

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUANA KAMAROWSKI LINS ALVES

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL INIBIDOR DE BUTIRILCOLINESTERASE, EM
EXTRATOS DE TOMATE (*Solanum sp.* - Solanaceae)**

CURITIBA
2018

LUANA KAMAROWSKI LINS ALVES

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL INIBIDOR DE BUTIRILCOLINESTERASE, EM
EXTRATOS DE TOMATE (*Solanum sp.* - Solanaceae)**

Monografia apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas, pela Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dra. Lupe Furtado Alle

Co-orientador: Prof^o Dr. Ricardo Lehtonen R. de
Souza

CURITIBA

2018
AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu Avôhai Mauro, a pessoa que mais me fez sentir-me amada, que transmitia amor em cada palavra e gesto que fazia por mim. Que me ensinou a amar à vida em todas as suas manifestações e plantou a semente da Biologia no meu coração, sempre torcendo para que um dia eu conseguisse me tornar bióloga. Infelizmente hoje o senhorzinho não está aqui em Terra para comemorar comigo essa vitória. Mas eu o carrego com certeza em todas as coisas que eu faço e em cada pedacinho da minha essência.

Gostaria de agradecer também à minha mãe, que sempre acreditou em mim, mesmo quando os objetivos pareciam realmente impossíveis. Minha luta sempre foi para te fazer realizada e feliz. Obrigada aos meus irmãos Rafael, Fefê e Kaio, por todo o orgulho que tem de mim. Agradeço imensamente aos meus filhos, Frederico e Yuri, que foram e sempre serão minha energia em forma de amor. De coração meus pequenos, por me ensinarem o verdadeiro sentido de amor, de força e de resiliência. Que os momentos de riso sem causa e de amor puro se façam permanentes e eternos.

À todos os meus educadores, por me ensinarem que educação é muito mais do que transmitir conhecimento, é transmitir amor, é emocionar, é tocar almas através da aprendizagem. À Prof^a Márcia Helena Mendonça, orientadora no PIBID, que me fez crescer imensamente como ser humano, como aluna e professora.

À minha orientadora Lupe, ficarei feliz se um dia for metade da professora que é. Por ser uma ótima orientadora, em todos os detalhes e por ser uma pessoa incrível. Ao meu orientador Ricardo, que sempre teve uma enorme paciência e atenção, por ter suportado com gentileza todas as inúmeras vezes em que eu fui tirar todos os tipos de dúvidas possíveis, mesmo quando repetidas. Meus mais sinceros agradecimentos a vocês dois, por confiarem em mim e me incentivarem a seguir em frente.

Aos meus amigos e familiares, em especial aqueles que aguentaram tantos bolos por estar fazendo mono, trabalhos, estudando. E ainda torcerem por mim e comemorarem minhas vitórias. Por fim, obrigada ao meu amor, que acompanhou toda a trajetória, aguentou minha ausência dentro de casa por conta dos compromissos e todas as minhas ansiedades. Principalmente, por comemorar

comigo cada pequeno passo e acreditar muito em mim. Obrigada por ser não só esposo, mas por todo o auxílio espiritual e mental, você é o alicerce que faz muitas pessoas seguirem com alegria e amor.

RESUMO

As colinesterases são as enzimas que degradam ésteres de colina, sendo a acetilcolinesterase (AChE) a principal responsável pela hidrólise de acetilcolina nas sinapses. Já a butirilcolinesterase (BChE) tem como substrato preferencial a butirilcolina, mas por ter sofrido algumas modificações moleculares em relação à AChE, pode se ligar à uma ampla gama de substratos, incluindo acetilcolina e compostos anticolinesterásicos. Alguns agrotóxicos organofosforados já foram descritos como inibidores de AChE, de modo que levam a disfunções colinérgicas pelo acúmulo de acetilcolina nas sinapses. Sendo também relatado o papel protetor promovido pela BChE, através do sequestro das toxinas, quando ocorre uma intoxicação devido à exposição à tais agrotóxicos. Além disso, muitas doenças do sistema nervoso possuem níveis de atividade de BChE alterados, o que torna os inibidores naturais de colinesterases importantes alvos de estudo, dentre eles, os glicoalcalóides solanáceos encontrados em exemplares da família Solanaceae. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo padronizar um protocolo de extrato de tomate (*Solanum*) e averiguar seu potencial inibitório de BChE. Foram realizados extratos de folha e do fruto do tomate, a partir de dois protocolos diferentes, que apresentavam diferenças quanto ao método de secagem do material e concentrações dos solventes, ambos para extratos metanólicos e etanólicos. E a análise da atividade da BChE foi medida em um espectrofotômetro. Os resultados apontam o comprimento de onda mais adequado para análise da atividade inibitória no espectrofotômetro, o melhor método de secagem do material e o solvente mais adequado para realização dos extratos; além de confirmarem a atividade inibitória de BChE a partir do tomate. Sugere-se que a partir deste trabalho sejam realizados testes com outras famílias de plantas, para investigar potenciais biológicos inibidores de BChE e assim, reduzir os efeitos colaterais dos inibidores sintéticos já existentes.

Palavras-chave: anticolinesterases, IChEs, extratos de plantas, inibidores naturais, solanáceas.

ABSTRACT

Cholinesterases are the enzymes that degrade choline esters, with acetylcholinesterase (AChE) being the main responsible for the hydrolysis of acetylcholine at the synapses. Butyrylcholinesterase (BChE) has butyrylcholine as its foremost substrate, but since it has undergone some molecular modifications to AChE, it can bind to a wide range of substrates, including acetylcholine and anticholinesterase compounds. Some organophosphorus pesticides have already been described as inhibitors of AChE, so that they lead to cholinergic dysfunctions by the accumulation of acetylcholine at the synapses. Also relating the protective role promoted by BChE, through the kidnapping of toxins, when intoxication occurs due to exposure to such pesticides. In addition, many diseases of the nervous system have altered levels of BChE activity, which makes natural inhibitors of cholinesterases important study targets, among them, the solanaceous glycoalkaloids, found in the Solanaceae family. Thus, the present work had as objective to standardize a protocol of tomato extract (*Solanum*) and to investigate its inhibitory potential of BChE. Leaf and tomato extracts were obtained from two different protocols, which showed differences in the drying method of the material and solvent concentrations, both for methanolic and ethanolic extracts. And the analysis of BChE activity was measured in a spectrophotometer. The results indicate the most adequate wavelength for analysis of the inhibitory activity in the spectrophotometer, the best drying method of the material and the solvent most suitable for the extracts; besides confirming the inhibitory activity of BChE from the tomato. It is suggested that from this work, other tests with other plant families to investigate biological potential inhibitors of BChE are needed, and thus reduce the side effects of existing synthetic inhibitors.

Key words: anticholinesterases, IChEs, plant extracts, natural inhibitors, solanaceae.

