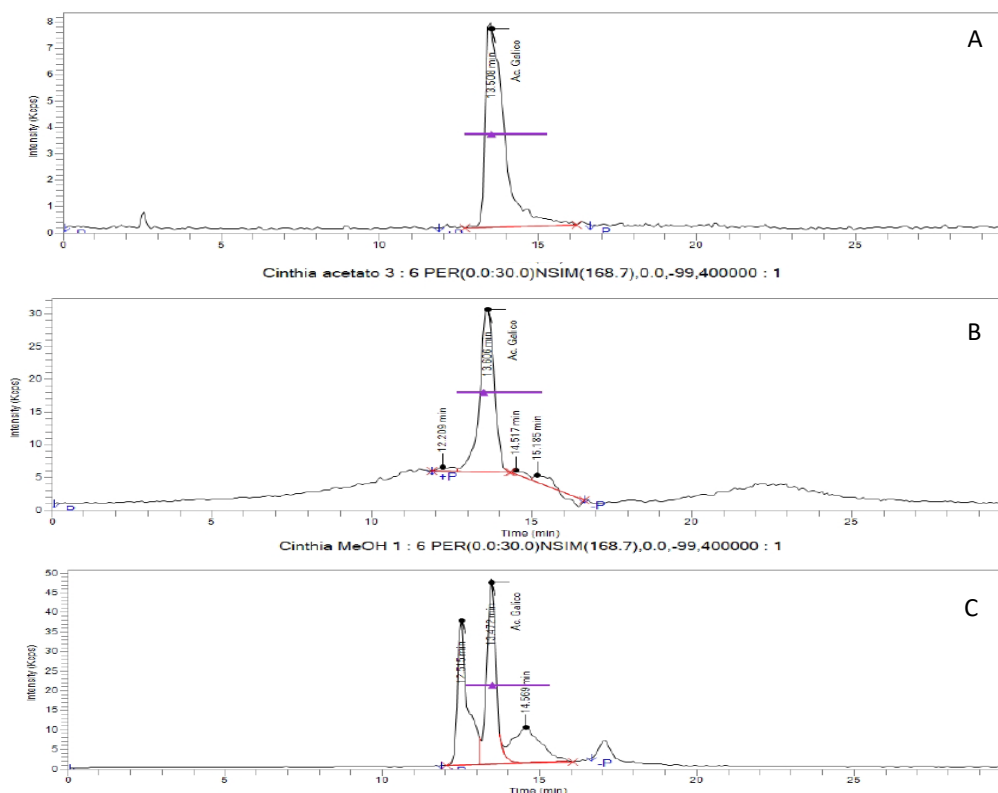


Figura 11: Cromatografia em LCMS para o íon ácido gálico. A: Padrão. B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico

A figura 12b e 12c representa cromatogramas e o tempo de retenção do ácido ferúlico, no tempo de retenção de 14 min verificou a presença dos picos referente ao ácido ferúlico em ambos os extratos, no tempo anterior e posterior são derivados desse composto. Foi quantificado 5556,05 µg/g e 1057,34 µg/g respectivamente no extrato metanólico e acetato de etila, a maior concentração detectada no extrato metanólico. No extrato etanólico de *Gensta tinctoria* (Fabaceae) foi identificado por LCMS diversos ácido fenólicos, o tempo de retenção detectado para o ácido ferúlico foi de 11,8 min e quantificação de 79,89 µg/g de planta, já na espécie *Gensta sagittalis* não foi detectado (HANGANU et al.,2016). O ácido ferúlico é (ácido 4-hidroxi-3-metóxi-cinâmico) distribuído em variedades de plantas, em 1866 foi isolado da planta *Ferula foetida*, dentro os compostos fenólicos, o ácido ferúlico possui diversas propriedades fitoterápicas: atividade antioxidante e anti-inflamatórias (SGARBOSSA et al., 2015). O constituinte majoritário detectado no extrato hidroetanólico da folhas de *Santolina impressa* (Asteraceae) foi o ácido ferúlico. O ensaio *in vitro* detectou que 2 mg/mL desse extrato teve inibição de 40% da acetilcolinesterase (TAVARES et al., 2012).

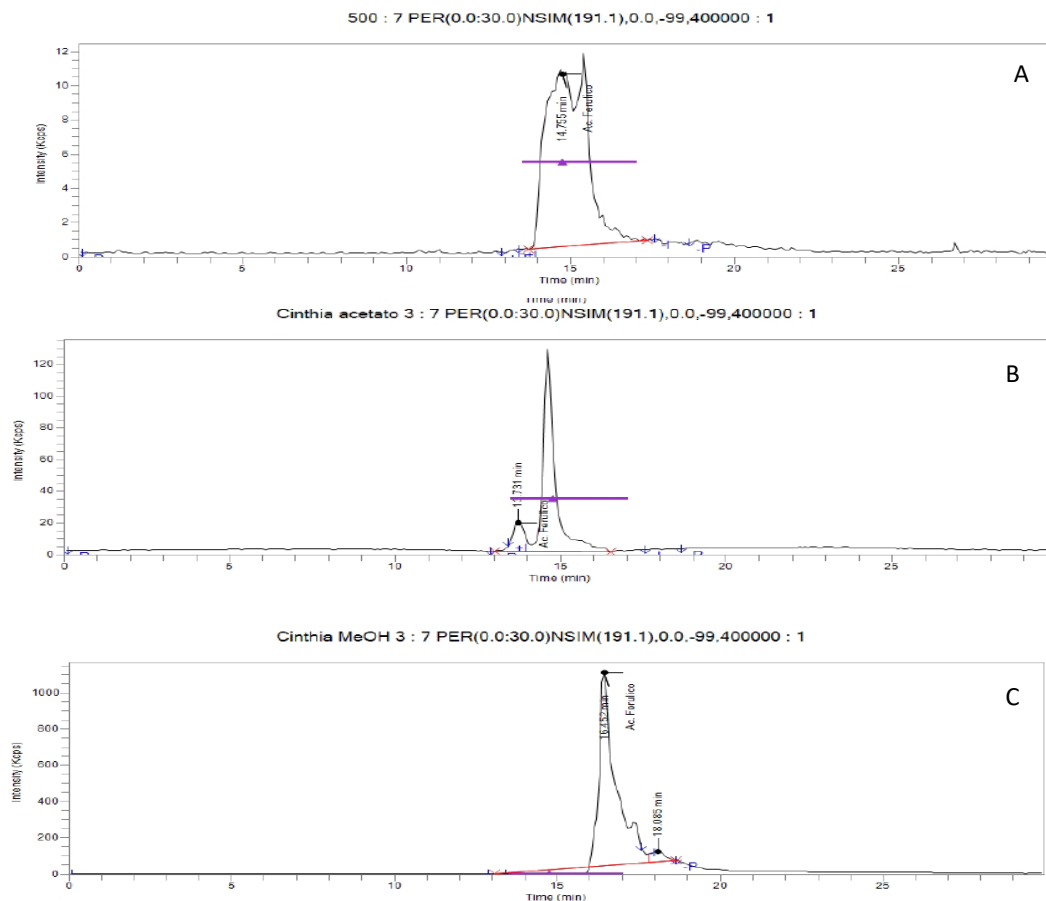


Figura 12: Cromatografia em LCMS para o íon ácido ferúlico. A: Padrão. B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico

A figura 13b e 13c, representa os cromatogramas e o tempo de retenção do padrão de apigenina e dos extratos acetato de etila e metanólico. O tempo de retenção variou de 15 a 19 min e exibiu limite de detecção referente ao composto no extrato acetato de etila. Foi quantificado 36,56 $\mu\text{g/g}$ respectivamente no extrato acetato de etila. A Apigenina foi detectada no extrato bruto acetato de etila, n-butanólico e nas frações da espécie *Cynometra cauliflora* (Fabaceae) exibiram atividade inibitória notória frente a enzima acetilcolinesterase. As frações aquosas tiveram melhor resultado em relação as frações hexano e diclorometano. A atividade dessas amostras se deve ao teor dos compostos fenólicos detectados (ADO et al., 2014).

