

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS E ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GUILHERME AUGUSTO BASCONI SCANDELA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* DAS ATIVIDADES INIBIDORAS  
DE UREASE E DE ACETILCOLINESTERASE DE CHÁS  
COMERCIALIZADOS EM SACHÊS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2021

**GUILHERME AUGUSTO BASCONI SCANDELAI**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* DAS ATIVIDADES INIBIDORAS DE UREASE  
E DE ACETILCOLINESTERASE DE CHÁS COMERCIALIZADOS EM SACHÊS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentada à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso de Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Campo Mourão, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaelle Bonzanini Romero

Coorientadora: Profa. Dra. Stephani Caroline Beneti

**CAMPO MOURÃO**

**2021**



## TERMO DE APROVAÇÃO

Avaliação *in vitro* e *in silico* das atividades inibidoras de urease e de acetilcolinesterase de chás comercializados em sachês.

POR

Guilherme Augusto Basconi Scandelai

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 04 de Maio de 2021 como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

---

Profa. Dra. Rafaelle Bonzanini Romero  
Orientadora

---

Profa. Dra. Stephani Caroline Beneti  
Co-orientadora

---

Profa. Dra. Ana Paula Peron

---

Prof. Me. Adriano Lopes Romero

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, pois com ele nada é impossível.

Agradeço aos meus pais, Agnaldo e Juliana, pelo exemplo de força, amor, bondade e apoio incondicional a todo momento. Vocês nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar meu sonho. Ter vocês como família é um presente imensurável.

A minha orientadora, Profa. Dra. Rafaelle Romero, ao Prof. Me. Adriano Romero e a minha coorientadora Profa. Dra. Stephani Beneti, por serem pessoas e profissionais incríveis que eu tanto admiro. Muito obrigado pelo o carinho e a ajuda de vocês quando precisei. Vocês são pessoas maravilhosas.

Agradeço aos meus amigos de graduação, em especial Bárbara Sena, Geovana Castro e Gustavo Galvão. Obrigado por acreditarem tanto em mim quando eu mesmo não o fazia, por me não me negarem ajuda e, principalmente, por tornar os momentos estressantes mais leves e felizes.

Aos meus amigos, Rafael Paulucci, Carlos Seiti, Leticia Cabrera, Guilherme Loto, Ryan Lazaretti, Gabriel Akira, Oghenegare Paul, Victor Moretti, Lucas Ribeiro, Gabriela Galvani, Rafaela Galassi, por todos os momentos felizes e pela grande amizade que me proporcionaram.

Agradeço também aos meus amigos do grupo GPEQ, Mirele Neves, David Lucas, Isaac Machado, Maria Vitoria e Danielle Silva. Tenho uma enorme satisfação e carinho por vocês, além do privilégio de termos dividido o mesmo laboratório. Obrigado por cada momento feliz e pela ajuda quando precisei.

*Guilherme A. B. Scandelai.*

## RESUMO

Os alimentos funcionais têm sido amplamente utilizados por apresentarem várias propriedades benéficas à saúde do ser humano. Os chás, por exemplo, apresentam várias propriedades farmacológicas, tais como os indicativos para tratamento de úlcera péptica causada por *Helicobacter pylori* e de Doença de Alzheimer. O mecanismo de ação desses chás envolve a inibição das enzimas urease, utilizada como mecanismo de sobrevivência pela *H. pylori*, e acetilcolinesterase, que finaliza o processo de sinapse colinérgica, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina, cuja não funcionalidade afeta a comunicação entre os neurônios. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* e *in silico* as atividades inibidoras de urease e acetilcolinesterase de chás comercializados em sachês. Para isso, foram utilizados oito tipos de chás em sachês {chá preto (*Camellia sinensis*), erva doce (*Pimpinella anisum*), chá verde (*Camellia sinensis*), hortelã (*Mentha spicata*), boldo (*Peumus boldus*), camomila (*Matricaria chamomilla*), capim cidreira (*Melissa officinalis*), chá mate (*Ilex paraguariensis*)}, cujas infusões foram submetidas à testes *in vitro*, pautada em análises espectrofotométricas, que permitiram avaliar o potencial de inibição das enzimas urease e acetilcolinesterase. Observou-se que, entre os chás avaliados, os chás preto e verde (*Camellia sinensis*) e mate (*Ilex paraguariensis*) apresentam percentual de inibição da enzima urease de 91,68, 84,75 e 83,32% e de acetilcolinesterase de 28,84, 27,74 e 34,45%, respectivamente. Para o estudo *in silico*, utilizou-se 30 compostos bioativos, indicados na literatura, que aparecem com frequência nos três chás que apresentaram potencial de inibição enzimática nos estudos *in vitro*. Observou-se que: 16 das substâncias avaliadas possuem propriedades moleculares adequadas para o processo de biodisponibilidade oral; para 11 das substâncias avaliadas há predição de bioatividades, tais como a de inibidor de enzima; a maioria das substâncias avaliadas apresentam resultados positivos para absorção no intestino humano e negativos para inibição das isoformas do citocromo P450, carcinogenicidade e mutagenicidade. Nos estudos de ancoragem molecular observou-se que: (i) 13 das substâncias avaliadas interagem no sítio ativo da enzima urease, com destaque para as substâncias quercetina, ácido cafeico e ácido ursólico; (ii) nove potenciais substâncias inibidoras da enzima acetilcolinesterase. Os resultados obtidos permitiram definir três chás com potencial de inibição de urease e acetilcolinesterase, assim como entender que tipos de substâncias estão envolvidas com essas bioatividades.

**Palavras-chave:** Alimentos funcionais. Substâncias bioativas. Inibição enzimática.

## ABSTRACT

Functional foods have been widely used because they have several properties beneficial to human health. Teas, for example, have several pharmacological properties, such as indicative for the treatment of peptic ulcer caused by *Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease. The mechanism of action of these teas involves the inhibition of urease enzymes, used as a survival mechanism by *H. pylori*, and acetylcholinesterase, which ends the cholinergic synapse process, hydrolyzing the neurotransmitter acetylcholine, whose non-functionality affects communication between neurons. In this context, the present study aimed to evaluate *in vitro* and *in silico* the urease and acetylcholinesterase inhibitory activities of teas commercialized in sachets. For this, eight types of tea in sachets were used {black tea (*Camellia sinensis*), fennel (*Pimpinella anisum*), green tea (*Camellia sinensis*), mint (*Mentha spicata*), bilberry (*Peumus boldus*), chamomile (*Matricaria chamomilla*), lemongrass (*Melissa officinalis*), mate tea (*Ilex paraguariensis*)}, whose infusions were subjected to *in vitro* tests, based on spectrophotometric analyzes, which allowed to evaluate the inhibition potential of urease and acetylcholinesterase enzymes. It was observed that, among the evaluated teas, the black and green teas (*Camellia sinensis*) and mate (*Ilex paraguariensis*) presented a percentage of inhibition of the urease enzyme of 91.68, 84.75 and 83.32% and of acetylcholinesterase of 28.84, 27.74 and 34.45%, respectively. For the *in silico* study, 30 bioactive compounds, indicated in the literature, were used, which appear frequently in the three teas that showed potential for enzymatic inhibition in *in vitro* studies. It was observed that: 16 of the evaluated substances have adequate molecular properties for the oral bioavailability process; for 11 of the evaluated substances there is a prediction of bioactivities, such as that of enzyme inhibitor; most of the substances evaluated show positive results for absorption in the human intestine and negative for inhibition of cytochrome P450 isoforms, carcinogenicity and mutagenicity. In molecular docking studies, it was observed that: (i) 13 of the substances evaluated interact at the active site of the enzyme urease, with emphasis on the substances quercetin, caffeic acid and ursolic acid; (ii) nine substances with potential to inhibit acetylcholinesterase enzyme. The results obtained allowed to define three teas with potential to inhibit urease and acetylcholinesterase, as well as to understand what types of substances are involved with these bioactivities.

**Keywords:** Functional Foods. Bioactive substances. Enzyme inhibition.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Foto da <i>Camellia sinensis</i> . .....	17
<b>Figura 2</b> - Estrutura química da cafeína (1). .....	18
<b>Figura 3</b> - Estruturas químicas da catequina (2), galocatequina (3), epigalocatequina (4), galato de epigalocatequina (5), epicatequina (6) e galato de epicatequina (7). ...	19
<b>Figura 4</b> - Estruturas químicas da teaflavina (8), teaflavina 3-galato (9), teaflavina 3'-galato (10), teaflavina 3,3'-digalato (11), ácido gálico (12), quercetina (13) e kaempferol (14). .....	20
<b>Figura 5</b> - Foto da <i>Ilex paraguariensis</i> . .....	21
<b>Figura 6</b> - Estruturas químicas do ácido quínico (15), ácido cafeico (16), ácido 3-cafeoilquínico (17), ácido 4-cafeoilquínico (18), ácido clorogênico (19), ácido 3,5-cafeoilquínico (20), 3,4- ácido cafeoilquínico (21) e 4,5-ácido cafeoilquínico (22).....	22
<b>Figura 7</b> - Estruturas químicas da teobromina (23) e teofilina (24). .....	23
<b>Figura 8</b> - Estruturas químicas do linalol (25) e geraniol (26). .....	23
<b>Figura 9</b> - Estruturas químicas da rutina (27), kaempferol-3-o-rutinosídeo (28), ácido ursólico (29) e tocoferol (30). .....	24
<b>Figura 10</b> - Diagramas de inibição reversível. .....	25
<b>Figura 11</b> - Sítio ativo da enzima urease ilustrando os resíduos de aminoácidos envolvidos na hidrólise da ureia. ....	27
<b>Figura 12</b> - Hidrólise da Acetilcolina pela Acetilcolinesterase (AChE). .....	28
<b>Figura 13</b> - Estrutura tridimensional da AChE com a entrada do sítio ativo no topo. ....	28
<b>Figura 14</b> - Processo de obtenção do extrato bruto rico em acetilcolinesterase.....	34
<b>Figura 15</b> - Aspectos visuais dos chás: (A) mate; (B) erva doce; (C) verde; (D) camomila; (E) boldo; (F) cidreira; (G) hortelã; (H) preto. ....	38
<b>Figura 16</b> - Aspectos visuais observados nos testes de inibição da urease utilizando chás: (A) controle; (B) erva doce; (C) hortelã; (D) cidreira; (E) camomila; (F) boldo; (G) mate; (H) verde; (I) preto; (J) tiouréia. ....	39
<b>Figura 17</b> - Espectros de absorção, na região do ultravioleta-visível, obtidos após os testes <i>in vitro</i> para a urease. ....	40
<b>Figura 18</b> - Espectros de absorção solução padrão da enzima acetilcolinesterase (AChE, adquirido Sigma Aldrich) e do extrato obtido da barata <i>Gromphadolina portentosa</i> . ....	43

<b>Figura 19</b> - Aspectos visuais observados nos testes de inibição da AChE utilizando chás: (A) mate; (B) erva doce; (C) verde; (D) camomila; (E) boldo; (F) cidreira; (G) hortelã; (H) preto e (I) controle. ....	44
<b>Figura 20</b> - Espectros de absorção, na região do ultravioleta-visível, obtidos após os testes <i>in vitro</i> para a AChE.....	45
<b>Figura 21</b> - Agrupamento hierárquico das interações dos compostos avaliados com os resíduos de aminoácidos da enzima urease (PDB ID: 6ZJA). Em destaque estão os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima.....	53
<b>Figura 22</b> - Compostos que interagem com resíduos de aminoácidos do tipo histidina presentes no sítio ativo da enzima urease (PDB ID: 6ZJA).....	54
<b>Figura 23</b> - Resultado do estudo de ancoragem molecular dos compostos 1-30 com a enzima urease (PDB ID: 6ZJA). Os compostos avaliados estão representados em modelo de bastão e a cadeia da enzima em azul escuro (lado esquerdo) e por sua superfície (lado direito).....	54
<b>Figura 24</b> - Agrupamento hierárquico das interações dos compostos avaliados com os resíduos de aminoácidos da enzima acetilcolinesterase (PDB ID: 4EY6). Em destaque estão os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima.....	58
<b>Figura 25</b> - Resultado do estudo de ancoragem molecular dos compostos 1-30 com a enzima acetilcolinesterase (PDB ID: 4EY6). Os compostos avaliados estão representados em modelo de bastão e a cadeia da enzima em azul escuro (lado esquerdo) e por sua superfície (lado direito).....	58



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Código e nome dos compostos, com seus respectivo código SMILES. ...35	35
<b>Tabela 2</b> - Absorbância e porcentagem inibitória de urease dos chás avaliados.....40	40
<b>Tabela 3</b> - Absorbância e porcentagem inibitória de AChE dos chás avaliados. ....45	45
<b>Tabela 4</b> - Valores de propriedades moleculares, calculadas na ferramenta Molinspiration, dos compostos <b>1-30</b> . ....48	48
<b>Tabela 5</b> - Escore obtido do estudo de predição de bioatividade dos compostos <b>1-30</b> . .....50	50
<b>Tabela 6</b> – Resultados de propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) dos compostos <b>1-30</b> , calculados na ferramenta admetSAR. ....52	52
<b>Tabela 7</b> - Energias de interação, em kcal.mol <sup>-1</sup> , dos compostos <b>1-30</b> com a enzima urease (PDB ID: 6ZJA) obtidas do estudo de ancoragem molecular. ....56	56
<b>Tabela 8</b> - Energias de interação, em kcal.mol <sup>-1</sup> , dos compostos <b>1-30</b> com a enzima acetilcolinesterase (PDB ID: 4EY6) obtidas do estudo de ancoragem molecular. ....59	59

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	14
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>3.1 Chás</b> .....	15
<b>3.2 Inibição Enzimática</b> .....	24
3.2.1 Inibição Reversível.....	24
3.2.2 Inibição irreversível.....	25
<b>3.3 Urease e a <i>Helicobacter pylori</i></b> .....	26
<b>3.4 Acetilcolinesterase e a Doença de Alzheimer</b> .....	27
<b>3.5 Estudo <i>in silico</i></b> .....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
<b>4.1 Materiais</b> .....	32
<b>4.2 Preparo dos chás</b> .....	32
<b>4.3 Preparo do extrato de urease</b> .....	32
<b>4.4 Teste <i>in vitro</i> para a inibição da urease</b> .....	32
<b>4.5 Preparo do extrato de acetilcolinesterase</b> .....	33
<b>4.6 Testes <i>in vitro</i> para a inibição da acetilcolinesterase</b> .....	34
<b>4.7 Ferramentas computacionais <i>in silico</i></b> .....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	38
<b>5.1 Preparo dos chás</b> .....	38
<b>5.2 Teste <i>in vitro</i> para a inibição da urease</b> .....	38
<b>5.3 Testes <i>in vitro</i> para a inibição de acetilcolinesterase</b> .....	43
5.3.1 Extração da acetilcolinesterase (AChE).....	43
<b>5.4 Propriedades moleculares e predição de bioatividade</b> .....	47
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	60
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

O chá uma das bebidas mais consumidas no mundo, é consumido principalmente nos países Asiáticos, onde seu significado vai além de uma simples bebida, pois se torna um ritual de grande importância social e cultural (ROHMER, 2002).

Com centenas de tipos e sendo considerado um recurso a mais no tratamento de doenças, os chás são referidos na literatura como uma das melhores fontes de compostos fenólicos. São ricos em catequinas, flavonoides que apresentam propriedades biológicas como atividade antioxidante e sequestradoras de radicais livres. O método de infusão, utilizada para a preparação dos chás, contribuem para a extração desses compostos fenólicos, considerados benéficos à saúde (MANDEL; YOUDIM, 2004) (HIGDON; FREI, 2005).

Há indícios de que alguns chás podem contribuir para o combate de doenças causadas por *Helicobacter pylori*, uma bactéria Gram-negativa que coloniza a mucosa gástrica causando infecção. Essa bactéria é capaz de se fixar ao estômago e elevar o pH local, sendo a urease produzida por ela a responsável por esta fixação. Isso faz com que a urease seja considerada o atributo biológico mais importante dessa bactéria, uma vez que sem essa enzima ela não conseguiria colonizar a mucosa gástrica (SILVA, 2015).

Neste sentido, a busca por substâncias com potencialidade de inibição de urease pode contribuir para o desenvolvimento de fármacos para combater a *Helicobacter pylori*. Sabe-se que muitos mecanismos de ação de fármacos são baseados em inibição enzimática reversível ou irreversível. Na inibição reversível ocorre interações não-covalentes entre o inibidor e a enzima, enquanto na inibição irreversível envolve modificações na estrutura da enzima, levando a uma inativação definitiva (VOET *et al.*, 2014).

Alguns estudos, tais como os reportados, indicam que a urease da soja é similar a produzida pela bactéria *Helicobacter pylori*, o que permite o uso da primeira em testes *in vitro* de inibição enzimática para estudo de substâncias com potencial de combater a bactéria *Helicobacter pylori*.

Uma das formas de estudar a inibição da enzima urease é quantificar a amônia, produzida no meio reacional, utilizando a reação de Berthelot modificada, que envolve a reação de fenol-hipoclorito catalisada por nitroprussiato de sódio. Nessa reação, a amônia reage com o fenol e o hipoclorito para formar uma substância de coloração

azul (indofenol, com absorvância em aproximadamente 630 nm), cuja intensidade é proporcional à concentração de amônia.

Há também indícios de que alguns chás podem contribuir na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). A acetilcolinesterase é uma enzima que finaliza o processo de sinapse colinérgica, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em ácido acético e colina. A ACh é um neurotransmissor capaz de transmitir, modular e amplificar sinais (informação) entre neurônios e outras células do organismo. A não funcionalidade desse neurotransmissor afeta a comunicação entre os neurônios, comprometendo o estado físico e mental do indivíduo. Essa perda pode estar envolvida com a Doença de Alzheimer (DA), uma doença que se caracteriza por gerar um distúrbio progressivo da memória e outras funções cognitivas, afetando o funcionamento ocupacional e social do indivíduo (SÁMANO *et al.*, 2012).

Os inibidores de colinesterases (I-ChE) são os principais fármacos licenciados para o tratamento específico da DA. Seu uso baseia-se na inibição das suas principais enzimas catalíticas, a acetil e a butirilcolinesterase, visando o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina (FORLENZA, 2005).