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	MATERIAIS PARA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	18
TABELA 02	VALORES DE ABSORBÂNCIAS DAS AMOSTRAS PARA TODOS OS COMPRIMENTOS DE ONDA.....	20
TABELA 03	VALORES DO TESTE DE WILCOXON PARA OS DIFERENTES EXTRATOS	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	07
1.1	CONTEXTO E PROBLEMA	07
1.2	OBJETIVOS	09
1.3	JUSTIFICATIVA	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	BUTIRILCOLINESTERASE	12
2.2	PARTICIPAÇÃO DA BChE NA DESINTOXICAÇÃO	13
2.3	SOLANÁCEAS, GLICOALCALÓIDES E BChE	15
2.4	UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS COMO INIBIDORES DE BChE	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO 01, ADAPTADO DE NWIDU ET. AL (2018)	17
3.2	PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO 02	17
3.3	ANÁLISE DE ATIVIDADE DA BChE	18
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20

4.1	DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA MAIS ADEQUADO PARA	AS	LEITURAS	20
.....				
4.2	DISTRIBUIÇÃO	DOS	DADOS	21
.....				
4.3	ANÁLISE	DE	REGRESSÃO	21
.....				
4.4	TESTE	DE	WILCOXON	22
.....				
4.5	PORCENTAGEM	DE	INIBIÇÃO	22
.....				
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS		24
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		26

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

As colinesterases são enzimas responsáveis pela hidrólise de ésteres de colina, gerando colina e acetato. Nos vertebrados, existem dois tipos de colinesterases, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), que diferem em seus substratos preferenciais. A AChE tem a acetilcolina como substrato natural e a BChE tem a butirilcolina como substrato preferencial, porém também pode hidrolisar a acetilcolina. (POHANKA, 2011; NUNES, 2007; BALASUBRAMANIAN; BHANUMATHY, 1993).

As duas enzimas apresentam uma semelhança maior do que 50% em sua cadeia de aminoácidos, possuindo o sítio ativo conservado (BALASUBRAMANIAN; BHANUMATHY, 1993; NUNES, 2007). Além disso, já foi evidenciado que essas enzimas surgiram por duplicação gênica (CHATONNET E LOCKRIDGE, 1989). Por meio de análise filogenética de expressão foi possível inferir que ambas possuem um precursor comum, que era responsável por hidrolisar acetilcolina. Assim, supõe-se que BChE surgiu por subfuncionalização (FORCE et. al 1998).

A AChE é responsável principalmente pela hidrólise de acetilcolina nas sinapses colinérgicas e ocorre de diferentes formas em diferentes tecidos, incluindo áreas do cérebro nas quais não ocorrem funções colinérgicas (JOHNSON E MOORE, 2000, apud BONO, 2014).

A BChE é codificada pelo gene *BCHE*, sintetizada no fígado, expressa nos neurônios cognitivos e distribuída para vários outros locais do corpo humano. No tálamo, projeções nucleolares para regiões específicas do córtex cerebral demonstram ter maior atividade de BChE do que projeções para regiões mais difusas, apontando que a BChE provavelmente tem funções específicas no tálamo. Também foi demonstrado que BChE e AChE possuem relação complementar em sua distribuição talâmica, ou seja, que os núcleos talâmicos contendo neurônios com a presença de AChE tem poucos ou nenhum neurônio positivos para BChE e vice-versa. A maioria dos núcleos talâmicos que se projetam para regiões específicas do córtex frontal, em geral são ligados a funções cognitivas e comportamentais e esses

em geral, expressam BChE quase exclusivamente. (DARVESH, 1998, DARVESH, 2003).

Segundo Perry et al. (1978, apud BONO, 2014) e Arendt et al. (1992, apud Bono, 2014), uma das condições nas quais AChE pode ter sua concentração reduzida em até 85% em regiões específicas do cérebro, é na Doença de Alzheimer (DA). Enquanto a BChE aumenta sua atividade nestes locais, justamente para compensar a hidrólise central de acetilcolina. Por outro lado, a enzima BChE diminui a sua atividade plasmática com a progressão da doença, o que pode ser explicado pelo fato de que ela tem sua atividade diminuída em baixas concentrações de acetilcolina. Ainda segundo os mesmos autores, outra consequência da DA, é o aumento dos níveis de BChE conforme a doença vai progredindo aliado ao acréscimo que também ocorre quando o indivíduo atinge 60 anos de idade, levando a um déficit de acetilcolina periférica.

Existem inibidores sintéticos de colinesterases que reduzem a hidrólise da acetilcolina, através da inibição de uma das enzimas (AChE ou BChE) ou ambas, com o intuito de restaurar um dos neurotransmissores colinérgicos, através do aumento da quantidade de acetilcolina na fenda sináptica. Pesquisas já foram desenvolvidas, para investigar o potencial terapêutico de substâncias naturais como inibidores de colinesterases (HAUX, LOCKRIDGE E CASIDA, 2002; AKHYPOVA et. al, 2003; HARRIS E WHITTAKER, 1962; NEVILLE et. al, 1990, BENDER et. al, 2018; KOSTELNIK E POHANKA, 2018). Portanto, o presente trabalho acadêmico teve como propósito a padronização de um protocolo para extratos de plantas com potenciais biológicos inibidores de colinesterases.

1.2 OBJETIVOS

- Geral:

- Padronizar um protocolo de extrato de tomate (*Solanum*) e testar seu potencial biológico para inibição de BChE.

- Específicos:

- Investigar as diferenças de conservação de compostos a partir de extratos preparados por diferentes solventes;

- Investigar se a forma de secagem do material pode interferir também nesta conservação;

- Analisar as diferenças de inibição de BCHE plasmática humana pela ação dos extratos obtidos de diferentes partes da planta;

- Avaliar o potencial inibitório de BChE dos extratos de tomate obtidos por diferentes protocolos.

1.3 JUSTIFICATIVA

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva, que causa danos em funções cognitivas e conseqüentemente, pode afetar as atividades cotidianas do indivíduo. É caracterizada por uma atrofia no córtex cerebral, reduzindo a quantidade de neurônios e as sinapses. Junto a isso, ocorre a acumulação de peptídeo β -amiloide ($A\beta$), extracelularmente, formando as placas senis e a acumulação intracelular da proteína *tau* hiperfosforilada (p-tau), formando os emaranhados neurofibrilares. As placas senis ocorrem principalmente no córtex entorrinal e hipocampo e os emaranhados neurofibrilares, no córtex límbico e de associação (REITZ et al., 2011 apud BONO, 2014). Portanto, atinge principalmente a região mais desenvolvida do cérebro humano, que abriga regiões responsáveis pelo pensamento, cognição, percepção e linguagem. Assim, ocorrem prejuízos na plasticidade neuronal e desestabilização de seus microtúbulos (como consequência das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares, respectivamente), fazendo com que os neurônios percam suas conexões. E também, que alguns neurotransmissores tenham seus níveis e mobilidade reduzidos, como por exemplo, a acetilcolina. Portanto, os inibidores de colinesterases (IChEs), são fármacos importantes como foco de estudo para desenvolvimento de potenciais terapêuticos (BONO, 2014).