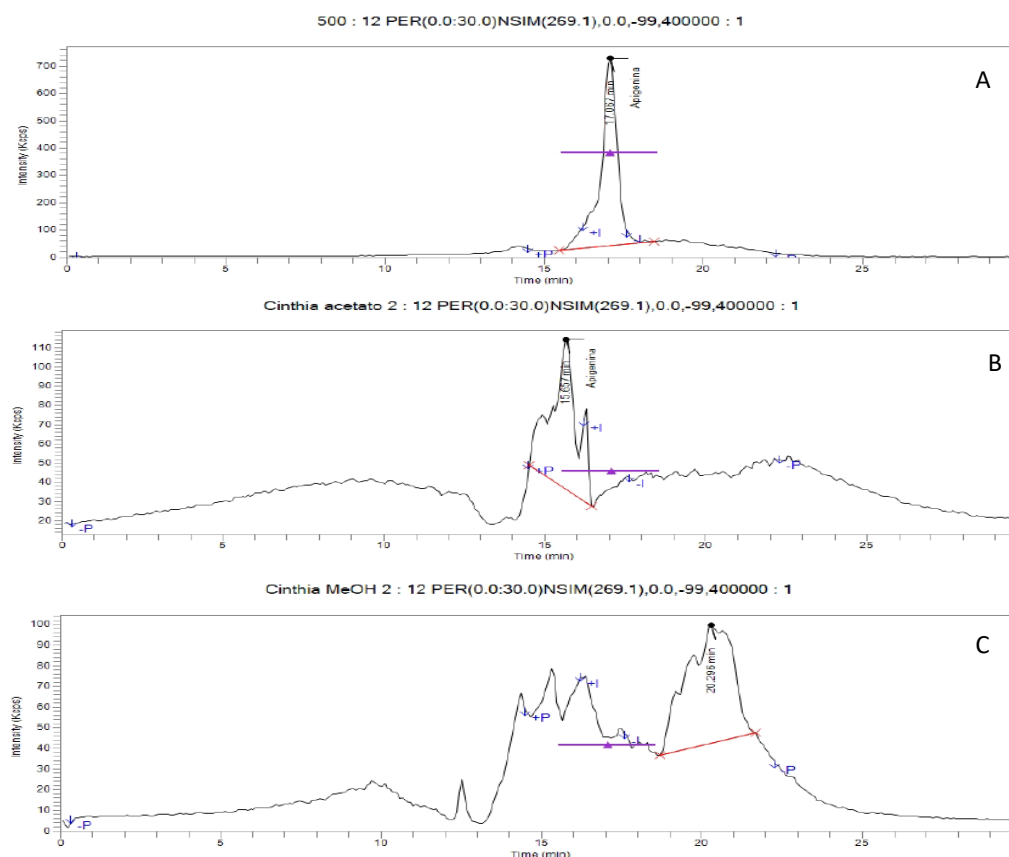


Figura 13: Cromatografia em LCMS para o íon Apigenina. A: Padrão. B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico.

A figura 14b e 14c, representa cromatogramas e o tempo de retenção do Kaempherol+luteolina, entre os tempos de retenção de 14 a 19 min verificou a presença dos picos referente ao composto em ambos extratos, no tempo anterior e posterior são derivados desse composto. Foi quantificado 93 $\mu\text{g/g}$ e 35,65 $\mu\text{g/g}$ respectivamente no extrato metanólico e acetato de etila. Ensaios com o extrato etanólico de *Astragalus armatus* (fabaceae), flavonóides foram identificados e isolados, que estão conectados a diversas atividades biológicas, o alto efeito antioxidante e baixa atividade inibitória da acetilcolinesterase estão relacionados aos constituintes fitoquímicos, dentre estes o Kaempherol (LABED et al., 2017). A luteolina (flavona) foi detectada no extrato metanólico de *Lavandula viridis* (Laminaceae), tanto no extrato etanólico e no aquoso obteve porcentual de inibição da acetilcolinesterase, e a quantificação no extrato etanol/água foi maior comparado ao extrato etanólico (COSTA et al., 2013). No extrato hidroetanólico de *Thymus capitellatus* (Laminaceae), foi detectado a inibição de 60% da enzima, e o constituinte majoritário detectado nessa espécie foi a luteolina (Tavares et

al., 2012). Conforme os autores, ambos compostos apresentaram efeito inibitório em diferentes extratos de algumas espécies.

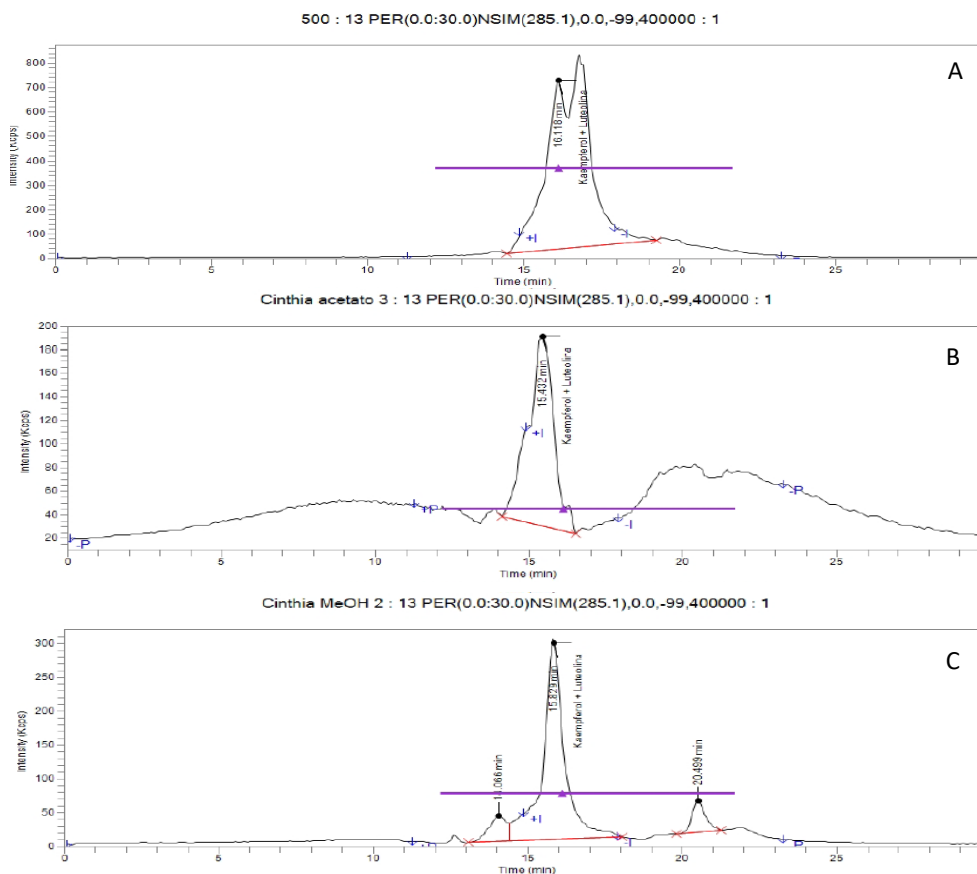


Figura 14: Cromatografia em LCMS para o íon Kaempferol + luteolina. A: Padrão. B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico.