Uma maneira de estudar a inibição da acetilcolinesterase é pela complexação da acetilcolina não hidrolisada com o íon  $Fe^{+3}$ . Nessa reação, a acetilcolina não hidrolisada reage com a hidroxilamina formando N-hidroxiacetamida, que então é complexada pelo  $Fe^{+3}$  e apresentará uma cor marrom arroxeada. Esse complexo possui absorvância em aproximadamente 540 nm e sua intensidade varia de acordo com concentração da ACh não hidrolisada.

Atualmente, os progressos na Química Computacional vêm se destacando de forma significativa por demonstrarem eficientes algoritmos de cálculos químico-quânticos. O estudo *in silico* auxilia na expressão de propriedades geométricas e eletrônicas das moléculas e suas interações em curto intervalo de tempo, permitindo assim, o uso de métodos matemáticos para o cálculo de propriedades moleculares e para a simulação do comportamento molecular (CARNEIRO *et al.*, 2016).

No contexto da Ciência dos Alimentos, as metodologias *in silico* vem ganhando espaço para a identificação de interações e compostos bioativos que podem estar associadas a uma atividade biológica (CAVALIERE; COZZINI, 2018). Os chás em geral são reportados por possuírem atividades biológicas importantes na literatura, como: ação antiinflamatória, antialérgica e anticarcinogênica. Isso deve a sua composição química complexa, pois a maioria dos chás possuem compostos bioativos

como flavonóides, catequinas, polifenóis, alcalóides, vitaminas e sais minerais (BRAIBANTE *et al.*, 2014).

Diante do exposto, e levando em consideração o aumento do consumo de alimentos funcionais na dieta convencional, o presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* e *in silico* a atividade inibidora das enzimas urease e acetilcolinesterase de chás comercializados em sachês.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* e *in silico* as atividades inibidoras de urease e de acetilcolinesterase de chás comercializados em sachês

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar *in vitro* o potencial de chás comercializados em sachês em inibir a atividade da enzima urease.
2. Avaliar *in vitro* o potencial de chás comercializados em sachês em inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase.
3. Avaliar *in silico* alguns dos compostos presentes nos chás que apresentarem *in vitro* atividade inibidora de urease.
4. Avaliar *in silico* alguns dos compostos presentes nos chás que apresentarem *in vitro* atividade inibidora de acetilcolinesterase.
5. Realizar estudos de ancoragem molecular para fundamentar a explicação, em termos moleculares, das atividades inibidoras de urease e de acetilcolinesterase observadas *in vitro*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Chás

Buscando uma maior expectativa de vida, a sociedade tem se tornado cada vez mais saudável, procurando mudar sua rotina, dieta e padrão de vida. Uma das vertentes que tem ganhado força na dieta moderna é a ingestão de alimentos funcionais que são apresentados como alimentos comuns em uma dieta convencional. Alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, com a capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra diversas doenças (CÂNDIDO; CAMPOS, 2005).

Os chás são considerados alimentos funcionais devido às suas várias propriedades medicinais. São preparados por infusões de plantas e possuem características agradáveis como aroma e sabor, o que contribuiu para a popularização dessa bebida (BRAIBANTE *et al.*, 2014).

A principal origem relatada sobre os chás é uma lenda que diz respeito ao imperador Sheng Nung na China em 2.375 a.C. A lenda conta que o imperador mandava ferver toda água que tomava e, em um dia, deitado à sombra de um arbusto, acabou adormecendo e uma brisa fez algumas folhas caírem na taça com a água ainda quente, resultando em chá (SCHMITZ *et al.*, 2005).

No Brasil, a cultura do chá foi introduzida no Rio de Janeiro por D. João VI e espalhou-se para Minas Gerais, São Paulo e Paraná (OSAWA, 1990). Atualmente, a principal região produtora do chá no Brasil é o Vale do Ribeira, em São Paulo (SP), sendo a colonização japonesa a grande responsável pela expansão dessa cultura na região (VALENZUELA *et al.*, 2004).

Os benefícios do consumo de chá para a saúde estão relacionados às propriedades antioxidantes de seus componentes, que atuam como eliminadores de radicais livres de oxigênio protegendo o ácido nucléico, as proteínas e as estruturas lipídicas. No entanto, existem estudos epidemiológicos sobre outras propriedades medicinais importantes dos chás, como: ação antiinflamatória, antialérgica, anticarcinogênica e capacidade de se complexar com macromoléculas (proteínas e polissacarídeos) (BRAIBANTE *et al.*, 2014).

Essas propriedades medicinais devem-se à presença de substâncias com propriedades específicas em sua composição química, como compostos

biologicamente ativos. Um exemplo desses compostos presentes nos chás, são: flavonóides, catequinas, polifenóis, alcalóides, vitaminas e sais minerais (SCHMITZ *et al.*, 2005).

As flores secas de camomila (*Matricaria chamomilla*) são muito procuradas para seu uso em chá, uma vez que essa erva já usada como base de remédios no antigo Egito. A camomila é usada principalmente como um antiinflamatório e anti-séptico, também antiespasmódico e levemente sudorífico. Onze compostos fenólicos bioativos, como herniarina e umbeliferona (cumarina), ácido clorogênico e ácido caféico (fenilpropanóides), apigenina, luteolina e luteolina-7-O-glicosídeo (flavonas), quercetina e rutina (flavonóis) e naringenina (flavanona) são encontrados no extrato de camomila (GUPTA *et al.*, 2010).

A erva doce (*Pimpinella anisum*) é uma erva anual e uma planta gramínea com flores brancas e pequenas sementes verdes e amarelas, comumente encontradas em países como Turquia, Irã, Índia e Egito. Ela possui como propriedades terapêuticas a capacidade de inibição da fermentação intestinal, carminativa, antiespasmódica, antifúngica, antimicrobiana, anticonvulsivante, antiinflamatório, antioxidante e analgésico. Estudos químicos demonstraram que a camomila contém anetol, estragol, eugenol, pseudoisoeugenol, anisaldeído, cumarinas, escopoletina, estróis, hidrocarbonetos de terpeno, polienos e poliacetilenos como os compostos principais (SHOJAI; ABDOLLAHI FARD, 2012).

Folhas, flores e caules de hortelã (*Mentha spicata*) são freqüentemente usados em chás de ervas ou como aditivos em alimentos para oferecer aroma e sabor. Além disso, *M. spicata* tem sido usado como remédio popular devido às suas atividades antiinflamatória, antioxidante, carminativa, antiemética, diaforética, antiespasmódica, analgésica e estimulante. Os compostos flavonóides mais comumente encontrados são as catequinas, epicatequinas, rutinas, mirecitas, apigeninas e naringeninas. Alguns ácidos fenólicos são comumente encontrados, como a eriocitrina, glicosídeo de luteolina, ácido rosmarínico e ácido caféico (BOUKHEBTI *et al.*, 2011).

Originária da região Sul da Europa, a erva cidreira (*Melissa officinalis*) é uma erva perene e possui odor semelhante ao do limão. Apresenta os compostos  $\alpha$  e  $\beta$  citral como majoritários, sendo estes os de maior interesse pelas indústrias farmacêuticas devido à atividade antioxidativa, antimicótica, antifúngica, sedativa e antivirótica. Outros compostos encontrados são: citronela,  $\beta$ -cariofileno, germacreno



D, ocimeno e citronelol. Além dessas propriedades, a hortelã também é antiespasmódica, carminativa e antidepressiva (REIS *et al.*, 2009).

O boldo (*Peumus boldus*) é uma planta encontrada naturalmente em vários climas, desde as áreas quentes e áridas até as frias e chuvosas. Os compostos ativos do boldo incluem alcalóides, flavonóides e outros. A boldina e catequina são os principais componentes das frações alcalóide e flavonóide, respectivamente. Apresenta como propriedades terapêuticas a capacidade eupéptica, colagoga, colerética e diurética. Também é utilizada por possuir atividade anti-inflamatória (PETIGNY *et al.*, 2013).

A *Camellia sinensis*, um arbusto nativo da China, é, depois da água, uma das bebidas não alcoólicas mais consumidas no mundo. Atualmente é cultivada em mais de 30 países tropicais e subtropicais e o significado do seu nome científico em latim é camélia da China, já que possui flores parecidas com as das camélias (Figura 1) (LIMA *et al.*, 2009).

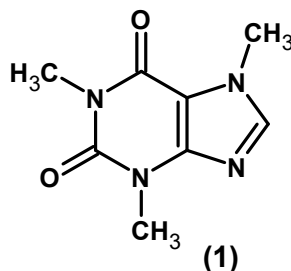
**Figura 1** - Foto da *Camellia sinensis*.



Fonte: Brissago (2013).

A *C. sinensis* apresenta uma composição química complexa (polifenóis, alcaloides, minerais etc.), porém, uma característica importante dos chás provenientes desta erva é que todos apresentam cafeína (**1**) em sua composição química. A cafeína, da classe dos alcalóides, é considerada um estimulante da atividade cardiovascular e da circulação sanguínea. Além de contribuir para efeito estimulante, a cafeína forma complexo com teaflavinas, que modifica o sabor, adicionando frescor à bebida e contribuindo para formação de um precipitado colorido (BRAIBANTE *et al.*, 2014).

**Figura 2** - Estrutura química da cafeína (1).



Fonte: Autoria própria (2021).

Dependendo do processo de produção utilizado, suas folhas são a base para a produção de dois principais tipos de chás: chá verde e preto, sendo que a diferença entre estes depende do grau de inativação das enzimas foliares durante o processamento. O chá verde é produzido das folhas frescas da planta, após uma rápida inativação da enzima polifenol oxidase, pelo emprego de vaporização e secagem, o que mantém preservado seu teor de polifenóis e o torna mais rico em catequinas que os demais. O chá preto é derivado de folhas envelhecidas pela oxidação aeróbica das catequinas, catalisada enzimaticamente (CABRERA *et al.*, 2006).

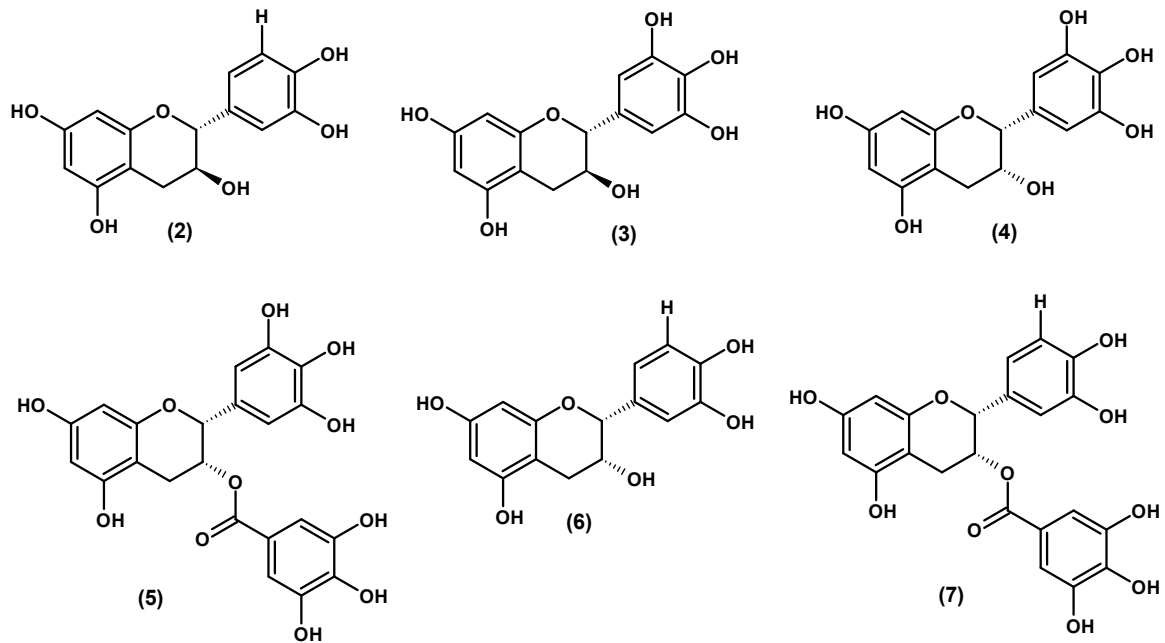
Os flavonóides são os principais componentes químicos terapêuticos da planta *C. sinensis*. Os flavonóides possuem atividade antioxidante, anticarcinogênica, antiinflamatória, antiaterogênica, hipoglicemiantes, antibacterianas e antivirais. Dentre os flavonóides, os mais encontradas na erva são: a catequina (2), galocatequina (3), epigalocatequina (4), galato de epigalocatequina (5), epicatequina (6) e galato de epicatequina (7) (SENGER *et al.*, 2010).

Leung *et al.* (2001) verificaram que, durante a produção do chá preto, ocorre a dimerização e a oxidação de catequinas, levando a formação de pigmentos laranja-avermelhados conhecidos como teaflavinas. Tais como, teaflavina (8), teaflavina 3-galato (9), teaflavina 3'-galato (10) e teaflavina 3,3'-digalato (11). Dentre as suas atividades, podemos citar seu poder antioxidante e antiinflamatório.

Apesar dos dois tipos de chá provenientes da *Camellia sinensis* apresentarem diferenças em sua composição química, ambos possuem como compostos secundários. O ácido gálico (12) e alguns flavonóides, como a quercetina (13) e o kaempferol (14), ambos glicosilados (BRAIBANTE *et al.*, 2014). Esses flavonóides

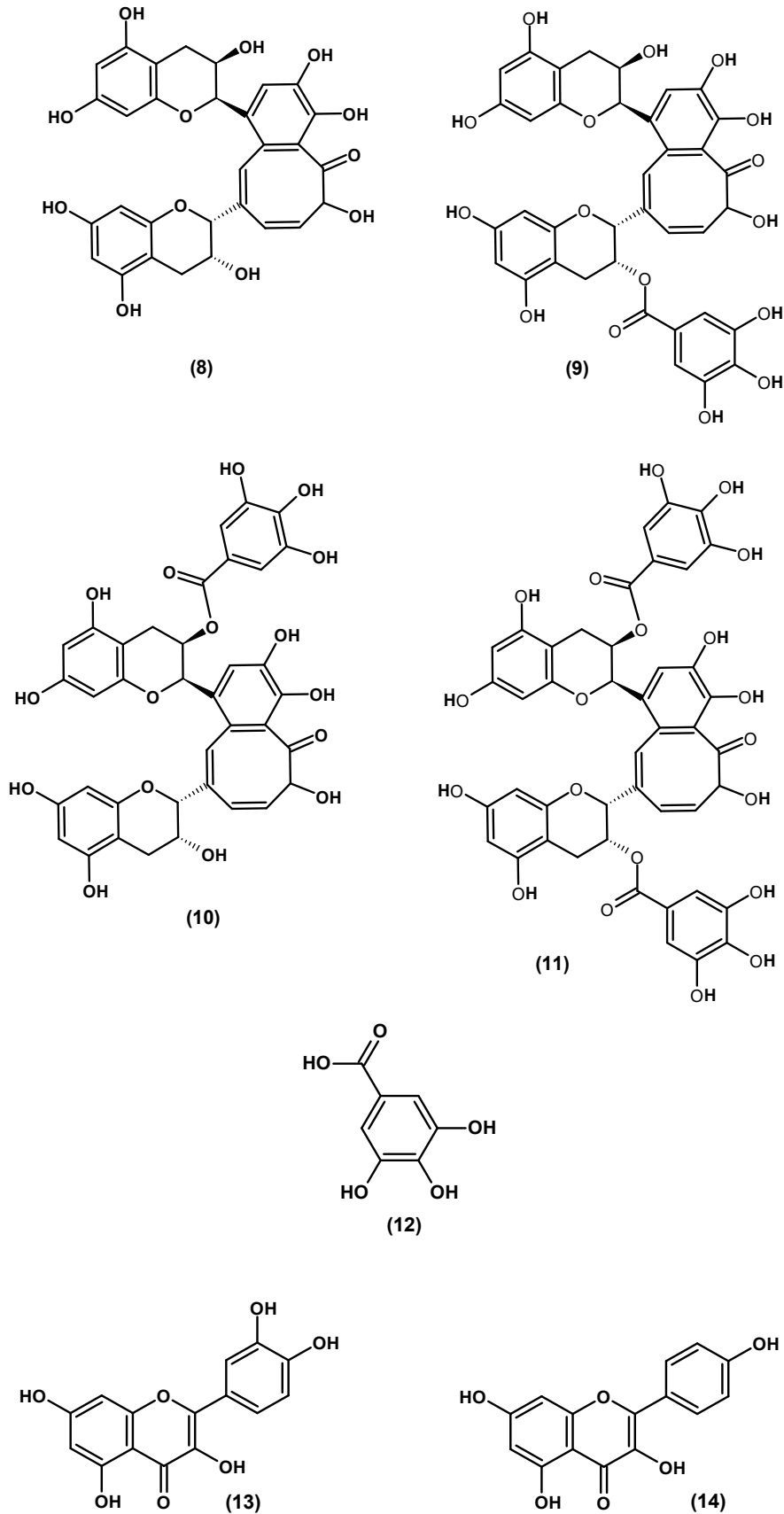
(quercetina e kaempferol) inibem a oxidação do LDL por permitir a regeneração dos tocoferóis, antioxidantes naturais dessas lipoproteínas.

**Figura 3** - Estruturas químicas da catequina (2), galocatequina (3), epigalocatequina (4), galato de epigalocatequina (5), epicatequina (6) e galato de epicatequina (7).



Fonte: Autoria própria (2021).

**Figura 4** - Estruturas químicas da teaflavina (8), teaflavina 3-galato (9), teaflavina 3'-galato (10), teaflavina 3,3'-digalato (11), ácido gálico (12), quercetina (13) e kaempferol (14).



Fonte: Autoria própria (2021).

Além do poder antioxidante, a quercetina junto com as clorofilas contribuem para a coloração verde do chá verde (VALENZUELA *et al.*, 2004).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*), planta da família Aquifoliaceae, é originária da América do Sul e é amplamente consumida em países como Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. A produção brasileira de erva-mate (**Figura 5**) destina-se ao consumo na forma de bebidas como chimarrão, chá e tererê (EFING *et al.*, 2009).