Segundo as bulas dos principais medicamentos conhecidos, a galantamina e o donepezil são exemplos de IChEs que se ligam reversivelmente a AChE, enquanto a rivastigmina, pode diminuir a atividade das duas enzimas. Com a utilização dos anticolinesterásicos a doença pode ser estabilizada, mas assim como qualquer outro medicamento pode conter efeitos colaterais, tais como: cefaléia, náuseas, vômitos, perda de peso, entre outros. Portanto, considera-se importante o estudo de inibidores naturais de colinesterases, que possam reduzir os custos e os efeitos.

Além disso, de acordo com Darvesh (2003), muitas doenças do sistema nervoso, afetam núcleos talâmicos que possuem um número considerável de neurônios que expressam BChE. Visto que esses mesmos núcleos são envolvidos com vários comportamentos, além de cognição, atenção e emoção, afirma-se que a BChE é um alvo de estudo apropriado para o desenvolvimento de drogas que

possivelmente possam tratar tais neuropatologias. Entretanto, Johnson e Moore (2012), apontam que é necessário ter cautela, pois se o indivíduo possuir um déficit de BChE desconhecido e utilizar os inibidores de ChE, pode chegar a um excesso de acetilcolina e portanto, aos sintomas colinérgicos são associados ao envenenamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Butirilcolinesterase

Até o início da década de 40, a BChE era considerada como uma pseudo-colinesterase e não se conhecia exatamente o seu papel na hidrólise de acetilcolina. Então, Mendel e Rudney (1942), testando a ação da AChE e BChE frente a várias doses de acetilcolina, conseguiram mostrar que a BChE também é uma colinesterase verdadeira.

A enzima BChE ocorre em vários tecidos e/ou órgãos do corpo humano, como fígado, pulmões, coração, mucosa intestinal e também no cérebro, em áreas ligadas à cognição (MASSOULIÈ, 2002). No entanto, o local de sua maior concentração é no plasma. A BChE humana possui quatro formas moleculares distintas C₁, C₂, C₃ e C₄, sendo uma monomérica, outra monomérica ligada à uma albumina, uma dimérica e uma tetramérica, respectivamente. A forma tetramérica (C₄) é a mais abundante no soro humano, constituindo 98% de todas as formas encontradas (HARRIS et al., 1962; LOCKRIDGE et al., 1979; LOCKRIDGE, 1987; LA DU, 1982; MASSON, 1989; MASSON, 2000, apud BONO, 2014).

Segundo Nicolet et al. (2003, apud BONO, 2014) ocorreram algumas modificações moleculares na estrutura da BChE, que a tornaram passível de ligação à uma gama maior de substratos do que a AChE. O que pode corroborar a informação de que ela ocorre em concentrações maiores do que a AChE nos tecidos, exceto cérebro e músculo (LI et. al, 2000; DUYSSEN et. al, 2001, JOHNSON E MOORE, 2012). Ademais, já foram encontradas correlações entre a presença de BChE e a regulação da expressão da AChE (LAYER et al., 1992 apud BONO, 2014). O que complementa a ideia de que enquanto a AChE é inibida quando a acetilcolina está em altas concentrações, a BChE tem sua atividade aumentada. Pois, quando a AChE está ausente ou inativa, a BChE pode controlar a transmissão colinérgica. Desta forma, já foi sugerido que a AChE não é uma enzima indispensável para que as transmissões colinérgicas ocorram de forma adequada, visto que a BChE pode compensar sua ausência (LI et. al 2000).

Blondet et. Al(2010), verificou a localização da BChE nas junções neuromusculares de camundongos, sendo específica nas dobras subsinápticas e pouco presente na fissura primária, demonstrando também que ela pode contribuir com a hidrólise da acetilcolina no seu lugar específico. Entretanto, enquanto a inibição de AChE alterou o potencial da placa terminal, a inibição de BChE não alterou em nada o mesmo, mas diminuiu a probabilidade de liberação de acetilcolina pelo motoneurônio. Sugerindo assim, que ela não hidrolisa a acetilcolina que está ativa nos receptores, mas protege os terminais nervosos do excesso de desta e, portanto, tem um papel diferente da AChE (BLONDET et. al, 2010).

2.2 Participação da BChE na desintoxicação

O Brasil é um dos líderes mundiais no consumo de agrotóxicos, como herbicidas, fungicidas e inseticidas. Ser exposto a esses agentes pode levar ao surgimento de doenças crônicas e/ou intoxicações agudas (CAVALCANTI et. al, 2016). Dentre os agrotóxicos, encontramos os compostos organofosforados (OP), que são ésteres de ácido fosfórico. A toxicidade devida aos OPs, provém principalmente da inibição da AChE, fazendo com que ocorra um acúmulo de acetilcolina nas sinapses e por consequência, levando a disfunções colinérgicas, através da superestimulação do sistema nervoso. Muitas das áreas envolvidas na respiração são controladas pelo sistema colinérgico, portanto, um descontrole pode ter sérias consequências (CAREY, DUNN E GASPARI, 2013; BAJGAR, 2005; SÁNCHEZ-SANTED, COLOMINA E HERNÁNDEZ, 2016). Outra ligação importante e curiosa, é que a enzima paraoxonase 1 (PON1), que é envolvida na hidrólise de vários OPs, já teve polimorfismos apontados como mais frequentes na doença de alzheimer(LEDUC e POIRIER, 2008; SÁNCHEZ-SANTED, COLOMINA E HERNÁNDEZ, 2016). Porém, uma revisão sistemática, realizada por Pi et al.(2012), não encontrou associação entre PON1 e a doença. Em outro artigo de revisão, Sánchez-Santed, Colomina e Hernández (2016), concluíram que os OPs tem vários mecanismos de ação, além de desequilibrar o sistema colinérgico e que muitos destes mecanismos também são encontrados em doenças neurodegenerativas, como o aumento no nível de APP(proteína precursora amilóide), dos peptídeos beta amilóide e do estresse oxidativo, e, alterações nas proteínas do citoesqueleto, entre outros.