A figura 15b e 15c representa cromatogramas e o tempo de retenção da quercetina. Entre os tempos de retenção de 13 a 17 min, notou-se picos referente ao composto em ambos extratos. No tempo anterior e posterior do pico, são derivados desse composto. Foi quantificado 4308,75 $\mu\text{g/g}$ e 2045,60 $\mu\text{g/g}$ respectivamente no extrato metanólico e acetato de etila. Existe correlação dos compostos fenólicos com efeito anticolinesterásico. Estudos foram realizados com a fração proveniente da partição do extrato bruto etanólico de *Aristolelia chilensis*, e alto teor de compostos fenólicos como quercetina, mircetina, luteolina entre outros foi detectado. A concentração necessária de quercetina isolada para atingir o IC_{50} de inibição de acetilcolinesterase foi de 47,8 $\mu\text{g/ml}$, que teve efeito notório em relação aos demais constituintes (CESPEDES et al., 2017). O perfil de LCMS dos flavonoides referente ao extrato aquoso de *Eugenia dysenterica*

foram positivamente identificados, o tempo de retenção de 47 minutos identificado foi semelhante ao padrão testado. O efeito inibitório da quercetina foi moderado frente a acetilcolinesterase (GASCA et al., 2017).

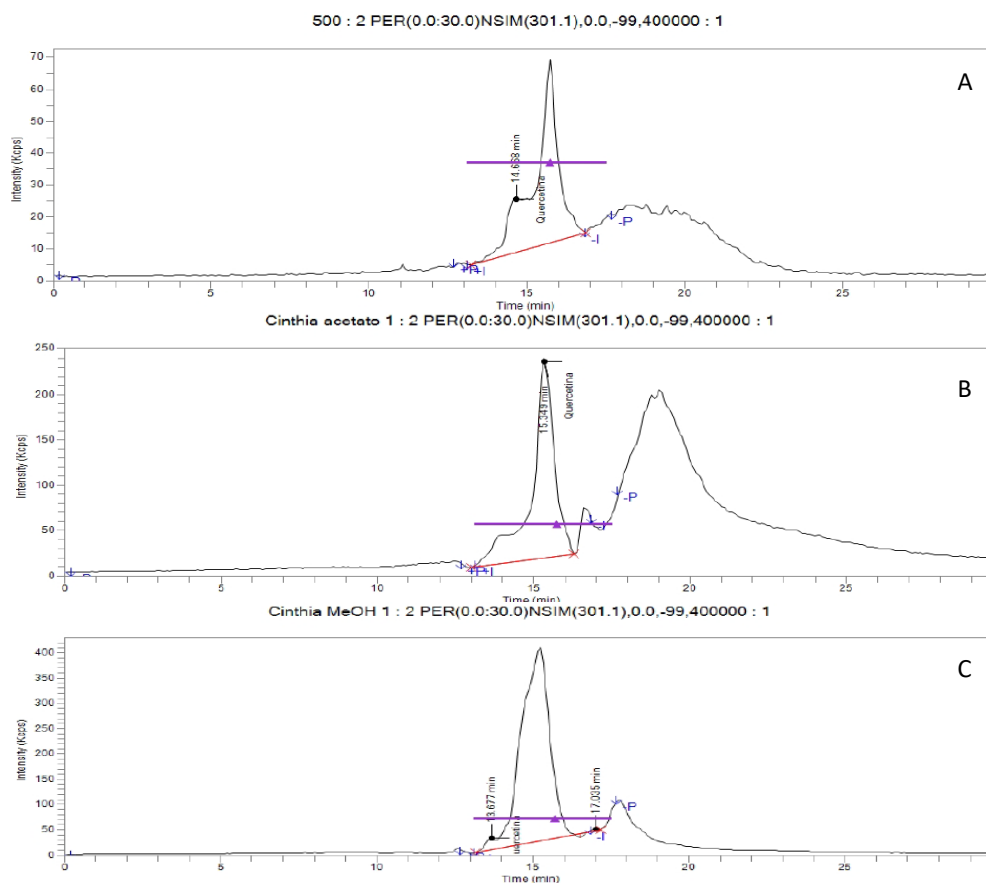


Figura 15. Cromatografia em LCMS para o íon Quercetina. A: Padrão. B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico.

A figura 16b e 16c representa cromatogramas e o tempo de retenção do ácido rosmarínico entre os tempos de retenção de 13 a 16 min, notou-se picos referente ao composto em ambos extratos acetato e metanólico respectivamente, sendo que no tempo anterior e posterior são derivados desse composto. Foi quantificado 202 μ g/g e 736,20 μ g/g respectivamente no extrato metanólico e acetato de etila. Estudos realizados com diversas espécies de plantas da família Laminaceae, explorando os perfis de dez espécies e diferentes extratos etanólicos foram investigados por meio de LCMS. O ácido rosmarínico foi detectado e influência do teor de ácido rosmarínico sobre propriedades inibitórias da AChE foi analisada. O efeito de inibição é inversalmente proporcional a concentração do extrato utilizado (VLADIMIR-KNEZEVIC et al., 2014). Extrato

metanólico de *Salvia trichoclada* (Lamiaceae) foi purificado e isolado o ácido rosmarínico, que teve potente efeito anticolinesterásico.

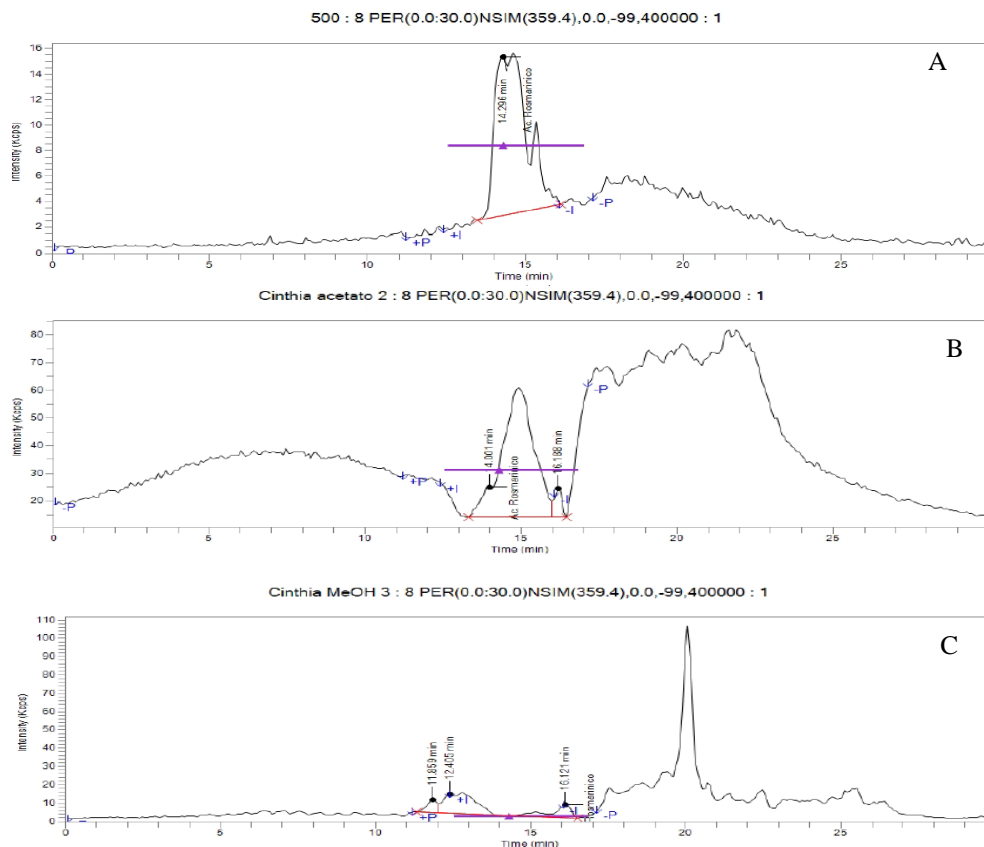


Figura 16: Cromatografia em LCMS para o íon ácido rosmarínico A: Padrão. B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico.