**Figura 5** - Foto da *Ilex paraguariensis*.



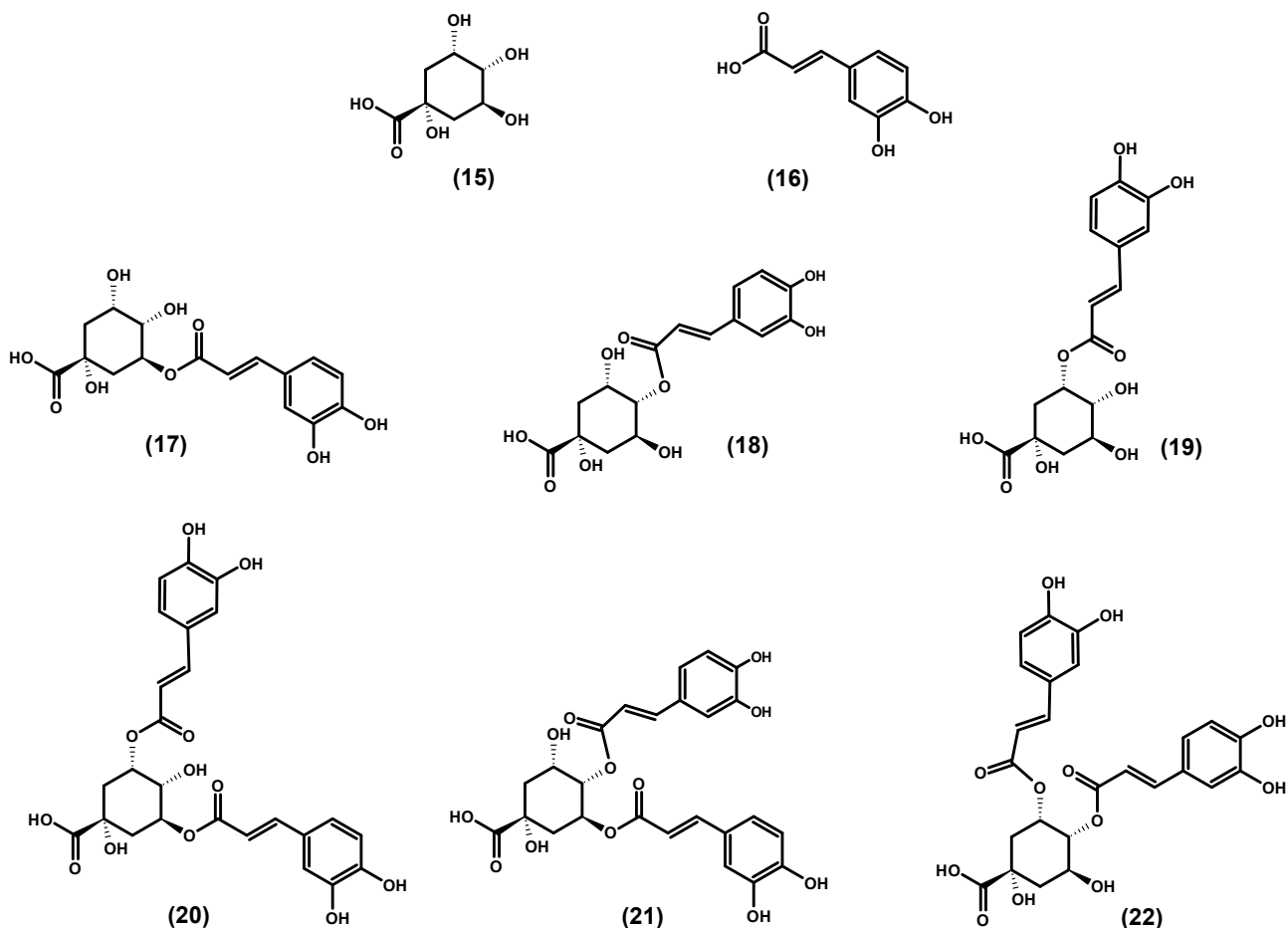
Fonte: AEN (2019).

Devido à sua diversidade química, o consumo das bebidas da erva-mate pode ser benéfico à saúde, visto sua comprovada atividade antioxidante, antimutagênica, antiinflamatória e hipolipemiante (BRAVO *et al.*, 2007).

Alguma dessas atividades são atribuídas aos ácidos orgânicos, tais como o ácido gálico (**12**), um dos quatro compostos majoritários da erva mate.

O poliol ácido quínino (**15**) e os ácidos fenólicos também devem ser citados como compostos bioativos, como o ácido cafeico (**16**), ácido 3-cafeoilquínico (**17**), ácido 4-cafeoilquínico (**18**), ácido 5-cafeoilquínico ou ácido clorogênico (**19**), ácido 3,5 cafeoilquínico (**20**), 3,4-ácido cafeoilquínico (**21**) e o 4,5-ácido cafeoilquínico (**22**) (CROGE *et al.*, 2021).

**Figura 6** - Estruturas químicas do ácido quínico (15), ácido cafeico (16), ácido 3-cafeoilquínico (17), ácido 4-cafeoilquínico (18), ácido clorogênico (19), ácido 3,5-cafeoilquínico (20), 3,4- ácido cafeoilquínico (21) e 4,5-ácido cafeoilquínico (22).

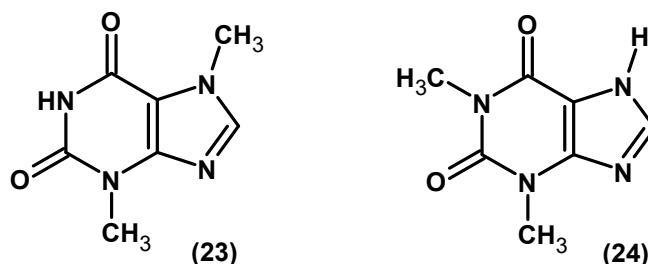


Fonte: Autoria própria (2021).

Os níveis de polifenóis dos extratos de *Ilex paraguariensis* são superiores ao de *C. sinensis*, sendo especialmente ricos em ácidos clorogênicos, que são poderosos antioxidantes eliminadores de radicais livres e metais, além de interferir na absorção de glicose (BRACESCO *et al.*, 2011).

Além disso, a teobromina (23) e a teofilina (24) são importantes componentes ativos da erva-mate, conhecidos como metilxantinas. Essas metilxantinas têm em comum o efeito estimulante do sistema nervoso central e sistema cardiovascular (KONIECZYNSKI *et al.*, 2017).

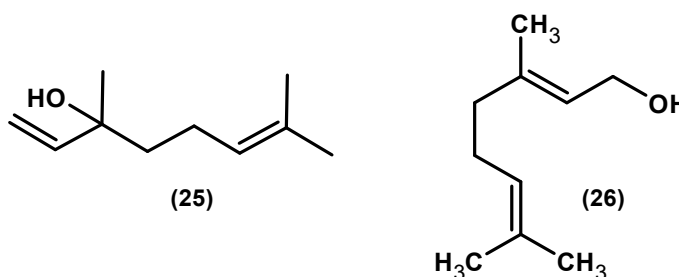
**Figura 7** - Estruturas químicas da teobromina (23) e teofilina (24).



Fonte: Autoria própria (2021).

Valduga (1994) em seu estudo identificou os compostos linalol (25) e geraniol (26) nas folhas de erva-mate e comprovou a atividade antibactericida desses compostos contra o *Streptococcus mutans*, uma das bactérias responsáveis pelas cáries dentárias.

**Figura 8** - Estruturas químicas do linalol (25) e geraniol (26).



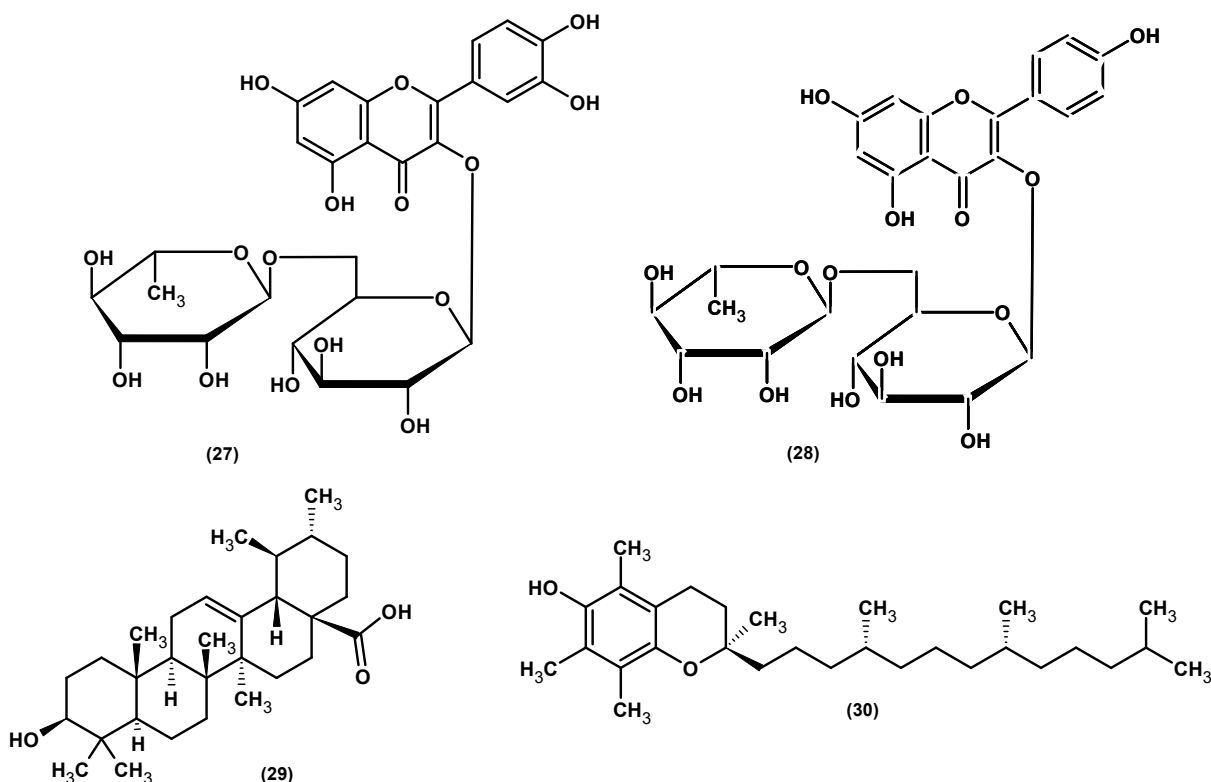
Fonte: Autoria própria (2021).

Flavonóides presentes nas folhas de *Ilex paraguariensis* como a rutina (27) e o kaempferol-3-o-rutinosídeo (28) possuem alguns efeitos farmacológicos, como a redução do apetite, atividade anticarcinogênica e antimutagênica (JACQUES, 2005).

Os compostos triterpenóides pentacíclicos naturais, como o ácido ursólico (29) estão presentes na erva mate e possuem importantes propriedades biológicas e farmacológicas, como atividades anti-HIV, hepatoprotetoras, antiinflamatórias, citotóxicas e antimicrobianas (GNOATTO *et al.*, 2008).

Outro importante composto presente na *Ilex paraguariensis* é o tocoferol ou vitamina E (30). Essa substância é conhecida como agente redutor, pois protege os tecidos do excesso de compostos com potencial oxidativo, sendo comumente mencionados como antioxidantes. Por isso, é associado também à prevenção do câncer, de doenças cardiovasculares e inflamatórias (POTRICKOS *et al.*, 2013).

**Figura 9** - Estruturas químicas da rutina (27), kaempferol-3-o-rutinosídeo (28), ácido ursólico (29) e tocoferol (30).



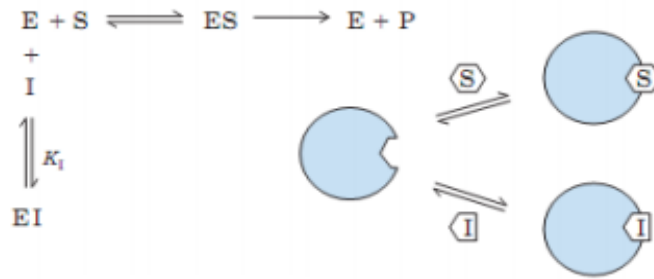
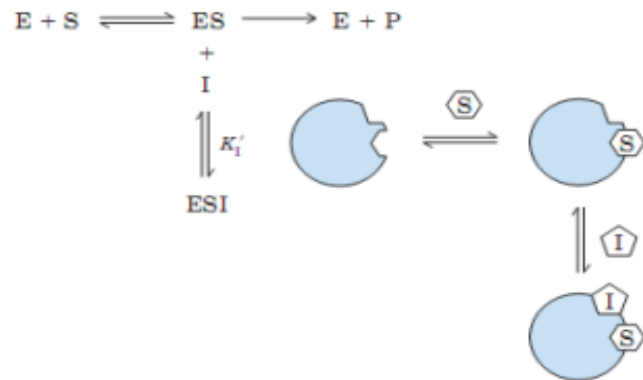
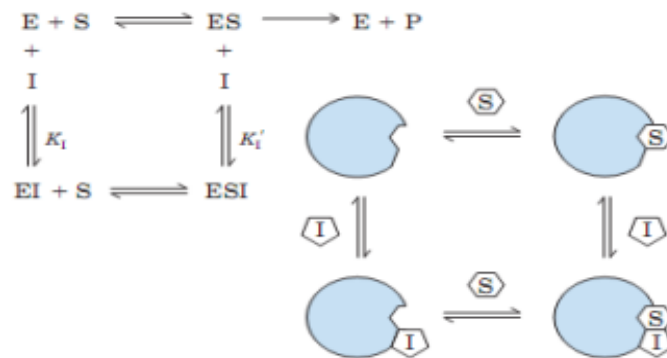
Fonte: Autoria própria (2021).

## 3.2 Inibição Enzimática

### 3.2.1 Inibição Reversível

Três classes de inibidores reversíveis são descritas: *competitivo*, *não-competitivo* e *incompetitivo*. *Inibidores competitivos* são substâncias que competem diretamente com o substrato normal pelo sítio ativo das enzimas formando o complexo enzima-inibidor (EI), sendo moléculas estruturalmente semelhantes ao substrato. O *inibidor não-competitivo* se liga tanto à enzima quanto ao complexo (ES) em um sítio diferente do sítio de ligação do substrato, não bloqueando a ligação do substrato, mas provocando uma modificação da conformação da enzima que evita a formação de produto. Já na *inibição incompetitiva*, o inibidor liga-se apenas ao complexo ES da enzima originando um complexo inativo (ESI) (LEHNINGER, 2003). Diagrama de inibição reversível está apresentado na **Figura 10**.



**Figura 10** - Diagramas de inibição reversível.**(a) Inibição competitiva****(b) Inibição incompetitiva****(c) Inibição não-competitiva**

Fonte: Lehninger (2003).

### 3.2.2 Inibição irreversível

A inibição irreversível torna a enzima inativa, envolvendo uma modificação covalente e permanente do grupo funcional necessário para a catálise. Um exemplo disto são alguns pesticidas, que inibem o sítio ativo da acetilcolinesterase impedindo a hidrólise da acetilcolina na sinapse, resultando na paralisia dos músculos respiratórios e edema pulmonar nos seres humanos (MOTTA, 2003).

### 3.3 Urease e a *Helicobacter pylori*

Urease é uma enzima que catalisa a conversão de uréia em amônia e ácido carbônico e posteriormente em bicarbonato. São enzimas dependentes de níquel e estão amplamente distribuídas nos reinos Fungi, Monera e Plantae (UPADHYAY, 2012).

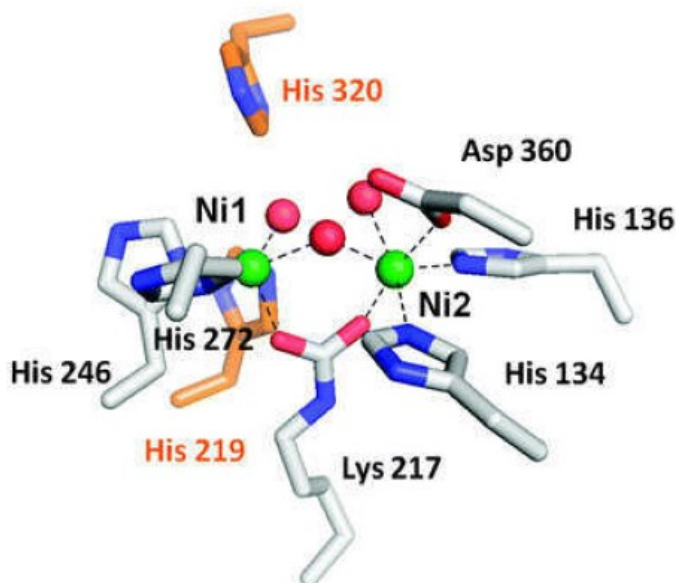
Vários estudos bioquímicos acerca de ureases se concentram na determinação da estrutura do cristal, no sítio ativo no qual os íons níquel estão presentes e na interação com inibidores. Um exemplo disto é nos ambientes agrícolas, onde ocorre a rápida hidrólise da ureia presente no fertilizante por bactérias presentes no solo, causando danos às plantas devido a volatilização da amônia. Isso ocorre devido às bactérias e os fungos serem os principais produtores de urease (QIN *et al.*, 2002).

Guerra (2013) afirma que a urease produzida pela *Helicobacter pylori* é considerada um fator de virulência, visto que sua atividade catalítica faz com que o pH se eleve, possibilitando sua sobrevivência no estômago. Porém, segundo Silva (2009), os testes rápidos para a identificação da *H. pylori* são invasivos, sendo coletadas amostras da mucosa gástrica do paciente por meio de endoscopia.

Para resolver os problemas apontados nos dois casos acima, várias pesquisas têm sido realizadas visando a obtenção de inibidores da enzima urease. Para isso, é necessário, em primeiro lugar, conhecer a estrutura tridimensional da enzima, assim como o mecanismo de ação.