Johnson e Moore (2012) sugerem que a BChE pode funcionar como desintoxicante, pelo fato de ser amplamente expressa no fígado, pulmões e soro. Somado a isso, Lockridge e Masson (2000), constataram que indivíduos que aplicavam pesticidas e, portanto, eram expostos, reduziram seus níveis de atividade de BChE, porém sem apresentar envenenamento. O que poderia ser explicado por um papel protetor, talvez por meio do sequestro das toxinas. Já foi demonstrado também, que camundongos nulizigotos para AChE possuem muita sensibilidade a um determinado organofosforado: diisopropil fluorofosfato (DFP) (DUYSEN, 2001). E em outro estudo, Duysen et al (2007) demonstraram as diferenças de toxicidade para camundongos BChE +/+, +/- e nulizigotos, quando expostos ao inibidor de AChE, donepezil. Todos os camundongos BChE +/+ sobreviveram e estavam totalmente recuperados após 24 horas da exposição, enquanto BChE +/- apresentaram algumas mortes ou alta toxicidade e os de genótipo BChE -/- morreram. Junto a isso, demonstraram que a atividade da BChE foi inibida quase totalmente nos camundongos BChE +/+ após receberam transdermicamente ecotiosfato, outro OP. E concluíram que a BChE tem uma função biológica protetora de hidrolisar acetilcolina in vivo, quando AChE está inibida, pois camundongos AChE -/-, faleceram ao receberem inibidores de BChE, o que demonstra que ela é essencial para camundongos desse determinado genótipo. Com isso, embora ela seja mais lenta na hidrólise de acetilcolina, pode compensar a AChE em situações que exigem uma resposta rápida. Ainda nesse mesmo estudo de Duysen et. al (2007), foi apontado que a BChE é uma boa enzima captadora de organofosforados (OP), portanto tentaram demonstrar as diferenças da exposição ao mesmo, em camundongos BChE +/+ e -/-. Porém, não encontraram diferenças significativas de toxicidade entre os dois. Uma possível explicação é o fato de camundongos possuírem carboxilesterase, que também consome OP, em altas concentrações no plasma, o que pode interferir na reação com BChE. Por esses motivos, segundo Cavalcanti et. al(2016, p. 33), a “AChE eritrocitária e/ou a BChE plasmática continuam sendo indicadores biológicos de escolha para indivíduos expostos aos inseticidas OP e/ou carbamatos”.

Bodur e Cokugras (2005), demonstraram que o ácido indol-acético(AIA), que também atua no crescimento vegetal, através do aumento, divisão e diferenciação celular, também apresenta atividade inibitória de BChE e que ela é sensível a serotonina vegetal, mais especificamente na sua atividade arilacilamidase(AAA). Por

fim, o ethephon, que é outro composto que regula o crescimento das plantas, já foi demonstrado como inibidor de BChE por fosforilação na serina-198 (HAUX, LOCKRIDGE E CASIDA, 2002).

Por fim, sabe-se que alterações químicas e estruturais da BChE permitem que ela se ligue a uma gama maior de compostos, incluindo aqueles anti-colinesterases (como OP e carbamatos) e outros como heroína e cocaína (JOHNSON E MOORE, 2012; POHANKA, 2011).

2.3 Solanáceas, glicoalcalóides e BChE

A atividade anticolinesterásica dos glicoalcalóides solanáceos foi descoberta por Pokrovskii em 1956, através da utilização de batatas que contém grandes quantidades do glicoalcalóide solanina (AKHYPOVA et. al, 2003; HARRIS E WHITTAKER, 1962). Atualmente, essa atividade já foi melhor estudada, tanto que no artigo de Akhytova (2003), utilizaram AChE e BChE como biosensores para padronizar um método de detecção de glicoalcalóides solanáceos. De acordo com Barceloux (2009), os principais glicoalcalóides encontrados na batata são α -solanina e α -chaconina, enquanto no tomate são α -tomatina e desidrotomatina e na berinjela, a solasonina e a solamargina.

Neville et. al (1992), demonstraram que uma variante da BChE, mais especificamente, Gly-70 mutada e várias mutações C-terminais podem garantir uma resistência a determinados inibidores. De modo que alguns glicoalcalóides naturais que podem inibir a BChE selvagem, não exerçam algum efeito, sobre as variantes. Além de também serem mais resistentes à ligação dos inibidores OP iso-OMPA, específicos de BChE, e a um outro inibidor carbamato (POHANKA, 2011). Já no estudo de revisão de Krasowski, McGehee e Moss (2010), eles concluíram que a distribuição de plantas que contém consideráveis níveis de glicoalcalóides solanáceos é condizente com a distribuição de alelos atípicos de BChE. Assim, infere-se que a persistência dos alelos BChE atípicos, ocorreu devido aos efeitos inibitórios que substâncias naturais possuem sobre o alelo selvagem. Pois, pelo fato das plantas solanáceas serem muito utilizadas na alimentação humana, esses alelos podem ter aumentado de frequência devido a pressões seletivas positivas. Harris e Whittaker (1962), demonstraram *in vitro* que as colinesterases de indivíduos homozigotos para a variante atípica BChE, apresentam menor inibição frente a

solanina e solanidina, quando comparadas a dos indivíduos de fenótipo normal e intermediário. Solanina e solanidina, são glicoalcalóides solanáceos, sendo que a solanidina é o alcalóide que resulta da hidrólise da solanina. Os resultados foram de acordo com estudos preliminares dos mesmos autores, que também demonstraram inibição diferencial de BChE, de acordo com o fenótipo, utilizando extratos aquosos de batata e o anestésico dibucaína. Mais tarde, Neville et. al (1990), também demonstraram que a mutação Gly70, que gera a variante atípica da BChE, a torna resistente a determinadas concentrações de solanina e solanidina capazes de inibir a atividade da BChE normal em mais de 50%.

Casos fatais de intoxicação por solanina, não são comuns, mas já foram relatados. A maioria desses envolvendo crianças que ingeriram partes tóxicas de plantas silvestres (BARCELOUX, 2009). Os que se encontram na literatura, relatam desde uma menina que faleceu após ingestão de bagas do gênero *Solanum* (ALEXANDER, FORBES E HAWKINS, 1948), até um caso em que dezessete alunos de uma escola necessitaram ser internados após ingerirem uma refeição contendo batata (MCMILLAN E THOMPSON, 1979).

2.4 Utilização de extratos de plantas como inibidores de BChE

Um estudo realizado por Bender et al.(2018), avaliou se uma planta do gênero *Hypericum*, possuía alguma substância potencial inibitória enzimática e com eficácia anti-cancerígena. Porém, o extrato de *H. salsugineum* não apresentou efeito inibitório para colinesterases. Kostelnik e Pohanka (2018), realizaram um estudo para confirmar se o alcalóide natural das folhas de boldo, a boldina, possuía atividade inibitória de AChE conforme era descrito na literatura, além de investigaram essa inibição também em BChE. Os pesquisadores confirmaram a capacidade inibitória, porém afirmam que ela tem uma afinidade muito baixa pela enzima, de modo que não possui um efeito forte como descrito anteriormente em outros trabalhos.

Nwidu et al.(2018), avaliaram extratos metanólicos, etanólicos e aquosos de *Moringa oleifera*, para investigar potenciais inibidores da atividade da AChE, propriedades antioxidantes e teores totais de fenólicos e flavonóides. E concluíram que cinco dos 19 extratos testados possuíam atividade de IChE, dependente da

concentração de AChE, sendo o extrato metanólico de raiz, o inibidor mais potente dentre os estudados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no segundo semestre de 2018. Os exemplares das plantas utilizados foram coletados na cidade de Curitiba, em uma localização na qual eram cultivados livres de exposição a agrotóxicos, para não interferir na atividade da enzima BChE. As amostras de plasma humano utilizadas, são provenientes do banco de amostras do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, do departamento de Genética, da Universidade Federal do Paraná. Os extratos foram realizados a partir de dois protocolos que foram adaptados e serão detalhados abaixo.