A figura 17b e 17c representa cromatogramas e o tempo de retenção da rutina entre os tempos de retenção de 13 a 16 min, notou-se picos referente ao composto em ambos extrato acetato e metanólico respectivamente, no tempo anterior e posterior são derivados desse composto. Foi quantificado 12953,38 μ g/g e 3773,13 μ g/g respectivamente no extrato metanólico e acetato de etila. Alto teor de rutina foi detectado em duas espécies da família Fabaceae no extrato metanólico, respectivamente em *Cytisopsis dorycniifolia* e *Ebenus hirsuta*. A ação inibitória frente diversas enzimas foi detectada, sendo o efeito de inibição moderado encontrado frente a AChE (CEYLAN et al., 2016). Análise por LCMS quantificou alguns derivados de flavonoides em quatro extratos etanólico de diferentes espécies da família Rosaceae. A rutina foi o flavonoide majoritário detectado na espécie *Sorbus umbellata* com tempo de retenção 22,9 min em 330nm, com atividade inibitória moderada frente a acetilcolinesterase (EKIN et al., 2016).

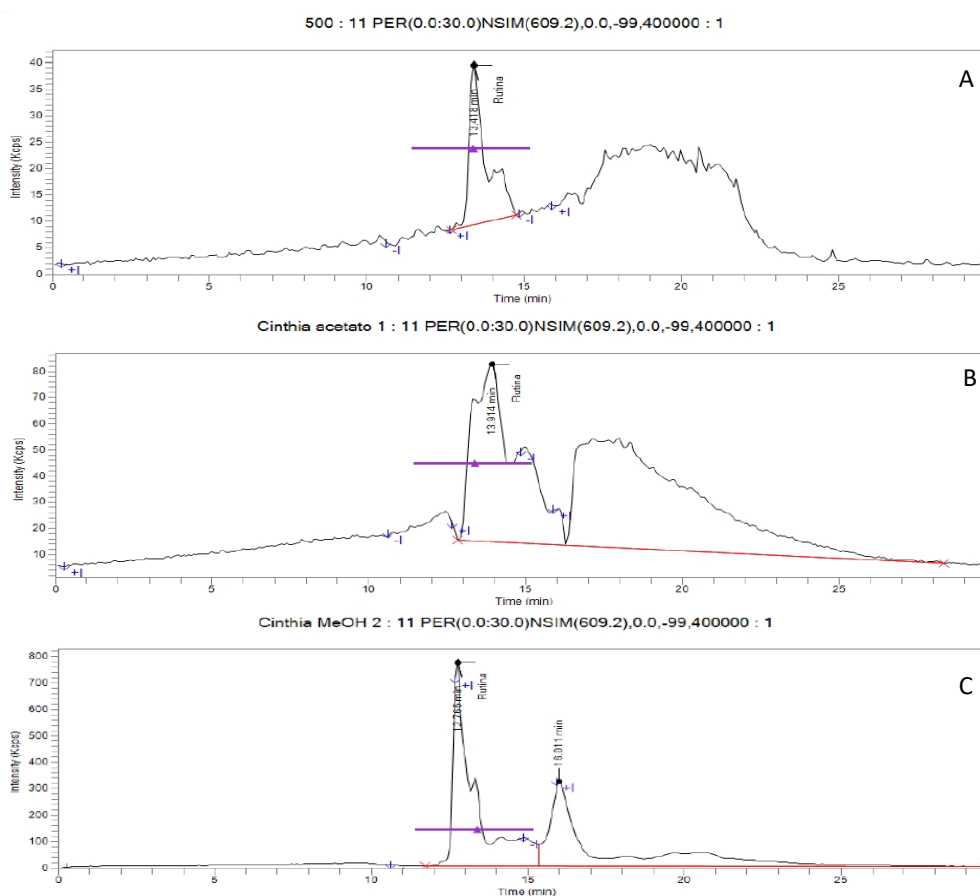


Figura 17: Cromatografia em LCMS para o íon rutina A: Padrão. B: Extrato bruto acetato de etila. C: Extrato bruto metanólico.

Tabela 1: Quantificação dos compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}$) nas folhas de *Pterodon pubescens*..

	Extrato MeOH		Extrato AcOEt		m/z (Da)	TR (min)
	$\mu\text{g/g}$	DesvPad	$\mu\text{g/g}$	DesvPad		
Ácido gálico	2556,85	581,59	1863,79	594,91	168,7	13,5
Ácido ferúlico	5556,05	734,68	1057,34	391,16	191,1	14,75
Apigenina	NQ		36,56	1,17	269,1	17,06
Kaempherol+luteolina	93,10	23,50	35,65	12,12	285,1	16,11
Quercetina	4308,75	3043,28	2045,60	300,72	301,1	14,66
Ácido rosmarínico	202,92	93,75	736,20	858,88	359,4	14,29
Rutina	12953,38	8209,30	3773,13	3829,30	609,2	13,41

TR – Tempo de retenção. m/z (Da): massa/carga do íon. NQ: Não quantificado.

4.1. Placas de CCD método de Marston

No ensaio em CCD utilizando o método de Martson (2002), somente a enzima AChE foi testada. As amostras que revelaram o efeito inibidor estão demonstradas nas figuras 18a, 18b, 18c. Os extratos brutos acetato de etila e metanólico são testados em diferentes fases móveis, na fase hexano/acetato de etila 8:2 v/v é possível notar intenso halo branco do extrato acetato etila, essa mesma característica no extrato metanólico permanece na região basal da placa. A fase móvel clorofórmio/metanol 9:1 v/v é notório o halo no extrato metanólico, sendo que no acetato de etila o mesmo halo eluiu mais se comparando ao metanólico. Na fase BAW, os halos de inibição não foram observados. A identificação do perfil inibitório está relacionada ao perfil fitoquímico dos extratos e as substâncias ativas presente. A polaridade da fase móvel está intimamente interligada ao arraste dessas substâncias.