Os principais resíduos de aminoácidos encontrados no sítio ativo da urease isolada de *H. pylori* são: His136, His138, Lys219, His248, His274 e Asp362. Esses resíduos interagem com os dois íons níquel, ureia e com uma molécula de água no interior do sítio ativo, sendo o resíduo His322 atuando como base da catálise (**Figura 11**). Este último ativa uma molécula de água ligada a um íon níquel, enquanto o resíduo His221 auxilia a ureia a se ligar em O-coordenação ao outro íon níquel. O resultado é um intermediário tetraédrico ligado em ponte aos dois íons níquel. Com um próton sendo transferido, ocorre a liberação de amônia e carbamato. O último composto resultante se decompõe em amônia e ácido carbônico na presença de água (SILVA, 2015).

**Figura 11** - Sítio ativo da enzima urease ilustrando os resíduos de aminoácidos envolvidos na hidrólise da ureia.



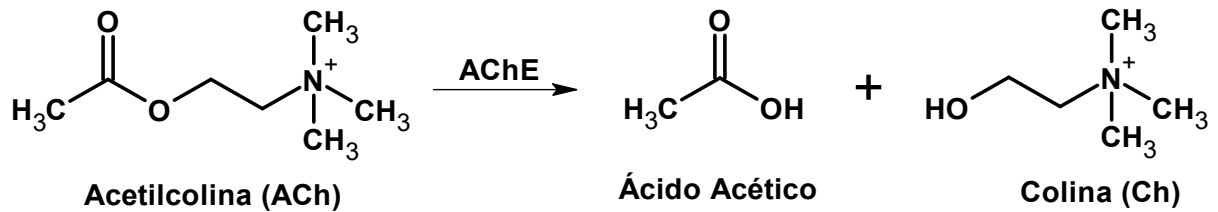
Fonte: Carter *et al.* (2009).

As plantas são outras possíveis fontes naturais de urease, sendo a soja (*Glycine max*) uma das mais estudadas até o momento. Estudos apontam que a urease da soja e da *H. pylori* possuem estruturas tridimensionais semelhantes (LAPROTOX, 2014). Lodhi *et al.* (2015) verificou, por exemplo, que a região ao redor do sítio ativo da urease isolada de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) possui os mesmos resíduos de aminoácidos que a urease de *H. pylori*.

### 3.4 Acetilcolinesterase e a Doença de Alzheimer

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que finaliza o processo de sinapse colinérgica, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina (ACh). As colinesterases estão presentes nas sinapses colinérgicas e são responsáveis por catalisar a hidrólise da ACh em ácido acético e colina (**Figura 12**) na fenda sináptica, permitindo que o neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso após ser ativado (ČOLOVIĆ *et al.*, 2013).

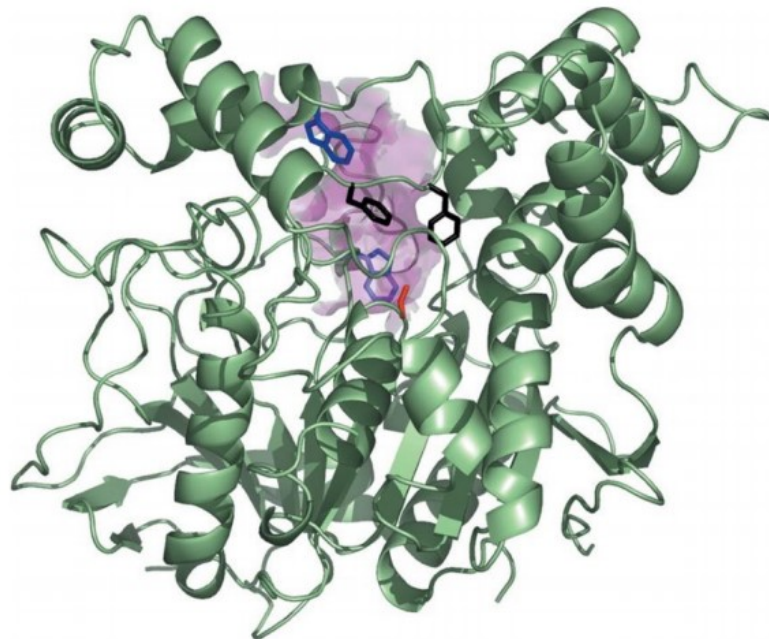
**Figura 12** - Hidrólise da Acetilcolina pela Acetilcolinesterase (AChE).



Fonte: Autoria própria (2021).

A AChE têm capacidade de hidrolisar até  $6 \times 10^5$  moléculas de ACh por molécula de enzima, por minuto. O sítio ativo da AChE é constituído, entre outros, por três resíduos principais de aminoácidos, que são: a serina (Ser200), a histidina (His440) e o ácido glutâmico (Glu327). O sítio ativo se situa na parte inferior de um estreitamento semelhante a uma garganta (*gorge*), onde existem 14 resíduos de aminoácidos, importantes na orientação do substrato ao sítio ativo (**Figura 13**). O grupo carbonílico e o amônio quaternário da ACh se ligam a dois subsítios da enzima, um esterásico e um de ligação de colina, respectivamente. Este segundo sítio é chamado de periférico, por estar distante do sítio ativo (RODRIGUES, 2018).

**Figura 13** - Estrutura tridimensional da AChE com a entrada do sítio ativo no topo.



Fonte: Silman e Sussman (2005).

A ACh é uma substância que está presente em todos os neurônios motores e que participa na junção neuromuscular, sendo um dos principais neurotransmissores

da formação reticular que controla o ciclo do sono e o despertar. A síntese ocorre no citoplasma nos terminais dos axônios a partir dos seus precursores: colina e acetil coenzima A (AcetilCoA), em uma reação mediada pela acetilcolina transferase. A colina utilizada nessa síntese deve prover da alimentação ou da própria degradação da ACh, uma vez que o organismo não produz essa substância (SIEGELBAUM; KANDEL *et al.*, 2008).

Sámano *et al.* (2012) afirma que os neurotransmissores são mensageiros químicos capazes de transmitir, modular e amplificar sinais (informação) entre neurônios e outras células do organismo, sendo a ACh um desses neurotransmissores. A não funcionalidade desse neurotransmissor afeta a comunicação entre os neurônios, comprometendo o estado físico e mental do indivíduo.

A perda envolvendo esse neurotransmissore pode estar ligada diretamente a Doença de Alzheimer (DA), uma doença que se caracteriza por gerar um distúrbio progressivo da memória e outras funções cognitivas, afetando o funcionamento ocupacional e social. Outros dados neuropatológicos mais relevantes em pacientes de DA são a presença de atrofia cortical difusa, degeneração neurovascular, presença de placas senis extracelulares compostas de agregados filamentosos da proteína  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) e massas neurofibrilares intracelulares, formadas principalmente pela proteína *tau* (SERRANO-POZO *et al.*, 2011).

Os inibidores de colinesterases (I-ChE) são os principais fármacos licenciados para o tratamento específico da DA. Seu uso baseia-se na inibição das suas principais enzimas catalíticas, a acetil e a butirilcolinesterase, visando o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina (FORLENZA, 2005).

### **3.5 Estudo *in silico***

A termo *in silico* é relativamente recente e é mais utilizado na área de farmacologia, em estudos de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de medicamentos (TERSTAPPEN; REGGIANI, 2001). Os estudos de farmacologia *in silico* surgiram nos anos de 1970 com a proposta de utilizar métodos computacionais para simular um sistema biológico de um organismo complexo. É uma metodologia diferente das metodologias *in vitro* e *in vivo*, que são abordagens clássicas consolidadas e aceitas pela comunidade científica (SANT *et al.*, 2009).

Desse modo, o termo *in silico* é empregado no âmbito da Química Farmacêutica e Medicinal para designar estudos de farmacologia desenvolvidos por meio de ferramentas computacionais de bioinformática e quimioinformática, as quais possibilitam o cálculo de propriedades farmacológicas e toxicológicas de um composto candidato à fármaco, de modo a avaliar o potencial terapêutico dessa substância. Isso é fundamental em um processo de P&D otimizado já que implica na redução no número de testes experimentais, diminuindo os custos e o tempo de execução do projeto (LOMBARDINO; LOWE, 2004).

Um parâmetro muito utilizado em estudos *in silico* são as propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade), fundamentais no planejamento de novos fármacos. Nesta etapa também é importante a predição dos possíveis metabólitos e suas toxicidades, uma vez que estes influenciam no quadro toxicológico de medicamento. Algumas ferramentas são muito utilizadas nesses estudos, como o *ACD/ChemSketch*, *Molinspiration*, *Swiss Target Prediction*, *iGEMDOCK*, *admetSAR* e o *MetaTox* (LAGORCE *et al.*, 2017).

Dentro da Ciência dos Alimentos, as metodologias *in silico* são comumente restritos a análises estatísticas, relação estrutura-atividade e relações quantitativas estrutura-atividade, com base na suposição de que a estrutura química ou (sub) estrutura tem propriedades que podem ser associadas a uma atividade biológicas (CAVALIERE; COZZINI, 2018).

Um avanço na pesquisa de enzimas alimentares está fornecendo percepções mais profundas sobre a função enzimática e permitindo o desenvolvimento de novas enzimas alimentares aprimoradas usando combinações de métodos *in silico* e métodos experimentais convencionais. O *docking molecular* e a simulação de dinâmica molecular estão sendo usadas acompanhadas pela expansão dos bancos de dados biológicos e melhoria da capacidade computacional. Eles estão desempenhando um papel significativo na investigação de processos catalíticos, descobrindo novas enzimas, analisando substratos, produtos ou inibidores e ajudando no desenvolvimento de estratégias eficazes para imobilização ou inativação de enzimas alimentares no bioprocessamento alimentar relacionado a enzimas (ZHANG *et al.*, 2020).

Outra área que vem utilizando mais ferramentas *in silico* dentro da Ciência de Alimentos são os estudos toxicológicos e alergênicos. Os estudos toxicológicos mais citados são para aditivos alimentares e para contaminação externa, como pesticidas

e poluentes ambientais. Já em relação ao alérgenos alimentares, análises anteriores indicaram que a maioria pertence a apenas um pequeno número de superfamílias de proteínas, contribuindo para o desenvolvimento de uma abordagem mais molecular para a classificação de alérgenos alimentares e facilitando a aplicação de abordagens *in silico* (JENKINS *et al.*, 2005).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados neste trabalho apresentaram pureza analítica.

### 4.2 Preparo dos chás

Utilizou-se oito tipos de chás, adquiridos em um supermercado na cidade de Campo Mourão, Paraná: (i) chás Preto (*Camellia sinensis*), Erva Doce (*Pimpinella anisum*), Verde (*Camellia sinensis*) e Hortelã (*Mentha spicata*) da marca Dr. Oetker; (ii) chás de Boldo (*Peumus boldus*), Camomila (*Matricaria chamomilla*) e Capim Cidreira (*Melissa officinalis*) da marca Chá Prenda; (iii) chá Mate (*Ilex paraguariensis*) da marca Matte Leão.

Para o preparo dos chás utilizou-se 240 mL de água mineral previamente aquecida até próximo ao ponto de ebulição. Após o aquecimento, os sachês foram mantidos em infusão por 5 minutos. Após o tempo indicado, o sachê foi retirado da solução, onde foi reservado até atingir a temperatura ambiente.

### 4.3 Preparo do extrato de urease

Para a obtenção do extrato enriquecido em urease, 10 gramas de soja (adquirida em mercado local em Campo Mourão, Paraná) foram trituradas em um liquidificador com 100 mL de água destilada por 5 minutos. Após a trituração, o extrato foi filtrado em papel filtro e diluído em um fator de 500, sendo esse o extrato final obtido para as análises.

### 4.4 Teste *in vitro* para a inibição da urease

A determinação da atividade inibidora da urease seguiu o procedimento proposto por Weatherburn (1967). O reagente A foi preparado dissolvendo 2,5 gramas de fenol e 12,5 mg de nitroprussiato de sódio em água destilada (q.s.p. 250 mL). O reagente B foi preparado dissolvendo 1,25 gramas de hidróxido de sódio e 1,05 mL de hipoclorito de sódio (10%) em água destilada (q.s.p. 250 mL).

Em tubos de ensaio foram colocados 200 µL de solução urease e 200 µL dos chás, sendo mantido em banho-maria à 37 °C por 20 minutos. Após o contato, foi adicionado 200 µL de ureia 6 g/L, sendo mantido por mais 20 minutos em banho-maria. Após o tempo indicado, foram adicionados 1000 µL do reagente A e 1000 µL



do reagente B, sendo novamente mantido por mais 20 minutos em banho-maria. Para o controle, foi adicionado 200 µL de água destilada ao invés dos chás, sendo repetido todos os procedimentos acima. O padrão de inibição utilizado foi a tiourea (200 ppm). Ao término dos procedimentos, foi realizado leituras em um espectrofotômetro UV-Vis (*PG Instruments*, modelo T70+) no comprimento de onda de 630 nm. Os valores de absorção foram convertidos em porcentagem de inibição de urease, utilizando a Equação 1:

$$I(\%) = 100 - \left[ \left( \frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \right) * 100 \right] \quad (\text{Equação 1})$$

na qual:

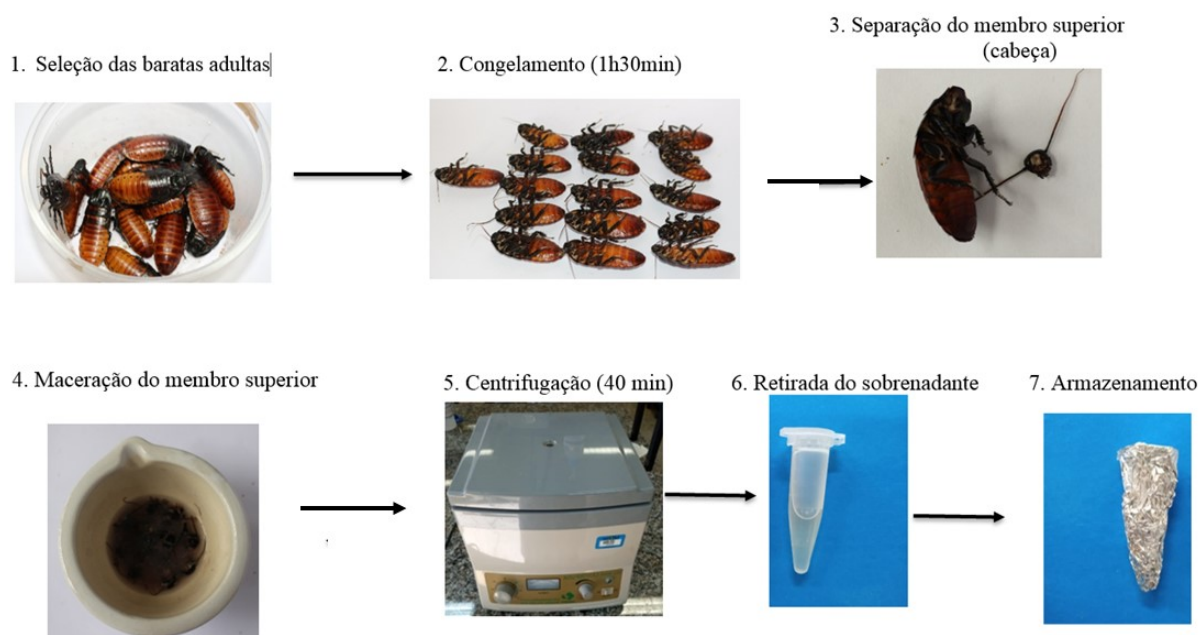
$A_{amostra}$ : Valor da absorção apresentado no teste com o chá;

$A_{controle}$ : Valor da absorção apresentado no teste com o controle.

#### 4.5 Preparo do extrato de acetilcolinesterase

Para a obtenção do extrato enriquecido em acetilcolinesterase, foram utilizadas baratas da espécie *Gromphadorhina portentosa*, popularmente conhecida como barata de Madagascar, adquiridas do criador Ozório Gonçalves. Para isso utilizou-se a metodologia adaptada de Nogueira (2015). Alguns espécimes de baratas foram colocadas no congelador por 45 minutos, seguida da remoção da cabeça e antenas com o auxílio de estilete e pinça. O extrato bruto foi obtido a partir da maceração das cabeças utilizando solução tampão Tris-HCl 0,5M pH 7,5. O material foi agitado utilizando vortex e posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 35 min. O sobrenadante obtido nesse processo foi utilizado como extrato enriquecido em acetilcolinesterase. Após o procedimento, o extrato foi diluído na proporção 1:50 utilizando a solução tampão Tris-HCl, sendo esse o extrato final obtido para as análises. A Figura 14 demonstra o esquema para extração da enzima acetilcolinesterase.

**Figura 14** - Processo de obtenção do extrato bruto rico em acetilcolinesterase.



Fonte: Autoria própria (2021).

#### 4.6 Testes *in vitro* para a inibição da acetilcolinesterase

Os testes de inibição da enzima acetilcolinesterase serão realizados a partir de adaptação do método colorimétrico de Hestrin (1949). Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  do extrato de acetilcolinesterase e 250  $\mu\text{L}$  dos chás. Essa mistura foi mantida em banho maria a 37°C, por 30 minutos. Após o tempo indicado será adicionado 250  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cloreto de acetilcolina 0,01 mol/L, deixando novamente em banho por 10 minutos. Após o tempo indicado, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de NaOH 3,5 mol/L e 500  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de hidroxilamina 2 mol/L. Após 5 minutos em contato no banho, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de HCl (1:1) e 500  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cloreto férrico 0,37 mol/L. Para o controle, foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de água destilada ao invés dos chás, sendo repetido todos os procedimentos acima. Ao término dos procedimentos, foi realizado leituras em um espectrofotômetro UV-Vis (*PG Instruments*, modelo T70+) no comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorção foram convertidos em porcentagem de inibição de AChE, utilizando a Equação 1.

#### 4.7 Ferramentas computacionais *in silico*

Existem diferentes ferramentas computacionais disponíveis na *web* para estudo *in silico*. Os *softwares* e servidores *online* que auxiliam a resolução de problemas químicos são conhecidos como ferramentas de quimioinformática.

**Modelagem das estruturas químicas:** o *ACD/ChemSketch* (<https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>) é um programa mantido pela empresa *ACD/Labs*. Ele permite o desenho e visualização em 2D e 3D de diferentes estruturas químicas, como estruturas orgânicas, organometálicas e polímeros, além de possibilitar o cálculo de propriedades moleculares (massa molar, volume, densidade, refratividade molar, log *P*, etc). Uma função importante desse programa em estudos computacionais é a geração de código *SMILES* de estruturas químicas. Neste trabalho, o *ChemSketch* foi utilizado para gerar as estruturas orgânicas das substâncias e o respectivo código *SMILES* (Tabela 1), bem como como na compilação das moléculas em formato “.*mol*”.