3.1 Protocolo de extração 01, adaptado de Nwidi et. al (2018)

Inicialmente, as plantas foram submetidas à secagem em temperatura ambiente por 7 dias. Depois, com a utilização de luvas, os pecíolos foram retirados e as folhas puderam ser facilmente trituradas e/ou esfareladas com as próprias mãos, através de fricção, e os frutos foram espremidos com a utilização de um almofariz. O material resultante foi então misturado separadamente a dois solventes: etanol e metanol. Ou seja, foi realizado um extrato etanólico e outro metanólico das folhas e, um extrato etanólico e outro metanólico dos frutos, nas seguintes proporções: 150g de folha para 750 ml de solvente e 60 g do fruto para 200 ml do solvente. As amostras foram agitadas pelo menos uma vez ao dia, durante 3 dias, para auxiliar a solvatação. Após este período, as amostras foram filtradas utilizando um cadinho de vidro tipo Gooch, com placa porosa nº 3.

3.2 Protocolo de extração 02

O presente protocolo foi retirado e adaptado a partir de Santos et. al (2016), que foi em partes adaptado a partir do protocolo de Simão et. al (2013). Segundo Santos et. al (2016), este método proporciona um extrato bem concentrado e preserva um grande número de compostos fenólicos. Com este protocolo, foram realizados extratos somente a partir das folhas, pois não haviam proporções sugeridas para outras partes das plantas, diferentemente do protocolo 1.

Antes de serem submetidas à secagem, os espécimes foram lavados em água corrente e então, em água destilada para retirar sujeiras e pequenos artrópodes. Depois, o excesso de água foi retirado e os materiais ficaram por 48 horas em estufa com circulação de ar, na temperatura de 45°C (+/- 2°C). Após a secagem, as folhas tiveram seus pecíolos retirados e foram moídas, também por fricção com as mãos até ficar o mais próximo de uma farinha. Assim como para o protocolo 01, também foram realizados extratos metanólicos e etanólicos.

Para o primeiro, 1g da farinha de folha foi macerada em 50ml de uma mistura de metanol/água na proporção 1:1. E para o segundo 1g da farinha de folha foi macerada em 40 ml de uma mistura de etanol/água na proporção 1:1, durante 30 minutos. Subsequentemente, a amostra foi centrifugada a 2500xg durante 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e o precipitado foi novamente submetido aos processos descritos acima, mas dessa vez diluído em 40 ml da mistura de acetona/água na proporção 70:30. Por fim, os dois sobrenadantes foram reunidos.

3.3 Análise de atividade da BChE

Como substrato da BChE, foi utilizada a solução estoque 30mM de α -naftilacetato, na qual 56 mg de α -naftilacetato foram misturadas a 5 ml de acetona e 5 ml água. O reagente de cor utilizado foi o Fast Blue, do qual 10 mg foram dissolvidas em primeiro lugar em 1,5 ml de água e depois em 1 ml de SDS à 3%.

As amostras foram adicionadas aos tubos, de acordo com as proporções da tabela abaixo:

TABELA 01. MATERIAIS PARA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Materiais	Sem plasma	Sem extrato	Plasma + Extrato
Plasma(μ l)	-	500 μ l	500 μ l
Extrato vegetal	50 μ l	-	50 μ l
Tampão fosfato	650 μ l	200 μ l	150 μ l
α -naftilacetato	2000 μ l	2000 μ l	2000 μ l
Reagente de cor	200 μ l	200 μ l	200 μ l

FONTE: A AUTORA(2018)

As amostras de plasma utilizadas foram incubadas por 25 minutos à 37°C para o descongelamento. Foram preparados quatro tubos por extrato, o primeiro continha apenas água, o segundo era sem o plasma, o terceiro com plasma, mas sem extrato e o quarto com plasma e extrato. Os três primeiros tubos eram utilizados para zerar as leituras de absorvância no espectrofotômetro, para não interferir na leitura do tubo completo e, portanto, ser possível demonstrar a inibição da BChE plasmática, quando o extrato estivesse adicionado. As quantidades de extrato adicionadas aos tubos foram descontadas do tampão fosfato, assim como a quantidade de plasma ausente no segundo tubo foi preenchida pela mesma quantidade de tampão fosfato, conforme pode ser observado na tabela 01. Os materiais foram adicionados na sequência em que aparecem na tabela e reagiram durante 5 minutos antes de ser adicionado o reagente de cor. Logo após isso, os tubos foram lidos no espectrofotômetro nos tempos 0, 1 e 2 minutos.

3.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R. Foi realizado o teste Lilliefors, adaptado do teste de Kolmogorov-Smirnov, disponível no pacote nortest, para testar a normalidade da distribuição dos dados. Para inferir quais variáveis afetavam a atividade do extrato, foi realizado o teste de regressão. Para testar as diferenças de absorvância entre o tubo com extrato e sem plasma e, no tubo completo, e conseqüentemente inferir a inibição, foi utilizado o teste de comparação de médias de Wilcoxon. Por fim, para saber a porcentagem de inibição, foi realizada a divisão dos valores de absorvância do tubo completo pelos valores do tubo sem plasma e com extrato.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do comprimento de onda mais adequado para as leituras

O espectrofotômetro utilizado detecta faixa de valores dentro de 000 a 1999. Valores que estão fora dessa faixa são demonstrados com símbolos especiais. A faixa negativa é indicada pelo símbolo ν . Enquanto o valor máximo que aparece no mostrador digital é 1,999 para absorbância (A). Não obstante, os números que o excedem são demonstrados pelo símbolo \square até o valor máximo de \square .200.

Com base nisso, foram realizadas as leituras de absorbância para tubos contendo os extratos, para um tubo de reação contendo o corante Fast Red e outro com o corante Fast Blue, para testar qual era o comprimento de onda mais adequado para visualizar e medir a inibição. Os valores de absorbância para os tubos descritos estão listados na tabela 02.

¹TABELA 02. VALORES DE ABSORBÂNCIAS DAS AMOSTRAS PARA TODOS OS COMPRIMENTOS DE ONDA

¹ Na tabela 02, as abreviações se referem aos diferentes extratos. Sendo os solventes identificados por E(etanol) ou M(metanol), os protocolos 1 e 2 por P1 e P2 e o material folha ou fruto por FL e FR, respectivamente. BLUE e RED se referem aos corantes Fast Blue e Fast Red.