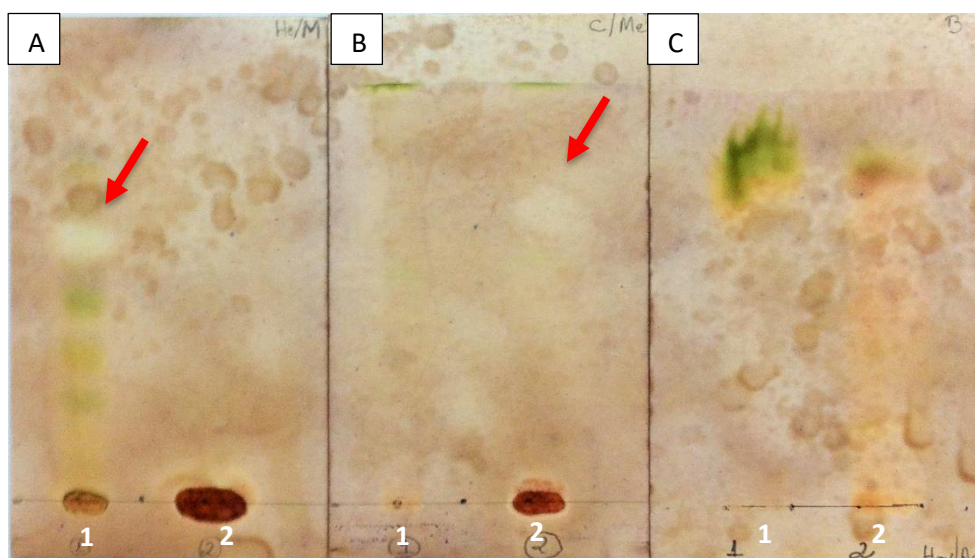


Figura 18: Placas cromatográficas dos extratos brutos metanólico *P.p* e AcOEt das folhas de *Pterodon pubescens*. (1) Extrato acetato de etila; (2) extrato metanólico. Fases móveis: (A) hexano:AcOEt (8:2), (B) CHCl_3 :MeOH (9:1) e (C) BAW.(butanol + ácido acético, demonstrando o perfis (halos brancos) de inibição enzimática.

Na figura 19a, 19b, 19c, exibe as amostras que constatarem a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase. Nas fases do extrato bruto metanólico, o melhor perfil de inibição foi na fase acetato etila, sendo que na metanólica foi observado com menor

intensidade, os ensaios cromatográficos anteriormente demonstram o perfil fitoquímico de flavonoides, isso sugere o possível efeito anticolinesterásico. Nas frações do extrato bruto acetato de etila, as frações 1.3 e 3.1 exibiram melhor halo de inibição na fase móvel Hexano:acetato etila 7:3 (v/v), comparando a fase clorofórmio/metanol (9: 1) v/v com as mesmas frações.

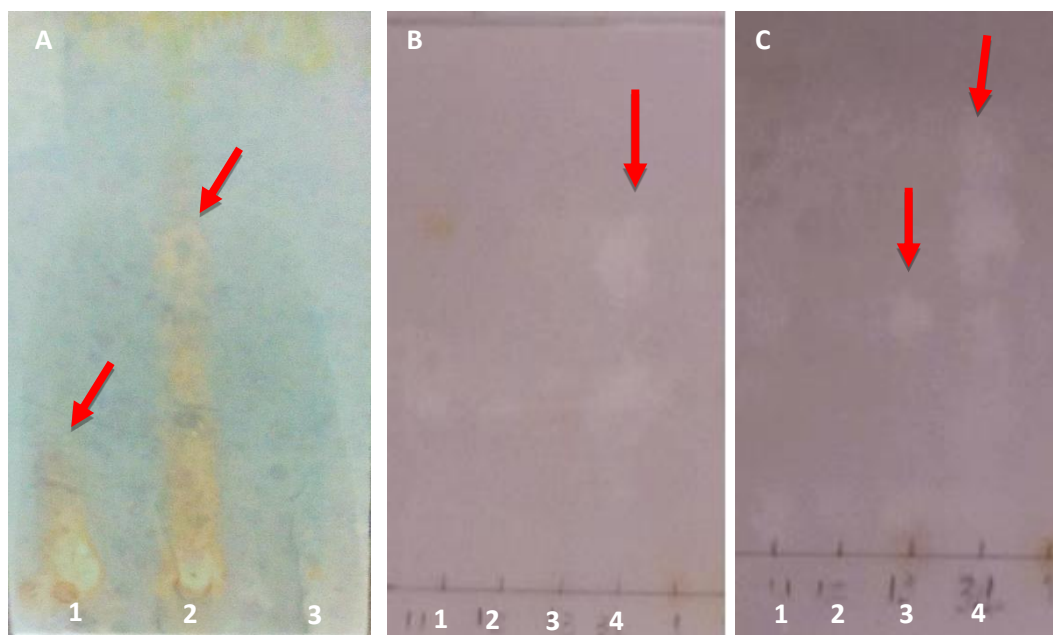


Figura 19: Placas de CCD. **A.** Fases extrato bruto metanólico. **1.** Hidroalcoólica. **2.** Acetato de etila. **3.** Hexânica. **B.** Frações extrato bruto acetato de etila. Fase móvel: CH₃Cl:MeOH: (9:1)v/v **1.** FR1.1.2. Fr1.2. **3.** FR1.3. **4.** FR3.1. **C.** Frações extrato bruto acetato de etila. Fase móvel: Hexano:acetato etila 7:3 (v/v). **1.** FR1.1.2. Fr1.2. **3.** FR1.3. **4.** FR3.1, demonstrando o perfis (halos brancos) de inibição enzimática

A identificação do perfil inibitório está relacionada ao perfil fitoquímico dos extratos, fase e frações e suas respectivas substâncias ativas. A polaridade da fase móvel está intimamente interligada ao arraste dessa substância. Os metabólitos secundários estão interligados ao efeito inibitório da enzima acetilcolinesterase, os testes em CCDC relataram possíveis classe de flavonoides e terpenos. A tabela 2 a seguir relata a relação destes com atividade biológica. Estudos realizados com extrato hidrometanólico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae) averiguou a presença de flavonoides, glicosídeos de flavonol, kaempferol, quercetina e seus derivados, que estão relacionados a atividade inibitória frente a AChE, a quercetina é o principal composto que tem efeito inibitório em baixas concentrações desse extrato (FERRERES et al.,2012). O gênero *Lathyrus* (Fabaceae) em que os extratos metanólico de suas respectivas espécies *Lathyrus cicera* L

e *Lathyrus digitatus* são enriquecidos de flavonoides, ensaios anticolinesterásico relataram que *Lathyrus digitatus* teve efeito inibitório modesto em relação a *Lathyrus cicera*. As análises realizadas por HPLC relataram principalmente a presenças de kaempferol e quercetina, a característica estrutural desses compostos estão relacionados a resposta biológica. A presença de apingenina e derivados da luteolina foram encontradas em *Lathyrus digitatus*. A atividade biológica encontrada nesse extrato se deve ao possível efeito de sinergismo de todas as substâncias presentes (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2017). A mesma bioatividade enzimática foi testada com extrato etanólico de *Artemisia annua* (Asteraceae), em que alguns compostos identificados da classe terpenoides como os diterpenos estão relacionados a essa atividade. Alguns autores relatam que flavonoides e sesquiterpenos têm efeito inibitório referente AChE (CHOUGOUO et al., 2016). Nesse contexto mostra o efeito do extrato relevante frente a inibição enzimática.

Tabela 2: Identificação do perfil fitoquímico dos extratos, fases e frações da espécie *P.p* e atividade inibitória da AChE relacionada.