**Tabela 1** - Código e nome dos compostos, com seus respectivo código *SMILES*.

Código dos compostos	NOME	Código <i>SMILES</i>
1	Cafeína	<chem>O=C1c2n(C)cnc2N(C)C(=O)N1C</chem>
2	(+)-Catequina	<chem>Oc1ccc(cc1O)[C@H]1Oc2cc(O)cc(O)c2C[C@@H]1O</chem>
3	Galocatequina	<chem>Oc1cc(cc(O)c1O)[C@H]1Oc2cc(O)cc(O)c2C[C@@H]1O</chem>
4	(-)-Epigalocatequina	<chem>Oc1cc(cc(O)c1O)[C@H]1Oc2cc(O)cc(O)c2C[C@H]1O</chem>
5	(-)-Galato de Epigalocatequina	<chem>Oc1cc(cc(O)c1O)C(=O)O[C@@H]1Cc2c(cc(O)cc2O)O[C@@H]1c1cc(O)c(O)c(O)c1</chem>
6	(-)-Epicatequina	<chem>Oc1ccc(cc1O)[C@H]1Oc2cc(O)cc(O)c2C[C@H]1O</chem>
7	(-)-Galato de Epicatequina	<chem>Oc1cc(cc(O)c1O)C(=O)O[C@@H]1Cc2c(cc(O)cc2O)O[C@@H]1c1ccc(O)c(O)c1</chem>
8	Teaflavina	<chem>Oc1cc(O)cc2O[C@@H]([C@H](O)Cc12)c1cc(O)c(O)c2C(=O)C(O)C=CC(=Cc12)[C@H]1Oc2cc(O)cc(O)c2C[C@H]1O</chem>
9	Teaflavina 3-galato	<chem>Oc1cc(cc(O)c1O)C(=O)O[C@@H]1Cc2c(cc(O)cc2O)O[C@@H]1C=1C=CC(O)C(=O)c2c(O)c(O)cc([C@H]3Oc4cc(O)cc(O)c4C[C@H]3O)c2C=1</chem>
10	Teaflavina 3'-galato	<chem>Oc1cc(cc(O)c1O)C(=O)O[C@@H]1Cc2c(O)cc(O)cc2O[C@@H]1c1cc(O)c(O)c2C(=O)C(O)C=CC(=Cc12)[C@H]1Oc2cc(O)cc(O)c2C[C@H]1O</chem>
11	Teaflavina 3,3'-digalato	<chem>Oc1cc(cc(O)c1O)C(=O)O[C@@H]1Cc2c(O)cc(O)cc2O[C@@H]1c1cc(O)c(O)c2C(=O)C(O)C=CC(=Cc12)[C@H]1Oc2cc(O)cc(O)c2C[C@H]1OC(=O)c1cc(O)c(O)c(O)c1</chem>
12	Ácido gálico	<chem>Oc1cc(cc(O)c1O)C(=O)O</chem>
13	Quercetina	<chem>Oc1ccc(cc1O)C=1Oc2cc(O)cc(O)c2C(=O)C=1O</chem>
14	Kaempferol	<chem>Oc1ccc(cc1)C=1Oc2cc(O)cc(O)c2C(=O)C=1O</chem>
15	Ácido Quínico	<chem>O[C@@]1(C[C@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)C1)C(=O)O</chem>
16	Ácido cafeico	<chem>Oc1ccc(/C=C/C(=O)O)cc1O</chem>
17	3-CQ: 3-ácido cafeoilquínico	<chem>O[C@H]1[C@@H](O)C[C@@](O)(C[C@@H]1OC(=O)/C=C/c1ccc(O)c(O)c1)C(=O)O</chem>

18	4-CQ: 4- ácido cafeoilquínico	<chem>O=C(O[C@H]1[C@@H](O)C[C@@](O)(C[C@@H]1O)C(=O)O)/C=C/c1ccc(O)c(O)c1</chem>
19	5-CQ: 5- ácido cafeoilquínico	<chem>O[C@@H]1[C@@H](O)C[C@](O)(C[C@@H]1OC(=O))/C=C/c1ccc(O)c(O)c1)C(=O)O</chem>
20	3,5-DQ: 3,5- ácido cafeoilquínico	<chem>O[C@H]1[C@H](C[C@@](O)(C[C@@H]1OC(=O))/C=C/c1ccc(O)c(O)c1)C(=O)O)OC(=O)/C=C/c1ccc(O)c(O)c1</chem>
21	3,4-DQ: 3,4- ácido cafeoilquínico	<chem>O=C(O[C@H]1[C@@H](O)C[C@@](O)(C[C@@H]1OC(=O))/C=C/c1ccc(O)c(O)c1)C(=O)O)/C=C/c1ccc(O)c(O)c1</chem>
22	4,5-DQ: 4,5- ácido cafeoilquínico	<chem>O=C(O[C@@H]1[C@@H](O)C[C@](O)(C[C@@H]1OC(=O))/C=C/c1ccc(O)c(O)c1)C(=O)O)/C=C/c1ccc(O)c(O)c1</chem>
23	Teobromina	<chem>Cn1cnc2c1C(=O)NC(=O)N2C</chem>
24	Teofilina	<chem>O=C1c2[NH]cnc2N(C)C(=O)N1C</chem>
25	Linalol	<chem>CC(O)(C=C)CC\C=C(\C)C</chem>
26	Geraniol	<chem>C\C(C)=C\C\C=C\C=C\O</chem>
27	Rutina	<chem>Oc1ccc(cc1O)C=1Oc2cc(O)cc(O)c2C(=O)C=1O[C@H]1OC(CO)[C@@H]2OC(C)[C@H](O)C(O)C2O)[C@@H](O)C(O)C1O</chem>
28	Kaempferol-3-rutinosídeo	<chem>Oc1ccc(cc1)C=1Oc2cc(O)cc(O)c2C(=O)C=1O[C@@H]1OC(CO)[C@@H]2OC(C)[C@H](O)C(O)C2O)[C@@H](O)C(O)C1O</chem>
29	Ácido ursólico	<chem>O=C(O)[C@]12CC[C@]3(C)C(=CC[C@H]4[C@@]3(C)CC[C@@H]3[C@]4(C)CC[C@H](O)C3(C)C)[C@@H]2[C@@H](C)[C@H](C)CC1</chem>
30	Tocoferol	<chem>CC(C)CCC[C@@H](C)CCC[C@@H](C)CCC[C@]1(C)CCc2c(O1)c(C)c(C)c(O)c2C</chem>

Fonte: Autoria própria (2021).

**Predição de propriedades moleculares e bioatividades:** na avaliação de propriedades moleculares e bioatividades foram utilizadas as ferramentas computacionais *Molinspiration* (<https://www.molinspiration.com/>) e *Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>).

O *Molinspiration* é um servidor *online* fundado em 1986 na Universidade de Bratislava, Eslováquia, e atualmente é domínio da empresa *Molinspiration Cheminformatics*, que trabalha com técnicas de quimioinformática voltadas à conexão com a *web*. A partir dessa ferramenta calculou-se algumas propriedades moleculares relacionadas à biodisponibilidade de substâncias administradas por via oral: miLogP (coeficiente de partição octanol-água); TPSA (área superfície polar topológica); MM (massa molar); nALH (número de aceptores de ligação de hidrogênio) e nDLH (número de doadores de ligação de hidrogênio) e nrotb (número de ligações rotativas). Segundo Lipinski *et al.* (1997) compostos que violam mais do que uma das “regra dos cinco” apresentarão problemas de biodisponibilidade se administrado por via oral: miLogP ≤ 5,00; TPSA ≤ 140; MM ≤ 500; nALH ≤ 10 e nDLH ≤ 5. Nessa ferramenta é possível calcular a predição de bioatividades por meio de um modelo matemático-estatístico. A probabilidade de uma molécula apresentar bioatividade para um determinado receptor alvo (ligante GPCR, modulador canal iônico, inibidor quinase, ligante receptor nuclear, inibidor protease e inibidor de enzimas) é maior para valores

de escore próximos de 0,0. Quando o valor é menor que -5,0 (escore < -5,0), a molécula é inativa, quando o valor é maior que 0,0, a molécula é ativa.

**Predição de propriedades farmacocinéticas:** o *admetSAR* (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2>) é um programa *online* de avaliação de propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) de compostos bioativos. Ele é mantido por pesquisadores da Universidade de Ciência e Tecnologia da China Oriental. As propriedades ADMET são muito importantes na pesquisa e desenvolvimento de fármacos, pois indicam se o medicamento chegará ao órgão-alvo para exercer seu efeito terapêutico. Neste estudo o *admetSAR* foi usado na predição das propriedades farmacocinéticas.

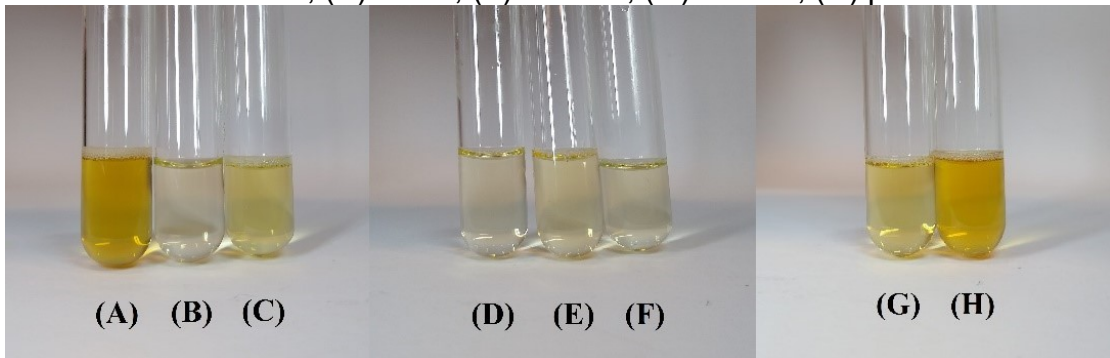
**Estudo de ancoragem molecular:** o *iGEMDOCK* (<http://gemdock.life.nctu.edu.tw/dock/igemdock.php>) foi usado nos estudos de ancoragem molecular junto com o *Chimera UCSF* (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). A técnica consiste na avaliação da interação de micromoléculas (tais como candidatos à fármacos e produtos naturais) com macromoléculas receptoras (tais como enzimas, proteínas e canais iônicos) para investigar o potencial de inibição dessas substâncias. O *iGEMDOCK* apesar de trabalhar com a simulação gráfica das interações ligante-receptor, a resolução pode ser inviável dependendo da análise. Para tanto, o programa *Chimera UCSF* será utilizado no estudo das interações dos compostos **1-30** com os resíduos de aminoácidos do receptor {urease (PDB: 6ZJA) e acetilcolinesterase (PDB: 4EY6)}.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Preparo dos chás

Na Figura 15 pode-se observar os aspectos visuais dos chás preparados a partir da metodologia descrita, mostrando a diferença de cor entre eles.

**Figura 15** - Aspectos visuais dos chás: (A) mate; (B) erva doce; (C) verde; (D) camomila; (E) boldo; (F) cidreira; (G) hortelã; (H) preto.



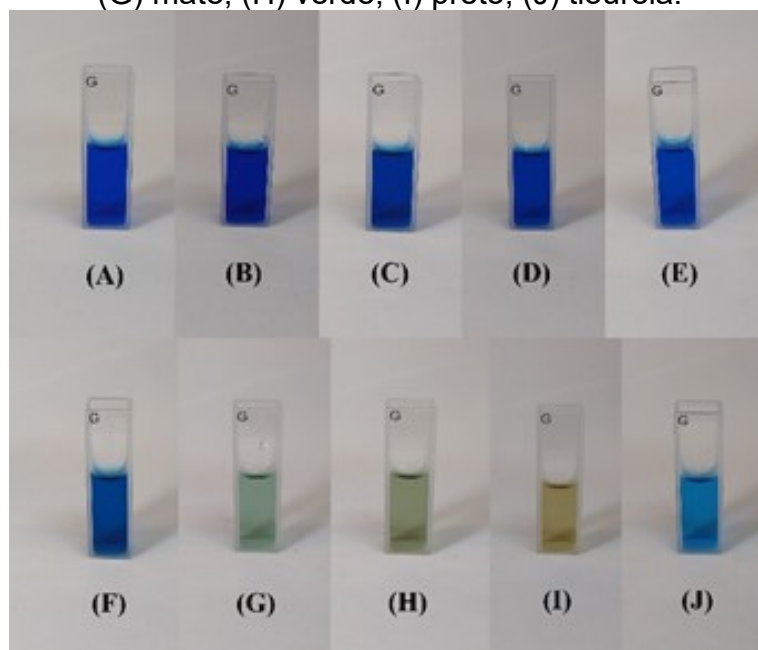
Fonte: Autoria própria (2021).

É possível observar uma cor mais acentuada nos chás mate e preto, característicos de sua composição. Já os chás de cidreira e verde apresentaram uma cor um pouco menos intensa em relação ao mate e o preto, porém apresentou uma cor mais intensa que os demais chás, que não mostraram grandes diferenças entre si.

### 5.2 Teste *in vitro* para a inibição da urease

Na **Figura 16** estão apresentados os aspectos visuais obtidos nos testes de inibição de urease com os oitos chás avaliados no presente trabalho.

**Figura 16** - Aspectos visuais observados nos testes de inibição da urease utilizando chás: (A) controle; (B) erva doce; (C) hortelã; (D) cidreira; (E) camomila; (F) boldo; (G) mate; (H) verde; (I) preto; (J) tiouréia.

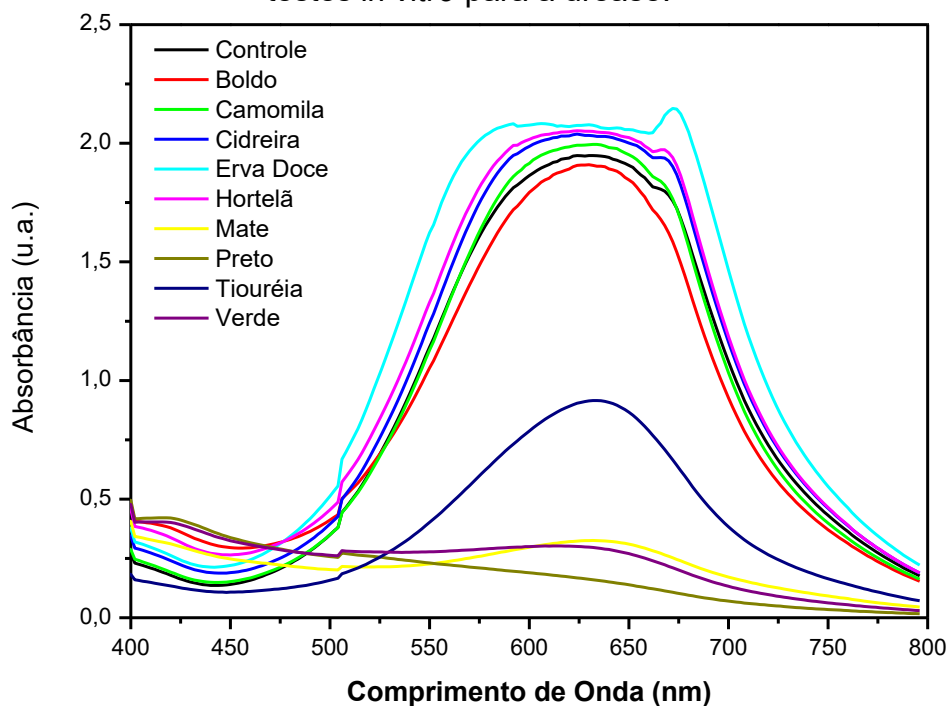


Fonte: Autoria própria (2021).

A **Figura 16** mostra que a maioria dos chás, ao serem submetidos ao teste de inibição urease, desenvolveram coloração azul, indicando que não houve inibição da urease. Os chás mate, verde e preto não desenvolveram a coloração azul característica do indofenol, indicando que são potenciais inibidores de urease.

Os espectros de absorção obtidos após a realização dos testes *in vitro* estão apresentados na **Figura 17**. Pode-se observar que, para a maioria dos chás os espectros de absorção possuem um perfil espectral semelhante ao controle. Para os chás mate, verde e preto observa-se que a absorção na região de 625 nm é inferior ao observado para a tiouréia, concordando com a observação visual relatada anteriormente.

**Figura 17** - Espectros de absorção, na região do ultravioleta-visível, obtidos após os testes *in vitro* para a urease.



Fonte: Autoria própria (2021).

Os valores de absorbância, no comprimento de onda de 630 nm, foram convertidos, utilizando a equação 1, em porcentagem de inibição de urease (**Tabela 2**).

**Tabela 2** - Absorbância e porcentagem inibitória de urease dos chás avaliados.

Amostras	Absorbância em 630 nm	I (%)
Controle	1,948	-
<i>Pimpinella anisum</i> (erva doce)	2,078	-
<i>Mentha spicata</i> (hortelã)	2,051	-
<i>Melissa officinalis</i> (cidreira)	2,033	-
<i>Matricaria chamomilla</i> (camomila)	1,994	-
<i>Peumus boldus</i> (boldo)	1,909	2,00
<b>Inibidor padrão (tioureia)</b>	<b>0,914</b>	<b>53,08</b>
<i>Ilex paraguariensis</i> (mate)	0,325	83,32
<i>Camellia sinensis</i> (verde)	0,297	84,75
<i>Camellia sinensis</i> (preto)	0,162	91,68

Fonte: Autoria própria (2021).

Os percentuais de inibição de urease obtidos para os chás mate (*Ilex paraguariensis*), verde e preto (*Camellia sinensis*), são maiores do que o observado para o inibidor padrão (tioureia), indicando que estes chás possuem substâncias químicas, capazes de inibir a enzima, em quantidade maior do que no teste com tioureia ou de forma mais eficiente do que esta substância.



Os resultados observados no presente trabalho são, na sequência, comparados aos dados disponíveis na literatura.