Comprimento	EP2	MP2	EP1FL	MP1FL	EP1FR	MP1FR	BLUE	RED
350	0.200	0.200	0.200	0.200	0.064	0.200	0.200	0.200
400	1962	1647	0.200	0.200	1192	679	0.200	0.200
450	1450	602	0.200	0.200	909	353	0.200	0.200
500	327	191	1676	1705	271	93	0.200	0.200
550	168	139	1614	1777	53	20	0.200	0.200
600	163	120	0.054	0.101	15	1	0.200	0.200
650	305	156	0.191	0.200	14	0	0.170	0.200
700	41	49	586	779	2	11.997	1597	0.055
750	7	19	34	78	11.997	11.993	1344	0.010
800	4	12	9	30	11.994	11.993	1200	1959
850	11.997	4	11.993	6	11.990	11.990	1105	1918
900	3	13	6	15	3	3	1005	1890
950	11.943	11.960	11.913	11.923	11.935	11.932	991	1856
1000	11.914	11.947	11.848	11.879	11.897	11.911	843	0.200

FONTE: A autora(2018)

A sensibilidade escolhida para as leituras em cada comprimento de onda foi aquela na qual era possível zerar o aparelho com o tubo contendo apenas água. Sendo sensibilidade 3 para o comprimento 350 nm, sensibilidade 2 para os comprimentos de 400 à 600 nm e sensibilidade 1 para todos os outros comprimentos. A partir dos valores da tabela, foi adotado o comprimento de onda de 750 nm para análise da atividade da BChE nos testes subsequentes. Pois dentro desse comprimento de onda ficaram os valores de absorbância mais próximos da faixa de leitura do aparelho, para as amostras do extrato e as amostras de reação com os corantes. E, além disso, a partir desses valores também foi decidida a utilização do corante Fast Blue para as análises subsequentes, pois no comprimento de onda de 750 nm, a amostra com Fast Blue, teve valores de absorbância mais próximos da faixa de leitura do aparelho, do que com o corante Fast Red.

4.2 Distribuição dos dados

De acordo com o teste Lilliefors, os dados não seguem uma distribuição normal e portanto, são não paramétricos. Deste modo, testes não paramétricos foram utilizados para as análises desses dados.

4.3 Análise de regressão

Este teste pode ser utilizado para indicar a relação entre variáveis para entender um fenômeno ou processo (AMARAL, SILVA E REIS, 2009). Deste modo, foi utilizada para indicar qual das variáveis influenciou significativamente na inibição causada pelo extrato. Os resultados obtidos foram que tanto o método (protocolo 1 ou 2), quanto o solvente (metanólico ou etanólico) e a parte da planta (folha ou fruto), são variáveis influenciadoras da inibição. E portanto, os extratos apresentam inibição diferencial de acordo com essas variáveis, apresentando os valores de p de 8,52e-07, 9.16 e-06 e 0,0015, respectivamente.

Um dos motivos que pode levar a diferenças entre os protocolos, é o tipo de secagem. Era notável, que as folhas submetidas ao protocolo 2 (secagem na estufa), eram mais fáceis de serem moídas, em contrapartida pode ser que devido às folhas serem submetidas à secagem na estufa, tenham uma quantidade menor de compostos conservados, por ficarem em uma temperatura maior do que a ambiente (utilizada na secagem do protocolo 1). Além disso, diferentes solventes podem conservar diferentes quantidades de compostos fenólicos, por exemplo (SANTOS et. al, 2016). Portanto, podemos obter inibições diferentes do extrato de acordo com o tipo de solvente utilizado. E por fim, sabe-se que diferentes partes de uma mesma planta também podem conter concentrações de substâncias diferentes de acordo com as funções que realizam.

4.4 Teste de Wilcoxon

O teste de Wilcoxon foi realizado para verificar se as médias de absorvância no tubo completo eram diferentes do tubo que não continha o extrato. Para então, poder afirmar o efeito inibitório do extrato.

²TABELA 03. Valores do teste de Wilcoxon para os diferentes extratos

Método/Solvente	Resultados
M1/S1	W = 9, p-value = 0.1797
M1/S2	W = 36, p-value = 0.004998
M2/S2	W = 9, p-value = 0.1
M2/S1	W = 0, p-value = 0.07652

² Na tabela 03, os tipos de solventes e os protocolos utilizados estão abreviados com códigos diferentes, sendo M1 e M2, para protocolo 1 e protocolo 2, respectivamente. E S1 ou S2 para, solvente etanol ou metanol, respectivamente.

FONTE: A autora(2018)

O único valor que foi significativamente menor que o tubo sem extrato, foi aquele dos tubos do protocolo 1, com o solvente metanol. Assim, infere-se que o metanol é o melhor solvente para conservar os compostos anticolinesterásicos do tomate. Esses dados estão de acordo com os dados de Santos et. al (2016), que testou diferentes protocolos de extração em folhas maduras de mandioca e concluiu que os diferentes métodos de extração afetavam o tipo e o teor dos compostos do extrato e que o metanol era o melhor solvente para conservação dos compostos.

4.5 Porcentagem de inibição

O percentual de inibição médio de todos os extratos foi de 12%. Mas especificamente, para o extrato do método 1 com o solvente 2, que foi o único estatisticamente significativo ($p=0,004998$) para inibir BChE (de acordo com o teste de Wilcoxon), o percentual de inibição foi de 16%.

Em um primeiro momento, os valores podem até parecer baixos, mas levando-se em conta de que se tratava de um extrato bruto, 16% de inibição é um valor considerável. A intenção inicial do presente trabalho foi a de padronizar um extrato de tomate que fosse capaz de inibir BChE, visto que o tomate faz parte da família das solanáceas que já são conhecidas por possuírem glicoalcalóides anticolinesterásicos. Sendo assim, a partir desse trabalho inicial, as análises podem ser estendidas para isolar especificamente o composto do tomate que é capaz de inibir a BChE. Se com o extrato bruto o percentual de inibição foi de 16%, acredita-se que com o composto inibitório isolado, o percentual de inibição seja bem maior. Desta forma, o extrato de tomate pode servir até mesmo como um controle, para a investigação de potenciais inibitórios de BChE em outros táxons de plantas. Ainda, segundo Kozukue et. al (2004) e Kozukue e Friedman (2003), a quantidade de glicoalcalóides solanáceos pode diminuir de acordo com a maturação em algumas variedades de tomate. Deste modo, pode ser considerado que realizando extratos a partir de tomates menos maduros, a inibição seja maior por conter mais glicoalcalóides.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A BChE humana é uma enzima encontrada em regiões do cérebro ligadas à cognição e ao comportamento (DARVESH, 1998, DARVESH, 2003 e WESCOE, 1947). Além disso, ela pode ter seus níveis aumentados com a idade e com o desenvolvimento de doenças neuropatológicas, fazendo com que ocorra um déficit de acetilcolina periférica, que é um importante neurotransmissor (PERRY et al, 1978, ARENDT et. al, 1992). Desse modo, inibidores sintéticos de colinesterases são bastante utilizados no tratamento de tais doenças, para reduzir a hidrólise de acetilcolina e restaurar esse neurotransmissor colinérgico. Porém, como esses medicamentos possuem efeitos colaterais desconfortáveis para os pacientes, torna-se relevante o estudo de inibidores naturais de colinesterases, para reduzir esse problema e possivelmente, o custo. Isto posto, a BChE é um importante alvo terapêutico para o desenvolvimento de inibidores.