	Perfil fitoquímico	Atividade inibitória
Extrato bruto metanólico	Perfil flavonoides	+
Extrato bruto acetato de etila	Perfil flavonoides	+
Fase hidroalcoólica	Perfil flavonoides	+
Fase acetato de etila	Perfil flavonoides	+
Fase hexânica	ND	—
Fração 1.1	Perfil flavonoides	—
Fração 1.2	Perfil flavonoides	—
Fração 1.3	Perfil flavonoides	+
Fração 3.1	Terpenos	+

Legenda: (+) Houve inibição enzimática (-) Não houve inibição enzimática.
ND: Sem identificação de compostos.

4.2. Estudo inibição acetilcolinesterase

O efeito inibitório da enzima acetilcolinesterase foi avaliada pelo método de Forsbeg (1984), com o substrato acetato-nitrofenila que na presença da enzima ocorre a hidrólise e formação do produto 4-nitrofenol, a intensidade da coloração amarela determina a quantidade de produto formado proveniente da reação enzima-substrato confirmados pelas leituras em absorvância a 405 nm.

A atividade anticolinesterásica foi notada tanto no extrato bruto metanólico, quanto no acetato de etila. O extrato bruto metanólico teve atividade de inibição de 73% enquanto o acetato de etila de 77% de efeito sobre a enzima, demonstrado na figura 20. Nas fases acetato de etila, foi de 79% e na hidroalcoólica 70%, representado na figura 21. Não houve diferença significativa entre os extratos e as fases respectivamente na maior concentração. O potencial de inibição difere entre as diferentes doses de 5 a 160 µg/mL, em que atividade inibitória é diretamente proporcional a concentração. Não houve diferença significativa entre as doses 80 µg/mL e 160 µg/mL para ambos os extratos e fases. Estes expressam a inibição relevante acima de 70 % nessas concentrações. As doses iniciais comparadas com a 160 µg/mL houve uma diferença significativa.

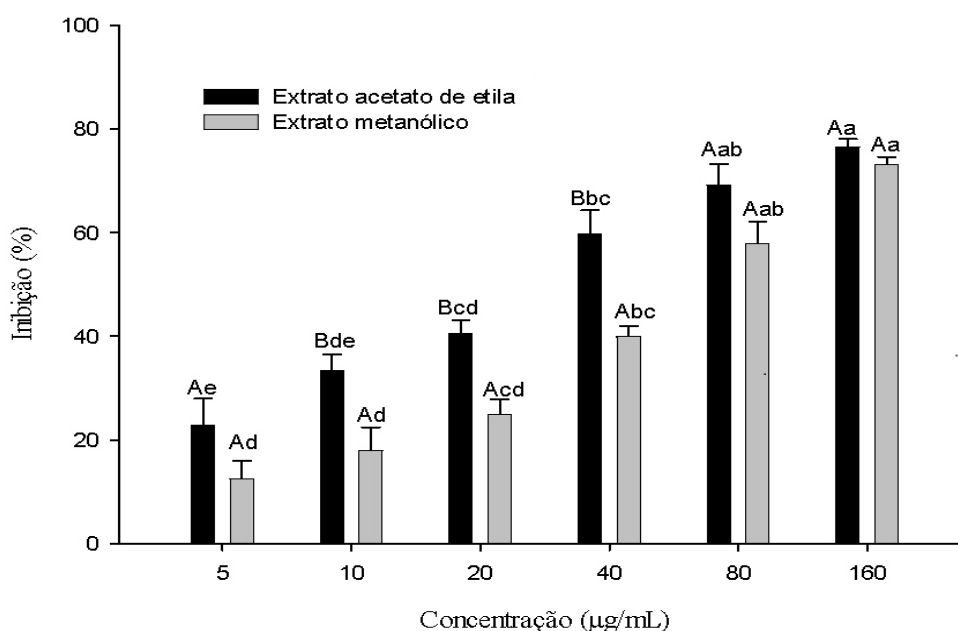


Figura 20: Porcentagem de inibição do extrato bruto acetato de etila e metanólico frente a enzima acetilcolinesterase. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula para extratos e minúsculas para doses do mesmo extrato) não diferem entre si, pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

Estudos anteriores com o extrato bruto hidroetanólico da folhas de *Pterodon emarginatus*, foi detectado por LCMS diferentes flavonoides como: luteolina, mircetina, apigenina, entre outros (NEGRI et al., 2014). Na família Fabaceae, o extrato bruto metanólico da semente de *Psoralea corylifolia* verificou flavonóides e seus derivados, também purificou e isolou o 4-metóxi-flavona (PRASAD et al., 2004). O gênero *Desmodium* é constituído de alguns alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides, terpenoides e flavonas em suas diferentes espécies (MA et al., 2011). Diversos flavonoides foram isolados das folhas de *Pterodon pubescens* como o kaempherol, luteolina, rutina, quercetina, entre outros (MIRANDA et al., 2014).

Na literatura relata diferentes gêneros, famílias e espécies com os metabólitos citados anteriormente, que exercem atividade anticolinesterasica. Nesse contexto foi detectado que o extrato aquoso de *Ficus capensis* (Moraceae), tem efeito inibitório frente a acetilcolinesterase de 70% em 1150 µg/mL, com IC₅₀ de 579,63µg/mL. A rutina, quercetina, ácido gálico e ácido elágico foram os constituintes majoritários quantificados nessa espécie (AKOMOLAFE et al., 2016). O ácido rosmarínico foi o composto predominante no extrato etanólico e hidroetanólico em cultura *in vitro* de *Lavandula viridise* (Lamiaceae), entre este o extrato etanólico foi mais ativo, com 87% de inibição frente a enzima (COSTA et al., 2013). Já a resposta inibitória de 45% foi visualizada por meio do ácido ferúlico isolado do extrato acetato de etila da espécie *Impatiens bicolor* Linn (Balsaminaceae), em concentração dominante de 250 µg/ml (Shahwar & Raza, 2010). O extrato aquoso de cinco espécies de *Agrimonia* (Rosaceae) foi entre 50 a 70% de inibição, e a análise fitoquímica por HPLC detectou a luteolina, apigenina e glicosídeos de quercetina, que desencadeou o efeito anticolinestersásico (KUBÍNOVA et al., 2015).

Estudos realizados com quatro extratos (éter de petróleo, água, metanol e acetato de etila) da espécie *Haplophyllum myrtifolium* Boiss (Rutaceae), foram quantificados quantos aos constituintes fenólicos e avaliados quanto a ação anticolineserásica. O ácido gálico encontrado foi entre 32,32 a 52,50 mg/g no extrato éter de petróleo e acetato de etila respectivamente e as menores concentrações nos demais. Os extratos apolares éter petróleo e acetato de etila alcançaram maior potencial de inibição frente a comparado aos demais, portanto a polaridade do solvente interfere diretamente na extração de compostos bioativos (ZENZIN et al., 2014).