Uma investigação antibacteriana *in vitro* realizada contra *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni* mostrou que o óleo essencial de *Pimpinella anisum* é ineficaz contra ambas as bactérias (CWIKLA *et al.*, 2010).

Um estudo avaliou a suscetibilidade *in vitro* de 15 cepas de *H. pylori* a diferentes extratos vegetais, dentre eles, o extrato metanólico das folhas de *Mentha spicata*. O extrato de hortelã obteve uma fraca inibição, apresentando concentração mediana inibitória variando de 25 a 100 µg/mL (MAHADY *et al.*, 2005).

Os estudos descritos anteriormente indicam que *Pimpinella anisum* e *Mentha spicata* são, assim como observado no presente trabalho, ineficazes para a inibição da urease.

Em uma investigação *in vitro* observou-se que o óleo essencial de *M. officinalis* possui atividade anti-*H. pylori*. No entanto, a atividade observada foi dependente não apenas da composição do óleo essencial, mas também das propriedades da cepa. Contendo predominantemente óxido de geranial (25,1%), neral (19,4%) e óxido de cariofileno (10,6%), *M. officinalis* inibiu o crescimento de duas cepas de *H. pylori* a partir da concentração de 4 µL/mL (KNEZEVIC *et al.*, 2018).

Outra planta que apresenta alto efeito inibitório sobre a urease é a Camomila. Em um estudo *in vitro* utilizando o óleo essencial dessa planta observou-se inibição do crescimento de *H. pylori* em concentrações muito baixas (< 0,0075%). Os MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> relatados do extrato de óleo de *Matricaria chamomilla* para *H. pylori* foram 62,5 mg/mL e 125,0 mg/mL, respectivamente. Além disso, verificou-se a influência nas propriedades morfológicas e fermentativas dessa bactéria. É possível que os compostos ácidos graxos, cumarinas, terpenos, espiroéteres e flavonóides sejam responsáveis por estas alterações (WESELER *et al.*, 2005). [16].

Segundo Pastene *et al.* (2014), o extrato aquoso de *Peumus boldus* tem uma potente propriedade anti-*H. pylori* ao inibir a atividade da urease e sua adesão às células gástricas humanas. Em seu estudo, usando uma abordagem guiada por ensaios *in vitro* e *in vivo*, considerou que tais atividades estão associadas à presença de procianidinas oligoméricas. Esses compostos inibem a urease de *H. pylori* de uma maneira dependente da concentração, sendo uma inibição competitiva e reversível. Curiosamente, a inibição também resultou na dependência do flavan-3-ol que forma essas procianidinas.

Apesar de *M. officinalis* e *M. chamomilla* terem resultados positivos descritos na literatura para inibição de urease, no presente estudo encontrou-se uma fraca inibição para os chás dessas ervas. Esse fato pode estar relacionado ao método de extração, uma vez que a partir dos métodos de destilação obtêm-se substâncias com caráter apolar, enquanto a infusão ou maceração com água, por exemplo, produz extratos aquosos contendo, majoritariamente, substâncias com caráter polar. Além da possibilidade de ter compostos diferentes em ambas extrações, a concentração deles também pode ser diferente, podendo fazer com que o composto ativo que iniba a urease não esteja presente no extrato aquoso ou que ele esteja presente em uma pequena quantidade.

Já em relação ao *Peumus boldus*, o autor descreve uma metodologia e uma extração parecida com a utilizada neste artigo. Apesar da incoerência de resultados, a fraca inibição encontrada neste estudo pode ser explicada pela diversidade de métodos de crescimento, colheita, beneficiamento, clima e tipos de solo, o que muda em relação as marcas usadas e a localidade do plantio.

Cogo *et al.* (2010) investigou a atividade antibacteriana de extrato etanólico de *Ilex paraguariensis* frente a onze isolados clínicos de *H. pylori*. O teste *in vitro* mostrou uma inibição potente, MIC<sub>50</sub> < 0,625 mg/mL e MIC<sub>90</sub> de 2,5 mg/mL. Uma investigação realizada por Schubert *et al.* (2006), demonstrou que *I. paraguariensis*, amplamente consumido como parte da dieta usual no Brasil na forma de chá e chimarrão, apresenta vários produtos metabólicos secundários que mostram atividade antimicrobiana, incluindo compostos fenólicos, triterpenos e flavonóides.

O resultado obtido corrobora com o descrito na literatura, uma vez que o chá Mate obteve um dos maiores valores de inibição avaliados no presente trabalho.

Matsubara *et al.* (2003) verificou a inibição da urease a partir de *Camelia sinensis* (chá verde e chá preto). Em um estudo *in vitro* realizado com a *H. pylori*, o extrato metanólico do chá verde alcançou a maior inibição entre os 77 alimentos estudados, tendo um IC<sub>50</sub> = 13 µg/mL. Já o valor correspondente para o extrato metanólico do chá preto foi um IC<sub>50</sub> = 56 µg/mL. As catequinas dos chás verde e preto foram consideradas as substâncias responsáveis pela inibição observada, sendo as principais: galato de epigalocatequina, galato de galocatequina, galocatequina e epigalocatequina. O mecanismo de inibição da urease por catequinas pode estar associado aos grupos funcionais hidroxila e cetonas presentes nessas substâncias, que podem interagir com íons níquel no sítio ativo da enzima.

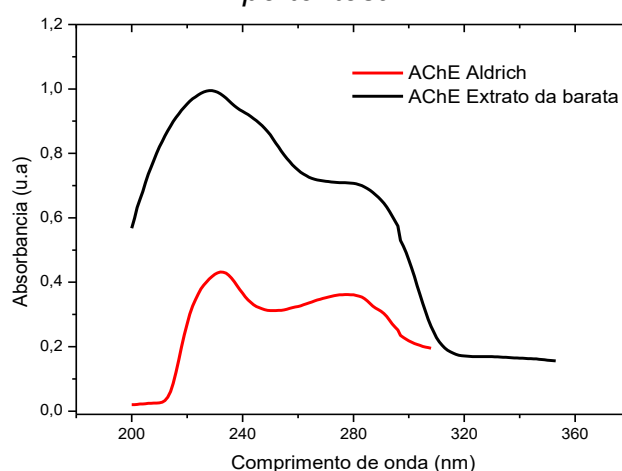
Apesar de serem produzidos a partir da mesma planta, os dois chás (Verde e Preto) resultaram em valores de inibição diferentes. Tal fato pode estar relacionado a diversidade de métodos de crescimento, colheita e beneficiamento utilizados para obtenção dos chás. A ordem relativa de inibição enzimática, diferente da observada na literatura, pode ser atribuída ao solvente de extração utilizado, assim como as particularidades da fonte vegetal utilizada para produção dos chás, que apesar de ser da mesma espécie produz metabólitos secundários ligeiramente diferentes ou em concentrações diferentes.

### 5.3 Testes *in vitro* para a inibição de acetilcolinesterase

#### 5.3.1 Extração da acetilcolinesterase (AChE)

Para um barateamento da produção da AChE extraiu-se tal enzima dos cérebros das baratas da espécie *Gromphadorhia portentosa*, que ao comparar com a solução padrão da enzima (adquirido Sigma Aldrich) apresentou um espectro de absorção com perfil semelhante sendo assim é possível validar o processo de extração da enzima acetilcolinesterase e assim esta pode ser utilizada para teste visando tanto a cura quando o tratamento para Alzheimer.

**Figura 18** - Espectros de absorção solução padrão da enzima acetilcolinesterase (AChE, adquirido Sigma Aldrich) e do extrato obtido da barata *Gromphadorhia portentosa*.

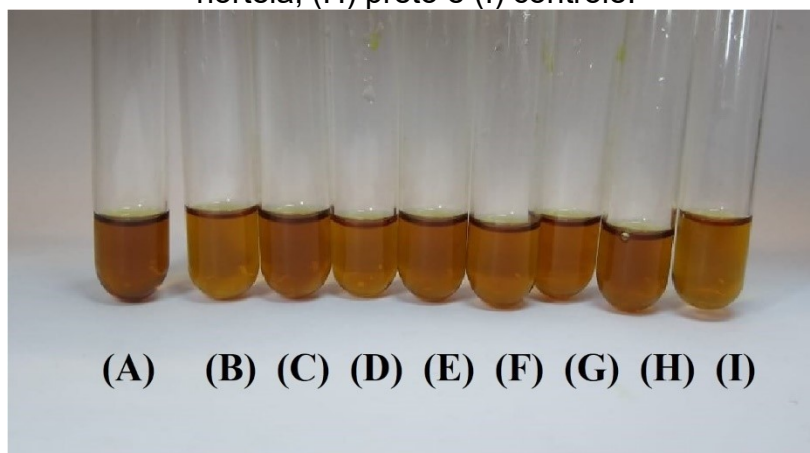


Fonte: Autoria própria (2021).

Os aspectos visuais obtidos nos testes de inibição de acetilcolinesterase com os oitos chás avaliados no presente trabalho estão apresentados na **Figura 19**. É possível observar que a maioria dos chás, ao serem submetidos ao teste de inibição

urease, desenvolveram coloração marrom, indicando que não houve inibição da AChE. Os chás não obtiveram uma diferença significativa de cor entre eles e em relação ao controle.

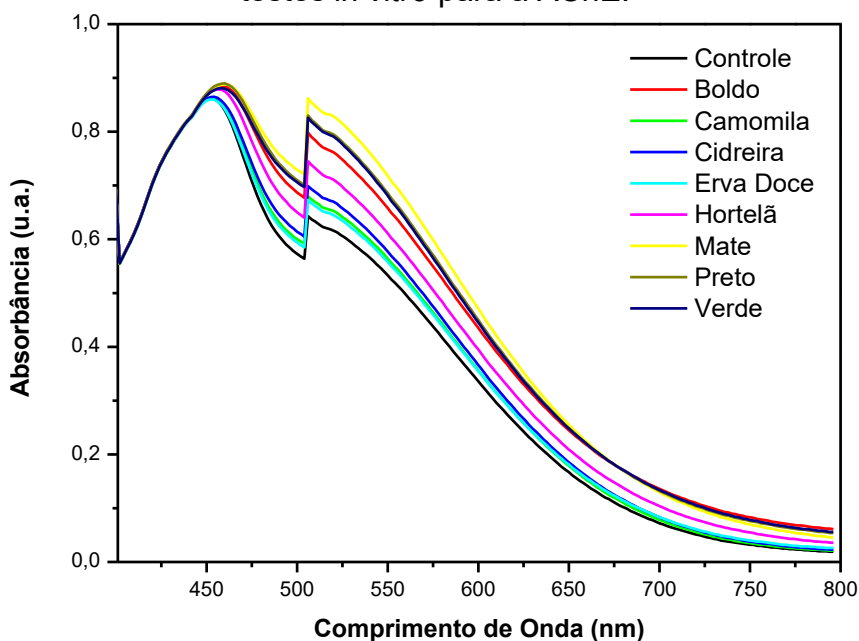
**Figura 19** - Aspectos visuais observados nos testes de inibição da AChE utilizando chás: (A) mate; (B) erva doce; (C) verde; (D) camomila; (E) boldo; (F) cidreira; (G) hortelã; (H) preto e (I) controle.



Fonte: Autoria própria (2021).

A **Figura 20** apresenta os espectros de absorção obtidos após a realização dos testes *in vitro*. Pode-se observar que, para a maioria dos chás os espectros de absorção possuem um perfil espectral semelhante ao controle. Para os chás mate, verde e preto observa-se que a absorção na região de 540 nm é mais distante do controle, podendo ser possíveis inibidores. Essa maior absorbância pode ser deduzida devido a maior concentração de acetilcolina não hidrolisada.

**Figura 20** - Espectros de absorção, na região do ultravioleta-visível, obtidos após os testes *in vitro* para a AChE.



Fonte: Autoria própria (2021).

Os valores de absorbância, no comprimento de onda de 540 nm, foram convertidos, utilizando a equação 2, em porcentagem de inibição de acetilcolinesterase (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Absorbância e porcentagem inibitória de AChE dos chás avaliados.

Amostras	Absorbância em 540 nm	I (%)
Controle	0,566	-
<i>Pimpinella anisum</i> (erva doce)	0,592	4,59
<i>Matricaria chamomilla</i> (camomila)	0,599	5,83
<i>Melissa officinalis</i> (cidreira)	0,613	8,30
<i>Mentha spicata</i> (hortelã)	0,649	14,66
<i>Peumus boldus</i> (boldo)	0,697	23,14
<i>Camellia sinensis</i> (verde)	0,723	27,74
<i>Camellia sinensis</i> (preto)	0,727	28,84
<i>Ilex paraguariensis</i> mate)	0,761	34,45

Fonte: Autoria própria (2021).

Como dito anteriormente, os percentuais de inibição de AChE obtidos para os chás mate (*Ilex paraguariensis*), verde e preto (*Camellia sinensis*) são maiores do que os demais chás, o que indica que estes chás possuem substâncias químicas capazes de inibir a enzima.

Os resultados observados no presente trabalho são, na sequência, comparados aos dados disponíveis na literatura.

Segundo Hajimehdipoor *et al.* (2013), a *Matricaria chamomilla* não possui efeito inibitório de AChE. Em seu estudo, foi analisado *in vitro* extratos aquosos de nove plantas comumente usadas na medicina tradicional iraniana, dentre elas a *M. chamomilla*. Apenas a extrato de *Alpinia officinarum* apresentou 41,3% de inibição na concentração de 300 µg/ml, maior concentração analisada. *M. chamomilla* obteve um valor de 0% de inibição.

Um estudo avaliou a inibição *in vitro* de extratos aquosos e metanólicos de 11 plantas frente a enzima acetilcolinesterase, dentre elas a *Pimpinella anisum*, *Melissa officinalis* e *Mentha spicata*. O extrato metanólico de *P. anisum* obteve inibição apenas na concentração de 0,1 mg/mL, obtendo uma porcentagem de inibição de 3 mg/ml. Nas demais concentrações e extratos o valor foi de 0 mg/ml. Para *M. officinalis* o resultado também foi negativo, já que a planta obteve uma porcentagem de inibição de 0 mg/ml para todas as concentrações e extratos. *M. spicata* foi a única planta que exibiu uma inibição moderada da enzima, definida como mais de 15% na concentração de 0,1 mg/ml. O extrato que obteve essa inibição de 15 mg/mL foi o metanólico. Isso pode ser explicado pelo fato do óleo essencial desta planta conter terpenos, um grupo de compostos relatados anteriormente na literatura como tendo atividade inibitória sobre a AChE (ADSERSEN *et al.*, 2006).

Outra planta que possui poder inibitório de AChE é a *Peumus boldus*. Em um estudo *in vitro* utilizando o extrato aquoso dessa planta observou-se inibição de AChE num valor de IC<sub>50</sub> de 0,93 mg/mL. Foi observado que o extrato obtido por infusão obteve um IC<sub>50</sub> um pouco superior do que o extrato obtido por decocção de *P. boldus*, isso ocorre devido à maior quantidade de compostos presentes na decocção em relação à infusão. Os extratos aquosos de *P. boldus* são compostos principalmente de compostos derivados glicosilados de flavonóides, embora a boldina e outros derivados da aporfina possam ser detectados em pequenas quantidades (FALE *et al.*, 2012).

Os estudos descritos anteriormente indicam que *Matricaria chamomilla*, *Pimpinella anisum* e *Melissa officinalis* são, assim como observado no presente trabalho, ineficazes para a inibição da AChE.

Já em relação a *Mentha spicata* e *Peumus boldus*, os resultados encontrados no presente trabalho também são corroborados por trabalhos em que as plantas obtiveram resultados positivos, porém moderados.

Raghavendra *et al.* (2015) verificou a inibição *in vitro* da atividade da acetilcolinesterase por diferentes concentrações de extrato de chá verde (*Camellia sinensis*) usando acetiltiocolina como substrato. O extrato aquoso de chá verde exibiu inibição dependente da dose da atividade de AchE com um valor de IC<sub>50</sub> de 42,05 µg/ml. Os efeitos benéficos do chá verde são atribuídos principalmente ao alto teor de polifenóis em catequinas específicas.

Em uma investigação *in vitro* observou-se que os extratos aquosos do chá preto (*Camellia sinensis*) e seus polifenóis possuem atividade inibitória de AChE. O presente estudo mostrou que a infusão e a decocção de cada variedade de chá inibiram a AChE de maneira dependente da dose. Em geral, a atividade da decocção do chá foi significativamente maior do que a da infusão. O valor para o IC<sub>50</sub> do extrato aquoso do chá preto foi de 219.94±4.99 (µg/ml) (RAY & DE, 2012).

Os dois chás (Verde e Preto) resultaram em valores de inibição muito próximos. Tal fato pode estar relacionado aos dois proverem da mesma planta (*Camellia sinensis*) e apenas divergirem nos métodos de crescimento, colheita e beneficiamento. Ambos resultados positivos são corroborados pelo descrito na literatura.

A composição química do chá Mate inclui vários constituintes que podem ser responsáveis pelas numerosas atividades biológicas e farmacológicas. O ácido clorogênico (CGA) é um dos principais componentes polifenólicos encontrados em *Ilex paraguariensis*. Um estudo *in vitro* evidenciou a capacidade inibitória de CGA de *I. paraguariensis* frente a enzima AChE. O CGA inibiu fortemente a atividade da AChE a 400 µg/mL (mais de 80%) e as outras concentrações de maneira dependente da dose. O valor IC<sub>50</sub> de CGA foi 98,17 µg/mL (SANTOS *et al.*, 2015).

Não foi encontrado na literatura trabalhos que usaram o extrato de *I. paraguariensis* frente a enzima AChE. O resultado obtido neste trabalho corrobora com o descrito na literatura, uma vez que o ácido clorogênico presente no chá mate é um forte inibidor de AChE.

#### 5.4 Propriedades moleculares e predição de bioatividade

Na ferramenta *Molinspiration*, calculou-se alguns propriedades moleculares para os compostos estudados neste trabalho. Os resultados obtidos (**Tabela 4**) mostram que 16 das substâncias avaliadas (**1-4, 6, 12-16 e 23-26, 29 e 30**) não violam os parâmetros de Lipinski *et al.* (1997). Desse modo, é improvável que essas 16

substâncias apresentem problemas de biodisponibilidade por essa via de administração.