Visto que já era descrito na literatura, que os integrantes da família Solanaceae, possuem glicoalcalóides inibitórios de BChE (AKHYPOVA et. al, 2003; HARRIS E WHITTAKER, 1962; ALEXANDER, FORBES E HAWKINS, 1948; MCMILLAN E THOMPSON, 1979), o presente trabalho realizou a padronização de um protocolo de extrato de tomate, com efeito inibitório da enzima BChE. Até onde

se sabe, esse foi o primeiro trabalho a realizar um extrato de tomate como representante da família Solanaceae, para testar seu efeito inibitório de colinesterase. Na literatura foram apenas encontrados com exemplares de batata ou a realização de extratos de tomate apenas para medir a quantidade de glicoalcalóides.

Em relação ao método de secagem, foi possível concluir que a temperatura ambiente é melhor do que a secagem na estufa, para conservação dos compostos com potenciais inibitórios de BChE. E que o solvente metanol também é superior em sua conservação, quando comparado com extratos etanólicos, tanto para extratos de folhas de tomate, quanto para os extratos do fruto. Esses resultados estão de acordo com os dados de Santos et. al (2016), que também encontraram uma maior conservação de compostos nos extratos preparados com metanol. Por fim, foi possível chegar a um valor de inibição de 16% com o extrato preparado pelo protocolo 1, utilizando metanol. Portanto, o presente trabalho abre perspectivas para pesquisas futuras que visem o isolamento do composto específico da planta do tomate, que possui atividade anticolinesterásica e assim atinja níveis de inibição maiores de BChE em sua forma purificada, do que no extrato bruto, onde outros compostos podem interferir. Para mais, sugere-se que esse trabalho pode servir de base também para o desenvolvimento de extratos à partir de outras plantas, utilizando o extrato de tomate como controle. Sendo assim, é possível investigar o potencial inibitório de colinesterase em vários outros táxons de plantas que ainda não foram investigados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHYPOVA, V. N.; DZYADEVYCH, S. V.; SOLDATKIN, A. P.; EL'SKAYA, A. V.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, NICOLE. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 18, pp. 1047-1053, 2003.

ALEXANDER, R. F.; FORBES, G. B.; HAWKINS, E. S. A Fatal Case of Solanine Poisoning. *British Medical Journal*, v. 2, n. 4575, p. 518, 1948.

AMARAL, G. D.; SILVA, V. L.; REIS, E. A. Análise de Regressão Linear no Pacote R. Relatório técnico - Série ensino RTE 001/2009. Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

AMES, B. N.; PROFET, M.; GOLD, L. S. Dietary pesticides (99.99% all natural)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 87, n. 19, pp. 7777-7781, 1990.

BAJGAR, J. Complex view on poisoning with nerve agents and organophosphates. Acta Medica [Hradec Kralove], v. 48, n. 1, pp. 3-21, 2005.

BALASUBRAMANIAN, A. S.; BHANUMATHY, C. D. Noncholinergic functions of cholinesterases. FASEB J., v. 7, p. 1354-58, 1993.

BARCELOUX, D. G. Potatoes, Tomatoes, and Solanine Toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.). Disease-a-month, v. 55, n. 6, pp. 391-402, 2009.

BENDER, O; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; ZENGIN, G.; MOLLIKA, A.; CEYLAN, R.; MOLINA-GARCÍA, L.; CÓRDOVA, M. L. F e ARZU, A. Integration of *in vitro* and *in silico* perspectives to explain chemical characterization, biological potential and anticancer effects of *Hypericum salsugineum*: A pharmacologically active source for functional drug formulations. Agbor G, ed. *PLoS ONE*, v. 13, n.6, Jun. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5986121/pdf/pone.0197815.pdf>. Acesso em:12/07/2018.

BLONDET, B; CARPENTIER, G.; FERRY, A.; CHATONNET, A.; COURTY, J. Localization of Butyrylcholinesterase at the Neuromuscular Junction of Normal and Acetylcholinesterase Knockout Mice. *Journal of Histochemistry e Cytochemistry*, v. 58, n. 12, pp. 1075-1082, 2010.

BODUR, E.; COKUGRAS, A. N. The effects of indole-3-acetic acid on human and horse serum butyrylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions*, v. 157–158, pp. 375-378, 2005.

BONO, G. F. *Investigação de associação entre a Butirilcolinesterase e a doença de Alzheimer*. 2014. Dissertação (Mestrado em Genética) - Programa de Pós-Graduação em genética da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Cavalcanti, L. P. A. N.; Aguiar, A. P.; Lima, J. A.; Lima, A. L. S. Intoxicação por Organofosforados: Tratamento e Metodologias Analíticas Empregadas na Avaliação da Reativação e Inibição da Acetilcolinesterase. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 3, pp. 739-766, 2016.

CAREY, J. L.; DUNN, C.; GASPARI, R. J. Central respiratory failure during acute organophosphate poisoning. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, v. 189, n. 2, pp. 403-410, 2013.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.*, v. 260, n.3 pp. 625–634. 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1138724/>. Acesso em: 27/09/2018.

DARVESH, S.; GRANTHAM, L. D.; HOPKINS, D. A. Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *The journal of comparative neurology*, v. 393, pp. 374-390, 1998.

DARVESH, S.; HOPKINS, D. A. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *The Journal of comparative neurology*, v. 463, pp. 25-43, 2003.

DONEPEZIL: cloridrato de donepezila. São Paulo: Biosintética Farmacêutica LTDA, 2018. Bula de remédio. Responsável técnico: Alberto Jorge Garcia Guimarães - CRF-SP n° 12.449. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=11447642018&pIdAnexo=10882862. Acesso em: 05/11/2018.

DUYSEN, E. G.; LI, B.; XIE, W. SCHOPFER, L. M.; ANDERSON, R. S., BROOMFIELD, C. A.; LOCKRIDGE, O. Evidence for nonacetylcholinesterase targets

of organophosphorus nerve agent: supersensitivity of acetylcholinesterase knockout mouse to VX lethality. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 299, n. 2, pp. 528-535, 2001.

DUYSEN, E. G.; LIA, B.; DARVESH, S.; LOCKRIDGE, O. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. *Toxicology*, v. 233, pp. 60-69, 2007.

EDDLESTON, M.; BUCKLEY, N. A.; EYER, P., DAWSON, A. H. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet*, v. 371, n. 9612, pp. 597-60, 2008.

FARIA, N. M. X., FASSA, A., G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. *Ciência e saúde coletiva*, v. 12, n. 1, pp. 25-38, 2007.

FORCE A.; LYNCH, M.; PICKETT, F. B.; AMORES, A.; YAN, Y.; POSTLETHWAIT, J. Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations. *Genetics*, v. 151, n. 4, pp. 1531-1545, 1998.

GALANTAMINA: bromidrato de galantamina. São Paulo: Fundação para o remédio popular - FURP, 2018. Bula de remédio. Responsável técnico: Dr.Gidel Soares - CRF-SP n° 14.652. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=8276932018&pIdAnexo=10739685. Acesso em: 05/11/2018.