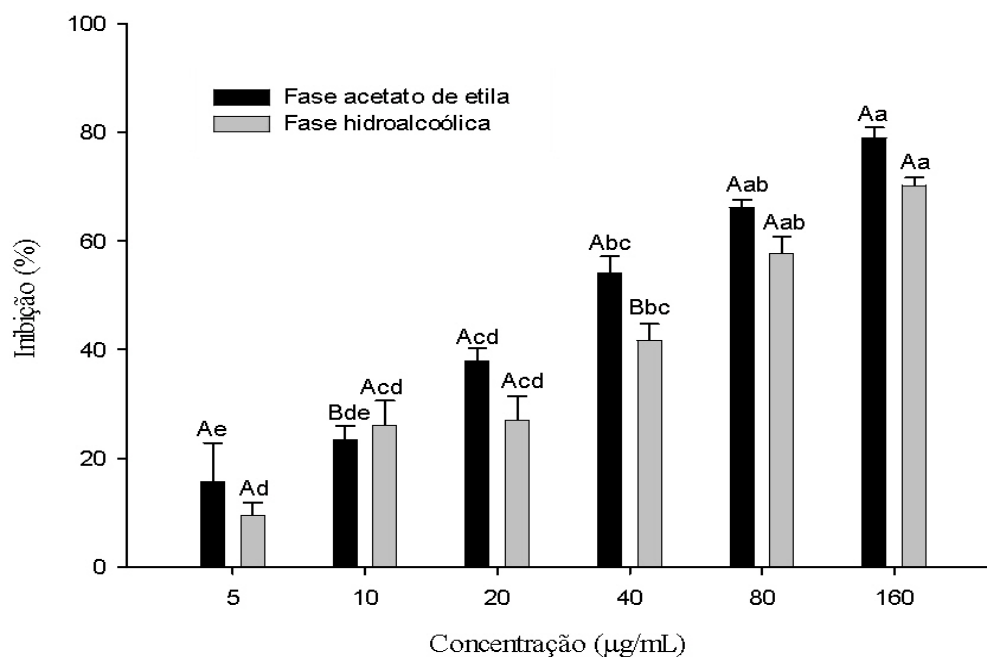


Figura 21: Porcentagem de inibição da fase acetato de etila e hidroalcoólica frente a enzima acetilcolinesterase. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula para extratos e minúsculas para doses do mesmo extrato) não diferem entre si, pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

Os compostos polifenólicos são componentes bioativos importantes em diversos extratos de plantas medicinais, os quais expressam várias propriedades farmacológicas. O perfil fitoquímico identificado em CCDC anteriormente, como os flavonoides, glicosídeos de flavonol, estão correlacionados ao potente efeito inibitório das fases acetato de etila e hidroalcoólica. Diversos compostos foram identificados nas frações do extrato bruto metanólico *Cynometra cauliflora* (Fabaceae), como: kaempferol, vitexina catequina, isovitexina, taxifolin e apigenina, que exibiram atividade anticolinesterásica. As frações mais polares revelaram melhor efeito comparadas com as menos polares (ADO et al.2014).

No extrato bruto etanólico da semente de *Vigna radiata* (Leguminosae), a vitexina foi o flavonoide dominante, seguido da isovitexina, ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido sinápico e ácido ferúlico), quantificados por HPLC com 15,36 mg/g; 10,05 mg/g; 7,56 mg/g; 8,21 mg/g 11,28 mg/g respectivamente, a concentração de 9,6 µg/mL de ácido gálico desencadeou inibição moderada da AChE. Esses compostos estão fortemente relacionados a resposta biológica encontrada (Basha et al., 2017). Estudos realizados por Gocer et al, (2016) mostra o efeito inibidor do taxifolina frente a enzima AChE. Considerado um flavonol (dihidroquercetina), o grupamento hidroxil e sua

capacidade de sequestrar radicais livres estão relacionados com efeito antioxidante e interação com enzimas, especificamente a acetilcolinesterase.

As frações provenientes do extrato etanólico de *Ocotea aciphylla* (Nees) Lauraceae, expressaram inibição significativa à AChE. Os constituintes prevalentes foram terpenoides, vitexina e fenilpropanoides que estão relacionados a atividade encontrada (CONCEIÇÃO et al., 2016). Os compostos ácido gálico e quercetina isolados do extrato acetato de etila da espécie *Caesalpinia mimosoides* (Fabaceae), em 100 µg/mL expressou efeito anticolinesterásico de 73% e 80,94% de inibição respectivamente, o flavonoide quercetina expressou maior atividade frente a enzima (Tangsaengvit et al., 2013). No extrato metanólico de *Phyllanthus acidus* foi encontrado o flavonoide quercetina, que teve resposta inibitória frente a acetilcolinesterase com o IC₅₀ em 1009,87 µg/mL do extrato (MONIRUZZAMAN et al., 2015).

A quantificação do extrato metanólico em LCMS sobrepôs o extrato acetato de etila nos principais compostos, apenas o ácido rosmarínico e apigenina exibiram maior concentração no extrato acetato de etila. O extrato bruto acetato de etila, metanólico e fases acetato de etila e hidroalcoólica da *Pterodon pubescequens* são classificados como potentes inibidores da acetilcolinesterase, que estão relacionados a presença de ácidos fenólicos, flavonoides e terpenoides. Conforme Vinutha et al (2007) diversas espécies com ação inibitória maior que 50% são classificadas como potentes inibidores da acetilcolinesterase, entre 30 a 50% efeito inibitório moderado, valores menores que 30 % são avaliados como baixa atividade inibitória. Os constituintes fitoquímicos citados exercem diversas atividades biológicas, especificamente ação anticolinesterásica como abordado por diversos autores.

5. CONCLUSÃO

Os resultados relatam que a potente ação inibitória da acetilcolinesterase proveniente do extrato bruto metanólico, acetato de etila, fase hidroalcoólica e fase acetato de etila das folhas de *Pterodon pubescens* BENTH, podem ser pela presença dos compostos fenólicos como: ácido gálico, ácido ferúlico, ácido rosmarínico e os flavonoides kaempferol, luteolina, apigenina, rutina e quercetina quantificados por LCMS e possíveis classes terpenoides detectados por CCDC. É possível detectar o halo branco de inibição da enzima em cromatografia em camada delgada em ambos extratos e fases, sendo que na fase hexânica não foi visualizado. O ensaio quantitativo em microplaca de 96 poços, confirmou a resposta inibitória detectada em CCDC. Não houve diferença significativa entre os extratos brutos e fases, ambos mostram inibição maior que 70%. O processo de partição para obtenção das fases não interfere na resposta biológica alcançada frente a enzima comparada ao extrato bruto, a dose significativa recomendada é de 80 µg/mL, que expressa potente inibição enzimática. A inibição da AChE no sistema nervoso central ocasiona alterações no sistema motor do inseto, levando a paralisia e possível morte. Esta espécie é promissora para futuros estudos *in vivo*, isolamento e purificação de moléculas bioativas, que possam atuar como biopesticidas vindouros no mercado. As informações obtidas contribuem para o conhecimento dessa espécie e benefício para a ciência atual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADU, A. A.; ZEZI, A. U.; YARO, A. H. Anti-diarrheal activity of the leaf extracts of *Daniellia Oliveri hutch* and *Dalz* (Fabaceae) and *ficus sycomorus* Miq (Moraceae). **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 4, p. 524-528, 2007.
- ARRIAGA, A. M. C. et al. Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 2, p. 187–190, 2000.
- ADO, M. A. et al. Chemical profile and antiacetylcholinesterase, antityrosinase, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity of *Cynometra cauliflora* L. leaves. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 3, p. 635-642, 2015.
- AKOMOLAFE, S. F. et al. Aqueous extract from *Ficus capensis* leaves inhibits key enzymes linked to erectile dysfunction and prevent oxidative stress in rats' penile tissue. **NFS Journal**, v. 4, p. 15-21, 2016.
- BUSTAMANTE, K. G. L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) - Fabaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 341-345, 2010.
- BAKER. A. M, et al. Comparative Efficacy Of Synthetic And Botanical Insecticides Against Sucking Insect Pest And Their Natural Enemies On Cotton Crop. **Journal of Mountain Area Reserach**, v. 1, p. 1–4, 2015.
- BASHA, S. A.; MAHESWARAIAH, A.; PRASADA RAO, U. J. S. Antioxidant profile, acetylcholinesterase inhibition, and platelet aggregation of polyphenols and proteins from germinating green gram (*Vigna radiata*). **International Journal of Food Properties**, v. 2912, n. May, p. 1–13, 2017.
- BERKOV, S.; MUTAFOVA, B.; CHRISTEN, P. Molecular biodiversity and recent analytical developments: A marriage of convenience. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1102–1110, 2014.
- BRUM, R. B. C. S. et al. Fitotoxicidade de óleos essenciais em plantas de melancia, feijão e arroz. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, n. 2, p. 101–109, 2014.