**Tabela 4** - Valores de propriedades moleculares, calculadas na ferramenta *Molinspiration*, dos compostos **1-30**.

Composto	miLogP	TPSA	nátomos	MM	nALH	nDLH	nviolações	nrotb	Volume
1	0,06	61,84	14	194,19	6	0	0	0	167,63
2	1,37	110,37	21	290,27	6	5	0	1	244,14
3	1,08	130,60	22	306,27	7	6*	1	1	252,16
4	1,08	130,60	22	306,27	7	6	1	1	252,16
5	2,25	197,36	33	458,38	11	8	3	4	367,57
6	1,37	110,37	21	290,27	6	5	0	1	244,14
7	2,54	177,13	32	442,38	10	7	2	4	359,55
8	1,63	217,59	42	578,53	12	9	4	2	476,02
9	2,79	284,35	53	730,63	16	11	4	5	591,44
10	2,79	284,35	53	730,63	16	11	4	5	591,44
11	3,96	351,11	64	882,74	20	13	4	8	706,85
12	0,59	97,98	12	170,12	5	4	0	1	135,10
13	1,68	131,35	22	302,24	7	5	0	1	240,08
14	2,17	111,12	21	286,24	6	4	0	1	232,07
15	-2,33	118,21	13	192,17	6	5	0	1	161,46
16	0,94	77,75	13	180,16	4	3	0	1	154,50
17	-0,45	164,74	25	354,31	9	6	2	5	296,27
18	-0,67	164,74	25	354,31	9	6	2	5	296,27
19	-0,45	164,74	25	354,31	9	6	2	5	296,27
20	1,42	211,28	37	516,46	12	7	4	9	431,08
21	1,21	211,28	37	516,46	12	7	4	9	431,08
22	1,21	211,28	37	516,46	12	7	4	9	431,08
23	-0,95	72,69	13	180,17	6	1	0	0	150,69
24	-0,01	72,69	13	180,17	6	1	0	0	150,69
25	3,21	20,23	11	154,25	1	1	0	4	175,59
26	3,20	20,23	11	154,25	1	1	0	4	175,57
27	-1,06	269,43	43	610,52	16	10	4	6	496,07
28	-0,57	249,20	42	594,52	15	9	4	6	488,05
29	6,79	57,53	33	456,71	3	2	1	1	471,49
30	9,04	29,46	31	430,72	2	1	1	12	474,50

\* As violações à regra dos cinco são indicadas em vermelho.

Fonte: Autoria própria (2021).

Para os demais compostos observa-se violação de dois, três ou quatro dos parâmetros relacionados à regras dos cinco de Lipinski. Os compostos **7, 17-19** apresentaram duas violações à regra dos cinco de Lipinski, quanto à área superfície polar topológica e ao número de doadores de ligação de hidrogênio. O composto **5** apresenta três violações à regra dos cinco de Lipinski (quanto à área superfície polar topológica, ao número de aceptores de ligação de hidrogênio e ao número de doadores de ligação de hidrogênio). Já os compostos **8-11, 20-22, 27 e 28** apresentam quatro violações à regra dos cinco de Lipinski.



De modo geral, as violações são resultantes do número de hidroxilas presentes nas moléculas que aumentam tanto o número de aceptores de ligação de hidrogênio e o número de doadores de ligação de hidrogênio aumentando as possibilidades de interação com o meio aquoso extramembranar o que interfere diretamente na redução da permeabilidade em membranas. Além disso, algumas das substâncias avaliadas, tais como as teaflavinas e os derivados do ácido cafeolquínico, possuem elevada massa molar diminuindo a possibilidade de transposição em membranas celulares.

Na sequência, ainda na ferramenta *Molinspiration*, realizou-se a predição de bioatividades (**Tabela 5**).

**Tabela 5 -** Escore obtido do estudo de predição de bioatividade dos compostos **1-30**.

Composto	Ligante GPCR	Modulador Canal Iônico	Inibidor Quinase	Ligante Receptor Nuclear	Inibidor Protease	Inibidor de Enzima
1	-0,53	-0,98	-1,07	-2,10	-1,23	-0,22
2	0,41	0,14	0,09	0,60	0,26	0,47
3	0,40	0,14	0,14	0,57	0,29	0,49
4	0,40	0,14	0,14	0,57	0,29	0,49
5	0,16	0,02	0,06	0,33	0,13	0,25
6	0,41	0,14	0,09	0,60	0,26	0,47
7	0,17	0,02	0,05	0,34	0,13	0,25
8	0,16	-0,35	-0,15	0,17	0,00	0,15
9	-0,95	-2,03	-1,60	-1,41	-0,74	-1,21
10	-0,96	-2,03	-1,58	-1,41	-0,72	-1,21
11	-3,05	-3,60	-3,54	-3,45	-2,62	-3,21
12	-0,77	-0,26	-0,88	-0,52	-0,94	-0,17
13	-0,06	-0,19	0,28	0,36	-0,25	0,28
14	-0,10	-0,21	0,21	0,32	-0,27	0,26
15	-0,24	0,10	-0,77	0,16	-0,26	0,60
16	-0,48	-0,23	-0,81	-0,10	-0,79	-0,09
17	0,29	0,14	-0,00	0,74	0,27	0,62
18	0,18	0,02	-0,10	0,66	0,14	0,49
19	0,29	0,14	-0,00	0,74	0,27	0,62
20	0,18	0,03	-0,02	0,46	0,13	0,37
21	0,19	0,01	-0,01	0,50	0,16	0,40
22	0,19	0,01	-0,01	0,50	0,16	0,40
23	-0,78	-1,01	-0,73	-2,37	-1,46	-0,17
24	-0,40	-0,79	-1,24	-2,56	-1,46	-0,12
25	-0,73	0,07	-1,26	-0,06	-0,94	0,07
26	-0,60	0,07	-1,32	-0,20	-1,03	0,28
27	-0,05	-0,52	-0,14	-0,23	-0,07	0,12
28	-0,01	-0,43	-0,09	-0,17	-0,04	0,18
29	0,28	-0,03	-0,50	0,89	0,23	0,69
30	0,25	0,14	-0,21	0,41	0,28	0,24

Fonte: Autoria própria (2021).

Entre os compostos avaliados, pode-se observar que onze dos compostos avaliados (**2-7**, **17**, **19-22**) apresentaram resultados para os seis modelos de bioatividade calculados pela ferramenta *Molinspiration*. Para os compostos **18**, **29** e **30** há predição de bioatividade para quatro ou cinco dos modelos calculados pela ferramenta *Molinspiration*.

No contexto da presente pesquisa, a bioatividade que se busca justificar é a de inibição enzimática, observada nos testes *in vitro* de inibição de urease e acetilcolinesterase. Essa bioatividade foi observada com frequência para os compostos estudados (**Tabela 5**).

As propriedades farmacocinéticas relacionadas aos processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade calculadas para os compostos **1-30** são apresentadas na **Tabela 6**.

Quanto ao processo de absorção, observa-se que apenas dois dos compostos avaliados (**4** e **5**) não apresentam resultado positivo para absorção no intestino humano. Cinco dos compostos (**16**, **25**, **26**, **29** e **30**) avaliados apresentaram resultados positivos para o modelo de absorção em células Caco-2. Oito dos compostos avaliados (**1**, **12**, **15**, **16**, **23**, **24**, **29** e **30**) apresentaram resultado positivo para o modelo de biodisponibilidade oral. Ao compararmos esses últimos resultados com os obtidos no *Molinspiration* observa-se que o algoritmo utilizado no admetSAR indicou um menor número de compostos como sendo biodisponível.

As células Caco-2 constituem um parâmetro importante de absorção de fármacos no intestino, assim, se a magnitude de permeabilidade dos compostos a essas células for baixa, é improvável a absorção efetiva da molécula (YEE, 1997).

Quanto ao processo de metabolização, observou-se que apenas os compostos **13** e **14** apresentaram promiscuidade inibitória do citocromo P450, atuando como substratos e inibidores de algumas das isoformas da proteína P450. Esse resultado indica que, com exceção dos compostos **13** e **14**, os produtos naturais avaliados não são biotransformados e podem atuar, sem uma diminuição da concentração plasmática, em bioreceptores no organismo.

Quanto aos parâmetros de toxicidade, a toxicidade oral aguda para os compostos **2-11** e **16** foi classificada na categoria IV ( $5000 \text{ mg/kg} \leq \text{LD}_{50}$ ); para os compostos **1**, **13**, **14** e **23** foi classificada na categoria II ( $50 \text{ mg/kg} \leq \text{LD}_{50} \leq 500 \text{ mg/kg}$ ); os demais compostos foram classificados na categoria III ( $500 \text{ mg/kg} \leq \text{LD}_{50} \leq 5000 \text{ mg/kg}$ ). Esses resultados indicam que os compostos presentes nos três chás não possuem toxicidade oral aguda acentuada.

Observou-se que nenhum dos compostos avaliados apresentaram resultado positivo para o modelo de carcinogenicidade; seis dos compostos avaliados (**2**, **6**, **13**, **14**, **27** e **28**) apresentaram resultado positivo para o modelo de mutagenicidade de Ames; 18 dos compostos avaliados (**1**, **3-5**, **7-11**, **13**, **14**, **20-24**) apresentaram resultado positivo para o modelo de hepatotoxicidade. Esses resultados sugerem que esses chás devem ser consumidos com cautela, uma vez que há substâncias que podem causar efeitos colaterais indesejados.

**Tabela 6 – Resultados de propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) dos compostos 1-30, calculados na ferramenta admetSAR.**

PARÂMETROS	Compostos																														
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	
<b>Absorção</b>																															
Absorção no intestino humano	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caco-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	
Biodisponibilidade oral humana	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
<b>Metabolização</b>																															
Substrato CYP3A4	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
Substrato CYP2C9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Substrato CYP2D6	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Inibição de CYP3A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Inibição de CYP2C9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Inibição de CYP2C19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Inibição de CYP2D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Inibição de CYP1A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Promiscuidade inibitória de CYP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Toxicidade</b>																															
Carcinogenicidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mutagenese de Ames	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Hepatotoxicidade	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	
Toxicidade Oral Aguda	II	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	III	II	II	III	IV	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	

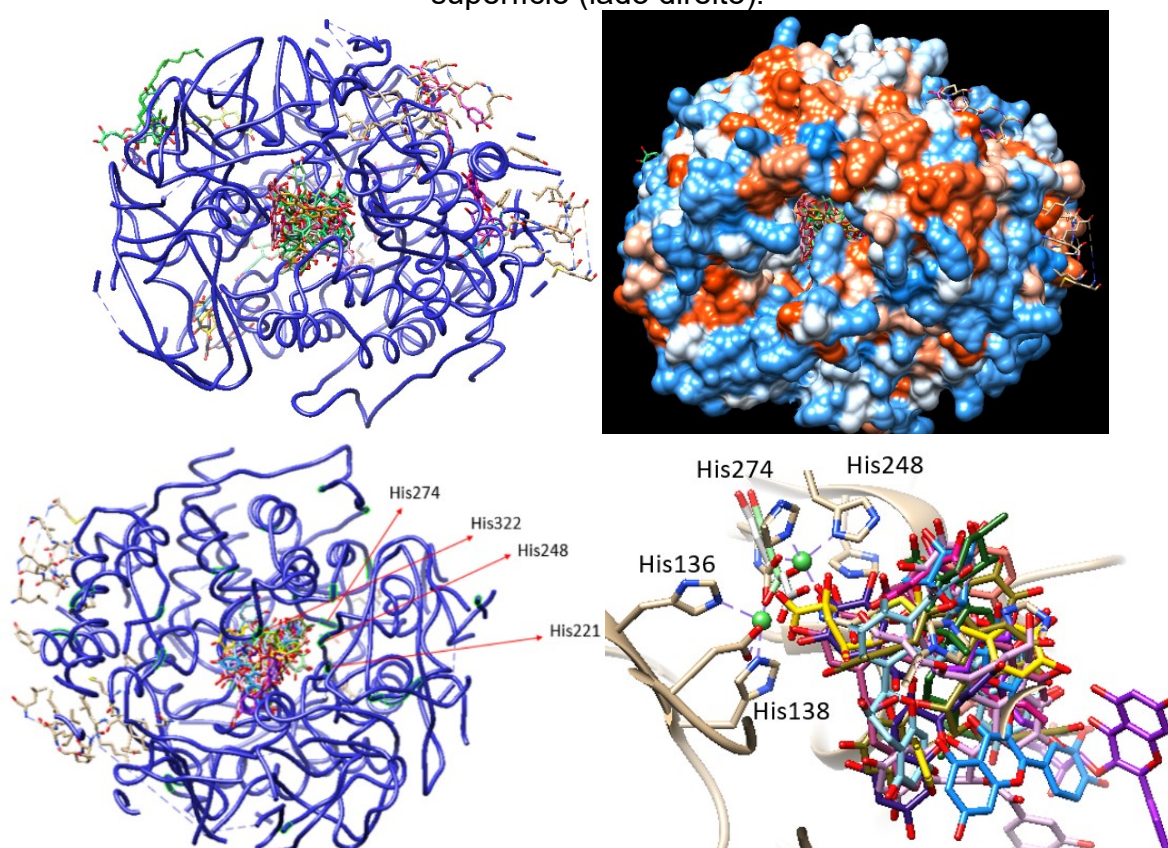
Fonte: Autoria própria (2021).

Foram realizados dois estudos de ancoragem molecular, um para a enzima urease e outro para a enzima acetilcolinesterase. No que se refere a inibição da enzima urease, Cunha *et al.* (2021) mostraram que o complexo formado entre o composto 2-[[1-(3,5-dimetilfenil)-1*H*-imidazol-2-il]sulfanil]-*N*-hidroxiacetamida e a enzima urease se estabelece nos bolsões onde os íons Ni<sup>2+</sup> estão presentes, interagindo com alguns resíduos de aminoácidos, tais como Cis321, His322 e His221.

Na **Figura 21** é indicado o dendograma que representa as interações entre cada um dos compostos avaliados e os resíduos de aminoácidos da enzima urease. Ao investigar apenas algumas das histidinas presentes no sítio ativo da urease, **Figura 22**, observou-se que 13 dos compostos avaliados (7-13, 16, 19, 20, 27-29) interagem com esses resíduos de aminoácidos.

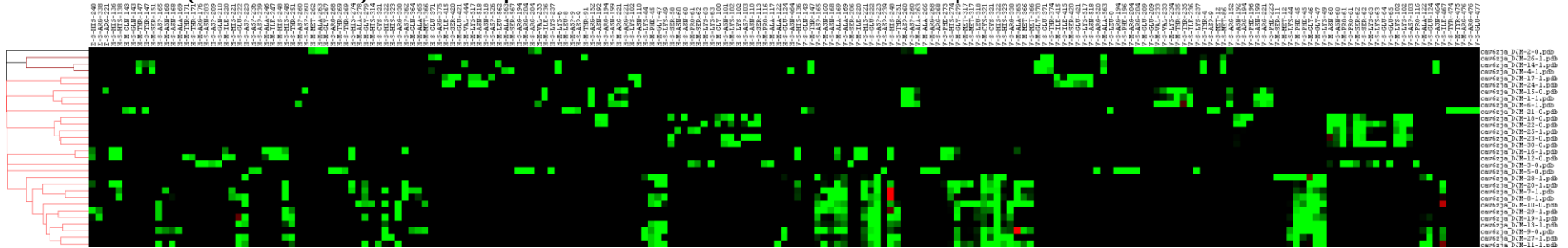
As interações entre as substâncias 1-30 e a região em torno do sítio ativo, estudadas via ancoragem molecular, foram exploradas utilizando a ferramenta *Chimera* (**Figura 23**).

**Figura 23** - Resultado do estudo de ancoragem molecular dos compostos 1-30 com a enzima urease (PDB ID: 6ZJA). Os compostos avaliados estão representados em modelo de bastão e a cadeia da enzima em azul escuro (lado esquerdo) e por sua superfície (lado direito).



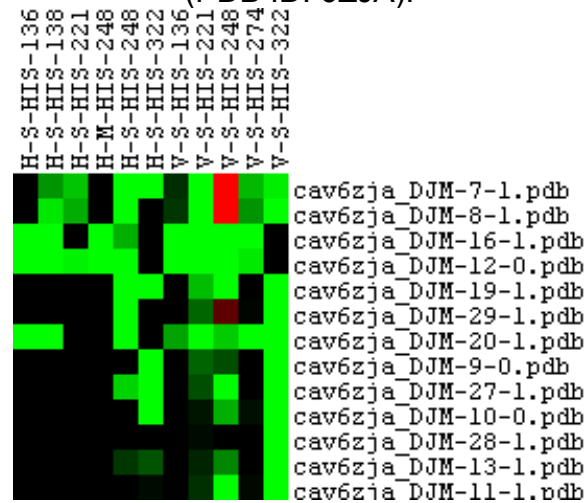
Fonte: Autoria própria (2021).

**Figura 21** - Agrupamento hierárquico das interações dos compostos avaliados com os resíduos de aminoácidos da enzima urease (PDB ID: 6ZJA). Em destaque estão os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima.



Fonte: Autoria própria (2021).

**Figura 22** - Compostos que interagem com resíduos de aminoácidos do tipo histidina presentes no sítio ativo da enzima urease (PDB ID: 6ZJA).



Fonte: Autoria própria (2021).

Na **Figura 23** pode-se observar um aglomerado de compostos na região central da enzima, e alguns compostos em bolsões próximos à superfície da enzima.

Na **Figura 23 (lado direito)** pode-se observar as interações do tipo íon-dipolo dos pares de resíduos de aminoácidos His136-His138 e His248-His274 com os íons  $\text{Ni}^{2+}$ . Essa região é fundamental para a hidrólise da ureia, desta forma, substâncias que se ancoram próximo aos íons  $\text{Ni}^{2+}$  podem atuar como inibidores competitivos, impedindo a ação da urease sob seu substrato natural.

Entre as substâncias que se ancoram no sítio ativo, as que possuem maior interação com a enzima urease são as teaflavinas **11** (-173,126), **10** (-168,585) e **9** (-153,154  $\text{kJ.mol}^{-1}$ ), **Tabela 7**. No entanto, essas três substâncias apresentam quatro violações à regra dos cinco de Lipinski, o que indica que os resultados de inibição enzimática observados *in vitro* e *in silico* podem não ser observado *in vivo*, uma vez que essas substâncias possuem propriedades moleculares que limitam sua transposição em membranas.