HARRIS, H.; WHITTAKER, M. Differential response of human serum cholinesterase types to an inhibitor in potato. *Nature*, v. 183, pp. 1808-1809, 1959.

HARRIS, H.; WHITTAKER, M. Differential inhibition of the serum cholinesterase phenotypes by solanine and solanidine. *Annals of Human Genetics*, v. 26, n.1, pp. 73-76, 1962.

HAUX, J. E.; LOCKRIDGE, O.; CASIDA, J. Specificity of Ethephon as a Butyrylcholinesterase Inhibitor and Phosphorylating Agent. *Chemical Research in Toxicology*, v. 15, n.12, pp. 1527-1533, 2002.

JOHNSON, G.; MOORE, S. W. Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochemistry International*, v. 61, pp. 783–797, 2012.

JOSVIAK, N. D. *Avaliação da Atividade da Butirilcolinesterase associada às variantes BCHE K, BCHE -116A e APOE4 em Demências não Alzheimer*. 2016. Tese (Doutorado em Genética) - Programa de Pós-Graduação em genética da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KOSTELNIK, A.; POHANKA, M. Inhibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by a Plant Secondary Metabolite Boldine. *BioMed Research International*, v. 2018, Abr. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5907398/pdf/BMRI2018-9634349.pdf>. Acesso em: 12/07/2018.

KRASOWSKI, M. D.; MCGEHEE, D. S.; MOSS, J. Natural Inhibitors of Cholinesterases: Implications for Adverse Drug Reactions. *National Institutes of Health*, v. 44, n. 5, pp. 525-534, 1997.

LEDUC, V.; POIRIER, J.; HE, X. M.; ZHANG, Z. X.; ZHANG, J. W.; ZHOU, Y. T.; et al. Pharmacogenomics and the treatment of sporadic Alzheimer's disease: a decade of progress. *Neuroscience Letters*, v. 15, n. 1, pp. 107-108, 2009.

LEDUC, V.; POIRIER, J. Polymorphisms at the Paraoxonase 1 L55M and Q192R Loci Affect the Pathophysiology of Alzheimer's Disease: Emphasis on the Cholinergic

System and Beta-Amyloid Levels. *Neurodegenerative Diseases*, v. 5, pp. 225-227, 2008.

LI, B.; STRIBLEY, J. A.; TICU, A.; Xie, W.; SCHOPFER, L. M., HAMMOND, P.; BRIMIJOIN, S.; HINRICHS, S. H.; LOCKRIDGE, O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in acetylcholinesterase knockout mice. *J. Neurochem.*, v. 75, pp. 1320–1331, 2000.

MASSOULIÈ, J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, v. 11, pp 130–143, 2002.

MCMILLAN, M.; THOMPSON, J. C. An outbreak of suspected solanine poisoning in schoolboys: Examinations of criteria of solanine poisoning. *Q J MED*, v. 48, n. 190, 1979.

MENDEL, B.; RUDNEY, H. Studies on cholinesterase. I. Cholinesterase and pseudocholinesterase. *Biochem J*, v. 37, n. 1, pp. 59–63, Abr. 1943. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257843/?page=1>. Acesso em: 5/10/2018.

NEVILLE, L. F.; GNATT, A.; LOEWENSTEIN, Y.; SOREQ, H. Aspartate-70 to glycine substitution confers resistance to naturally occurring and synthetic anionic-site ligands on inovo produced human butyrylcholinesterase. *Journal of Neuroscience Research*, v. 27, n. 4, pp. 452-460, 1990.

NEVILLE, L. F.; GNATT, A.; LOEWENSTEIN, Y.; SEIDMAN, S.; ERLICH, G.; SOREQ, H. Intramolecular relationships in cholinesterases revealed by oocyte expression of site-directed and natural variants of human BCHE. *The EMBO Journal*, v. 11, n. 4, pp. 1641 - 1649, 1992.

KOZUKUE, N.; FRIEDMAN, N. Tomatine, chlorophyll, b-carotene and lycopene content in tomatoes during growth and maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 83, pp. 195-200, 2003.

KOZUKUE, N.; HAN, J.-S.; LEE, K.-R.; FRIEDMAN, M. Dehydrotomatine and r-Tomatine Content in Tomato Fruits and Vegetative Plant Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, pp. 2079–2083, 2004.

NUNES, K. Haplótipos do gene BCHE da Butirilcolinesterase humana e aspectos evolutivos. Curitiba, 2007. Tese. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NWIDU, L. L.; ELMORSY, E.; APRIOKU, J. S.; SIMINIALAYI, I.; CARTER, W. G. In Vitro Anti-Cholinesterase and Antioxidant Activity of Extracts of Moringa oleifera Plants from Rivers State, Niger Delta, Nigeria. *Medicines* v.5, n.71, Jul. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29976887>. Acesso em: 15/07/2018.

Pi, Y.; ZHANG, L.; CHANG, K.; Li, B.; Guo, L.; Fang, C.; GAO, C.; WANG, J.; XIANG, J.; LI, J. Lack of an association between Paraoxonase 1 gene polymorphisms (Q192R, L55M) and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neuroscience Letters*, v. 523, n. 2, pp. 174-179, 2012.

POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, v.155, pp. 219-230, 2011.

REID, G. A.; CHILUKURI, N.; DARVESH, S. Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. *Neuroscience*, v. 234, pp. 53–68, 2013.

RIVASTIGMINA: hemitartrato de rivastigmina. Tabão da Serra: Laboratório Químico Farmacêutico Bérgamo LTDA. Bula de remédio. Responsável técnico: Geisa Acetto Cavalari - CRF-SP N° 33.509. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=10493462018&pIdAnexo=10837045. Acesso em: 05/11/2018.

SÁNCHEZ-SANTED, F.; COLOMINA, M. T.; HERNÁNDEZ, E. H. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex*, v. 74, pp. 417-426, 2016.

SANTOS, M. A. I.; SIMÃO, A. A.; MARQUES, T. R.; SACKZ, A. A. e CORRÊA, A. D. Effect of different extraction methods on the antioxidant activity and phenolic compounds profile of cassava leaf. *Braz. J. Food Technol.*, v. 19, Jun. 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232016000100601. Acesso em: 19/07/2018.

SIMÃO, A. A.; LAGE, F. F.; CHAGA, P. M. B.; FRAGUAS, R. M.; FREIRE, J. M.; MARQUES, T. R.; CORRÊA, A. D. Antioxidants from medicinal plants used in the treatment of obesity. *European Journal of Medicinal Plants*, v. 3, n. 3, p. 429-443, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.9734/EJMP/2013/3095>. Acesso em: 20/07/2018.

TAFURI, J.; ROBERTS, J. Organophosphate poisoning. *Annals of Emergency Medicine*, v. 16, pp. 193-202, 1987.

Wescoe, W.C., Hunt, C.H., Riker, W.F. et al. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. *Am. J. Physiol.*, v. 149, pp. 549-551, 1947.