CHOUGOUO, R. D. K. et al. Anti-inflammatory and acetylcholinesterase activity of extract, fractions and five compounds isolated from the leaves and twigs of *Artemisia annua* growing in Cameroon. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1525, 2016.

CESPEDES, C. L. et al. Inhibition on cholinesterase and tyrosinase by alkaloids and phenolics from *Aristolelia chilensis* leaves. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1-12, 2017.

COSTA, P. et al. Accumulation of phenolic compounds in in vitro cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L'Hér and their antioxidant and anti-cholinesterase potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 69-74, 2013.

CONCEIÇÃO, R. S. et al. In vitro acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 2, p. 275–282, fev. 2016.

CEYLAN, R. et al. Chemical and biological fingerprints of two Fabaceae species (*Cytisopsis dorycniifolia* and *Ebenus hirsuta*): Are they novel sources of natural agents for pharmaceutical and food formulations? **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 254-262, 2016.

DUTRA, R. C. et al. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 243-250, 2009.

EL-HAWARY, E. et al. Anti-inflammatory Activity of the Phenolic-rich Extract of *Schotia brachypetalea* Sond. Fam. Fabaceae, Cultivated in Egypt. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 8, n. 4, p. 190–201, 2015.

EKIN, H. N. et al. Insight into anticholinesterase and antioxidant potential of thirty-four Rosaceae samples and phenolic characterization of the active extracts by HPLC. **Industrial Crops and Products**, v. 91, p. 104-113, 2016.

FERREIRA, N. C. F. Estudo Fitoquímico de *Waltheria Ferruginea*. **Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química.**, 2014.

FERRERES, F. et al. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 894-904, 2012.

FORSBERG, A.; PUU, G. Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from the electric eel by some organophosphates and carbamates. **European Journal of Biochemistry**, v. 140, n. 1, p. 153-156, 1984.

GOCER, H. et al. Acetylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes I and II inhibition profiles of taxifolin. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 6366, p. 1-7, 2016.

GASCA, C. A. et al. Assessment of anti-cholinesterase activity and cytotoxicity of *cagaita* (*Eugenia dysenterica*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1-7, 2017.

HANGANU, D. et al. Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of *Genista tinctoria* L. and *Genistella sagittalis* (L.) Gams (Fabaceae). **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 29, n. 1, p. 301–307, 2016.

HOSCHEID, J. et al. Determination by GC–MS–SIM of furanoditerpenes in *Pterodon pubescens* Benth: Development and validation. **Talanta**, v. 100, p. 372–376, 2012.

KUBINOVA, R.; SVAJDLENKA, E.; JANKOVSKA, D. Anticholinesterase, antioxidant activity and phytochemical investigation into aqueous extracts from five species of *Agrimonia* genus. **Nat Prod Res**, v. 30, n. 10, p. 1174–1177, 2015.

LABED, A. et al. Compounds from the pods of *Astragalus armatus* with antioxidant, anticholinesterase, antibacterial and phagocytic activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3026–3032, 2016.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. et al. Evaluation of antioxidant potential, enzyme inhibition activity and phenolic profile of *Lathyrus cicera* and *Lathyrus digitatus*: Potential sources of bioactive compounds for the food industry. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 609–619, 2017.

LÓPEZ, M. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 284–288, 2010.

WIENER, S. W.; HOFFMAN, R. S. Nerve Agents: A Comprehensive Review. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 19, n. 1, p. 22–37, 2004.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phyto chemical analysis: PCA**, v. 13, n. 1, p. 51–4, 2002.

MA, X. et al. The genus *Desmodium* (Fabaceae) -traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 314–332, 2011.

MIN, B. S. et al. Cholinesterase inhibitors from *Cleistocalyx operculatus* buds. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 10, p. 1665–1670, 2010.

MUHAMMAD, A. et al. Phytochemicals from *Dodonaea viscosa* and their antioxidant and anticholinesterase activities with structure–activity relationships. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 9, p. 1649–1655, 2016.

MIRANDA, M. L. D. et al. Sesquiterpenes and other constituents from leaves of *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 473–476, 2014.

MONIRUZZAMAN, M. et al. In vitro antioxidant and cholinesterase inhibitory activities of methanolic fruit extract of *Phyllanthus acidus*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 403, 2015.

NAG, G.; DE BRATATI. Acetylcholinesterase inhibitory activity of Terminalia chebula, Terminalia bellerica and Emblica officinalis and some phenolic compounds. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 121-124, 2011.

NEGRI, G.; MATTEI, R.; MENDES, F. R. Antinociceptive activity of the HPLC- and MS-standardized hydroethanolic extract of Pterodon emarginatus Vogel leaves. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8-9, p. 1062-1069, 2014.

NEAGU, E. et al. Antioxidant activity, acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of Pulmonaria officinalis and Centarium umbellatum extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2016.

PRASAD, N. R. et al. Antidermatophytic activity of extracts from Psoralea corylifolia (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 21–24, 2004.

RAJENDRA PRASAD, N. et al. Antidermatophytic activity of extracts from Psoralea corylifolia (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 21-24, 2004.

REGNAULT-ROGER, C. No Title. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 2, n. 1, p. 25-34, 1997.

STENERSEN, J. **Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology**. CRC Press, p.274 2004.

SHAH, M. S. et al. Cholinesterases inhibition and molecular modeling studies of piperidyl-thienyl and 2-pyrazoline derivatives of chalcones. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 4, p. 615-624, 2017.

SGARBOSSA, A.; GIACOMAZZA, D.; DI CARLO, M. Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants. **Nutrients**, v. 7, n. 7, p. 5764-5782, 2015.

SOUSA, G. F. DE et al. Flavonol triglycosides of leaves from Maytenus robusta with acetylcholinesterase inhibition. **Phytochemistry Letters**, v. 19, p. 34-38, 2017.

SZWAJGIER, D.; BOROWIEC, K. Phenolic acids from malt are efficient acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 1, p. 40–48, 2012.

URIARTE-PUEYO, I.; I. CALVO, M. Flavonoids as Acetylcholinesterase Inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 34, p. 5289-5302, 2011.

VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S. et al. Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 767-782, 2014.

VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 359–363, 2007.

WINK, M. **Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. v. 40, Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010.

WANG, X. et al. Fumigant, contact, and repellent activities of essential oils against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2014.

WAHYUNI, W. T.; DARUSMAN, L. K.; SURYA, N. K. Potency of *Rhizopora* Spp. Extracts as Antioxidant and Inhibitor of Acetylcholinesterase. **Procedia Chemistry**, v. 16, p. 681–686, 2015.

YIGIT, D.; YIGIT, N.; MAVI, A. Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 42, n. 4, p. 346-52, 2009.

ZENGİN, G. et al. A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 244-251, 2014.