**Tabela 7** - Energias de interação, em kcal.mol<sup>-1</sup>, dos compostos **1-30** com a enzima urease (PDB ID: 6ZJA) obtidas do estudo de ancoragem molecular.

Composto	Energia Total	van der Waals	Ligação de Hidrogênio	Eletrostática
1	-75,2699	-62,6131	-12,6568	0
2	-95,5762	-74,9195	-20,6567	0
3	-106,316	-73,3775	-32,9384	0
4	99,7665	-74,9863	-24,7802	0
5	-136,048	-94,2479	-41,7996	0
6	-100,981	-77,2903	-23,6904	0
7	-116,352	-77,3018	-39,0504	0
8	-126,461	-83,1526	-43,3081	0
9	-153,154	-110,424	-42,7295	0
10	-168,585	-127,797	-40,7882	0
11	-173,126	-122,859	-50,2671	0
12	-108,676	-62,428	-38,7931	0
13	-93,2281	-63,7468	-29,4813	0
14	-92,5482	-78,4417	-14,1065	0
15	-79,926	-43,2034	-34,7284	-1,99423
16	-107,584	-70,7198	-32,3692	-4,49545
17	-102,088	-68,9971	-34,257	1,16655
18	-103,544	-67,7177	-33,7283	-2,09773
19	-102,084	-64,204	-33,7984	-4,08208
20	-143,027	-101,816	-37,3194	-3,89183
21	-128,241	-103,447	-26,0721	1,27788
22	-115,52	-86,7918	-26,8841	-1,84368
23	-81,3621	-56,1318	-25,2303	0
24	-74,9328	-44,0805	-30,8523	0
25	-55,0103	-47,1606	-7,8497	0
26	-59,3317	-46,5091	-12,8226	0
27	-131,856	-89,3199	-42,5357	0
28	-124,945	-93,1408	-31,8046	0
29	-98,7572	-82,9295	-12,807	-3,02074
30	-96,4471	-84,5876	-11,8595	0

Fonte: Autoria própria (2021).

Para as substâncias **13** (quercetina), **16** (ácido cafeico) e **29** (ácido ursólico), por outro lado, apesar de interagirem mais fracamente com a enzima urease do que as substâncias **9-11**, não há indicativo de problemas de biodisponibilidade oral.

O segundo estudo de ancoragem molecular foi realizado utilizando a enzima acetilcolinesterase (PDB ID: 4EY6). Para isso, levou-se em consideração a importância dos resíduos de aminoácidos Trp86, Glu202, Ser203, Trp286, Phe297, Tyr337, Phe338, Tyr341 e His447 que estão localizados no bolsão do sítio ativo da enzima (CHLEBEK *et al.*, 2019). Na **Figura 24** é apresentado o dendograma que sistematiza as interações entre os compostos **1-30** com os resíduos de aminoácidos presentes em torno do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase (PDB ID: 4EY6).

Levando em consideração os dados da literatura (CHLEBEK *et al.*, 2019) sobre resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio ativo da enzima (indicados em



vermelho no dendograma) pode-se observar que há nove compostos que interagem nesse local da enzima acetilcolinesterase. Tal evidência foi confirmada visualmente, na ferramenta *Chimera*, ao se estudar as interações dos compostos **1-30** com a enzima acetilcolinesterase.

Das nove substâncias que se ancoram no sítio ativo da enzima acetilcolinesterase (PDB ID: 4EY6) apenas a **18** possui indicativo de problemas em relação a biodisponibilidade oral. Em relação a energia de interação com a enzima, a substâncias **4** ( $-123,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) e **25** ( $-61,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) são as que interage mais fortemente e mais fracamente, respectivamente, com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima (**Tabela 8**).

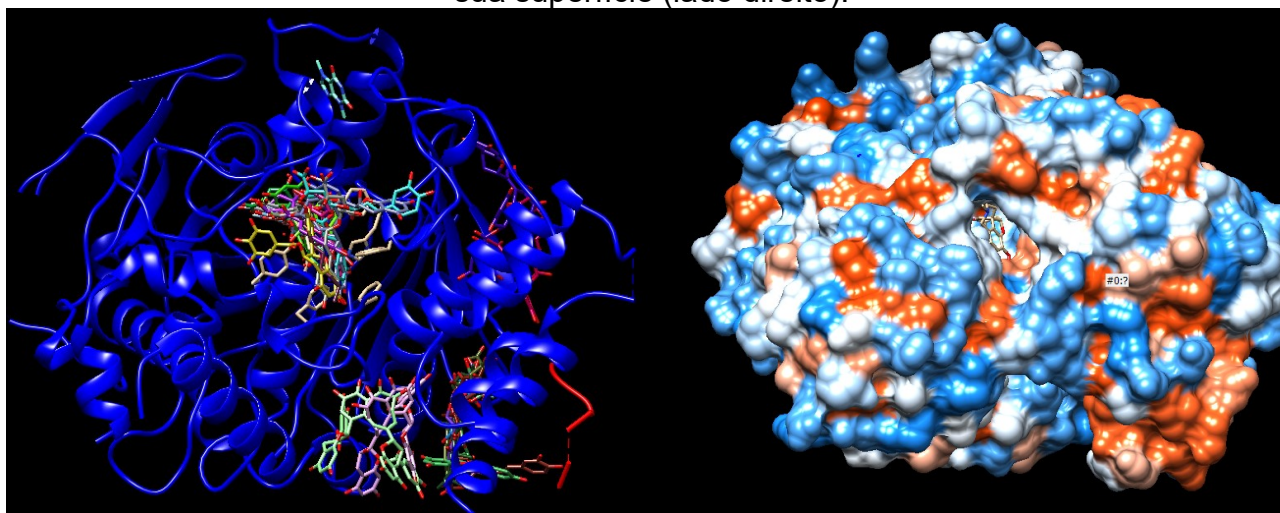
Ao relacionar os resultados *in silico* com *in vitro*, pode-se inferir que há várias substâncias presentes nos chás avaliados que possuem potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase. Vale ressaltar, no entanto, que os testes *in vitro* indicam que o potencial de inibição de urease é maior do que o potencial de inibição de acetilcolinesterase. Ainda assim, os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com os estudos que indicam a importância de alimentos funcionais para a saúde do ser humano.

**Figura 24** - Agrupamento hierárquico das interações dos compostos avaliados com os resíduos de aminoácidos da enzima acetilcolinesterase (PDB ID: 4EY6). Em destaque estão os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima.



Fonte: Autoria própria (2021).

**Figura 25** - Resultado do estudo de ancoragem molecular dos compostos 1-30 com a enzima acetilcolinesterase (PDB ID: 4EY6). Os compostos avaliados estão representados em modelo de bastão e a cadeia da enzima em azul escuro (lado esquerdo) e por sua superfície (lado direito).



Fonte: Autoria própria (2021).

**Tabela 8** - Energias de interação, em kcal.mol<sup>-1</sup>, dos compostos **1-30** com a enzima acetilcolinesterase (PDB ID: 4EY6) obtidas do estudo de ancoragem molecular.

Composto	Energia Total	van der Waals	Ligação de Hidrogênio	Eletrostática
1	-75,554	-61,1604	-14,3936	0
2	-111,762	-87,0509	-24,7114	0
3	-108,019	-72,9288	-35,0901	0
4	-123,775	-92,679	-31,096	0
5	-114,885	-97,1206	-17,7647	0
6	-97,6391	-74,0591	-23,58	
7	-151,041	-112,401	-38,6399	0
8	-129,228	-104,538	-24,69	
9	-153,048	-113,089	-39,9586	0
10	-140,643	-105,773	-34,8705	0
11	-159,356	-107,846	-51,5097	0
12	-74,4338	-58,2862	-16,1476	0
13	-121,032	-88,8373	-32,1946	0
14	-106,413	-81,9914	-24,422	0
15	-81,5926	-53,7147	-27,2161	-0,661755
16	-78,1873	-55,9725	-20,0066	-2,20822
17	-116,759	-84,5262	-32,5223	0,289007
18	-123,312	-86,4393	-36,8729	0
19	-107,875	-72,8915	-34,9832	0
20	-135,921	-100,059	-34,0573	-1,80496
21	-135,963	-108,407	-27,8918	0,335725
22	-131,578	-115,213	-16,6291	0,264098
23	-76,3494	-52,8494	-23,5	0
24	-76,0263	-63,9034	-12,1229	0
25	-61,7562	-54,4647	-7,29146	0
26	-68,3103	-61,3103	-7	0
27	-132,754	-78,7966	-53,9571	0
28	-135,363	-85,1633	-50,1992	0
29	-95,2756	-88,6871	-4,93012	-1,65841
30	-127,122	-119,622	-7,5	0

Fonte: Autoria própria (2021).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se que, entre os oito tipos de chás comercializados em sachês avaliados nesse estudo, três tipos de chás {mate (*Ilex paraguariensis*), verde e preto (*Camellia sinensis*)} apresentaram, *in vitro*, potencial de inibição das enzimas urease e acetilcolinesterase. Tais resultados corroboram com dados da literatura que indicam que alguns tipos de chás possuem potencial para o tratamento da Doença de Alzheimer e de úlceras pépticas causadas pela bactéria *H. pylori*.

Ao realizar os estudos *in silico*, observou-se que várias das substâncias comumente indicadas na literatura como constituinte dos chás mate (*Ilex paraguariensis*), verde e preto (*Camellia sinensis*) apresentam propriedades moleculares e farmacocinéticas adequadas para substâncias apresentarem bioatividade no organismo humano. Os estudos de ancoragem molecular indicam que, entre as 30 substâncias avaliadas: 13 possuem potencial de inibição da enzima urease e 9 possuem potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase. Duas substâncias (ácido gálico e quercetina) apresentaram potencial de inibição das duas enzimas avaliadas, as demais substâncias apresentaram uma ou outra bioatividade. Tal fato, sugere a importância da diversidade estrutural presente em produtos naturais para a promoção de atividades biológicas e farmacológicas associadas, indicando que o mecanismo de ação envolve mais do que uma substância bioativa, ao contrário do que se observa em medicamentos comercializados por indústrias farmacêuticas.

Concluímos que os testes *in vitro* e *in silico* são complementares e convergem para explicar o mecanismo de ação dos chás mate, verde e preto enquanto inibidores de urease e acetilcolinesterase. Além disso, entre as duas bioatividades, observa-se que os chás mencionados possuem um maior potencial de ação sobre a enzima urease do que sobre a enzima acetilcolinesterase. Dessa forma, estudos *in vivo* são necessários para comprovar a ação desses chás e efetividade relativa à fármacos comerciais inibidores de urease e acetilcolinesterase.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSERSEN, A. *et al.* Triagem de plantas usadas na medicina popular dinamarquesa para tratar disfunção de memória quanto à atividade inibitória da acetilcolinesterase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p. 418-422, 2006.

AEN, Agência de Notícias do Paraná. Maior produção do País, erva-mate envolve 100 mil famílias no Paraná, 2019. Disponível em: <http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=104046&tit=Maior-producao-do-Pais-erva-mate-envolve-100-mil-familias-no-Parana-> . Acesso em 20 abr. 2021.

BOUKHEBTI, H. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. **Der Pharmacia Lettre**, v. 3, n. 4, p. 267-275, 2011.

BRACESCO, N. *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378-384, 2011.

BRAIBANTE, M. E. F. *et al.* A química dos chás. **Química Nova na Escola**, v. 36, n. 3, p. 168-175, 2014.

BRAVO, L. *et al.* LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 393-405, 2007.

BRISSAGO ISLANDS. Foto da *Camellia sinensis*. Disponível em: <http://www.isolebrissago.ch/en/parco-botanico/schede/theaceae/camellia-sinensis/> Acesso em 20 abr. 2021.

CABRERA, C. *et al.* Beneficial effects of green tea—a review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 79-99, 2006.

CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. **Boletim da Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA)**. v. 29, n. 2, p. 193-203, 2005.

CARNEIRO, S. S. *et al.* *In silico* Study Of The Therapeutic Agent In The Treatment Of Non-Hodgkin's Lymphomas, Peripheral T-Cell Belinostat, A SemiEmpirical Approach. **Imperial Journal of Interdisciplinary Research**, v. 2, n. 8, 2016.

CARTER, E. L. *et al.* Interplay of metal ions and urease. **Metallomics**, v. 1, n. 3, p. 207-221, 2009.

CAVALIERE, F.; COZZINI, P. New *in silico* trends in food toxicology. **Chem. Res. Toxicol**, 31, p. 992 – 993, 2018.

COGO, L. L. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 304-309, 2010.

ČOLOVIĆ, B. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.

CROGE, C. P. *et al.* Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 5, 2021.

CWIKLA, C. *et al.* Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. **Phytotherapy Research: an International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 24, n. 5, p. 649-656, 2010.

EFING, L. C. *et al.* Caracterização química e capacidade antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil.). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 2, 2009.

FALE, P. L. A. *et al.* Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2656-2662, 2012.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry**, v. 32, n. 3, p. 137-148, 2005.

GNOATTO, S. C. B. *et al.* Avaliação do ácido ursólico isolado de *Ilex paraguariensis* e derivados na inibição da aromatase. **European Journal of Medicine Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1865-1877, 2008.

GUERRA, A. S. **Urease de *Helicobacter pylori* e suas subunidades: papel na ativação e agregação plaquetária**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

GUPTA, V. *et al.* Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 2, n. 1, p. 12-6, 2010.

HAJIMEHDIPOOR, H. *et al.* Efeito inibidor da acetilcolinesterase de algumas ervas medicinais usadas na medicina tradicional iraniana para melhorar a memória. **Global Journal of Botanical Science**, v. 1, n. 1, pág. 18-21, 2013.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 180, n. 1, p. 249-261, 1949.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 89-143, 2003.

JACQUES, R. A. **Caracterização química da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química**. 2005. Dissertação (Doutorado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

JENKINS, J. A. *et al.* Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an *in silico* analysis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 1, p. 163-170, 2005.

KNEZEVIC, P. *et al.* A colorimetric broth microdilution method for assessment of *Helicobacter pylori* sensitivity to antimicrobial agents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 152, p. 271-278, 2018.

KONIECZYNSKI, P. *et al.* Comparison of infusions from black and green teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) based on the content of essential elements, secondary metabolites, and antioxidant activity. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 9, p. 3063-3070, 2017.

LAGORCE, D. *et al.* Computational analysis of calculated physicochemical and ADMET properties of protein-protein interaction inhibitors. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

LAPROTOX (Laboratório de Proteínas Tóxicas). Ureases de Plantas. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/portaldapesquisa/pp/areasConhec/PDF/Biofisica/LAPROTOX.pdf> . Acesso em 10 out. 2019.

LEHNINGER, A. *et al.* **Princípios de Bioquímica**, 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2003.

LEUNG, L. K. *et al.* Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 9, p. 2248-2251, 2001.

LIMA, J. D. *et al.* Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1258-1266, 2009.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

LODHI, M. A. *et al.* Study of vanadium complexes as novel inhibitors of bacillus pasteurii and canavalia ensiformis urease enzyme. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 37, n. 3, 2015.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.

MAHADY, G. B. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytotherapy Research: an International Journal Devoted to Pharmacological and**

**Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 19, n. 11, p. 988-991, 2005.

MANDEL, S.; YODIM, M. B. H. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 37, n. 3, p. 304-317, 2004.

MATSUBARA, S. *et al.* Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, n. 3, p. 715-719, 2003.

MOTTA, V. T. **Bioquímica básica**. São Paulo: Autolab, 2003.

NOGUEIRA, P. R. R. B. **Imobilização de acetilcolinesterase para construção de biossensores de pesticidas**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense, Macaé, 2015.

PASTENE, E. *et al.* Catechin-based procyanidins from *Peumus boldus* Mol. aqueous extract inhibit *Helicobacter pylori* urease and adherence to adenocarcinoma gastric cells. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 11, p. 1637-1645, 2014.

PETIGNY, L. *et al.* Extração de folhas de boldo assistida por ultrassom em lote e contínua (*Peumus boldus* Mol.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 5750-5764, 2013.

PETRONILHO, E. C. *et al.* Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra Química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. 28, p. 3-14, 2011.

POTRICKOS, R. *et al.* Determinação de fenóis totais em infusões aquosas de chá verde (*Camelia sinensis*) e de erva mate (*Ilex paraguariensis*) preparada na forma de chimarrão. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, p. 27-38, 2013.

QIN, Y. *et al.* Review properties and applications of urease. **Biocatalysis and biotransformation**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2002.

RAGHAVENDRA, H. L. *et al.* Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos polifenóis do chá verde. **Science, Technology and Arts Research Journal**, v. 3, n. 4, p. 141-142, 2015.

RAY, S.; DE, B. Propriedades inibitórias da acetilcolinesterase do chá preto e seus componentes polifenólicos. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 334-7, 2012.

REIS, E. S. *et al.* Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v. 31, n. 2, p. 331-335, 2009.



RODRIGUES, N. F. M. **Desenvolvimento de sensor bioinspirado em hexapeptídeo de enzima acetilcolinesterase para detecção de pesticidas**. 2018. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

ROHMER, F. **O livro do chá**. São Paulo: Aquariana, 2002.

SÁMANO, C. *et al.* Neurotransmitter segregation: Functional and plastic implications. **Progress in Neurobiology**, v. 97, p. 277-287, 2012.

SÁMANO, C. *et al.* Neurotransmitter segregation: Functional and plastic implications. **Progress in Neurobiology**, v. 97, p. 277-287, 2012.

SANT, C. M. R. *et al.* Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.

SANTOS, E. C. S. *et al.* Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13-21, 2015.

SCHMITZ, W. *et al.* O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina: Ciências biológicas e da saúde**, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2005.

SCHUBERT, A. *et al.* Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

SENGER, A. E. V. *et al.* Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**, v. 20, n. 4, p. 292-300, 2010.

SERRANO-POZO, A. *et al.* Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 1, n. 1, p. a006189, 2011.

SHOJAILI, A.; ABDOLLAHI FARD, M. Revisão das propriedades farmacológicas e constituintes químicos de *Pimpinella anisum*. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 2012.

SIEGELBAUM, S. A.; KANDEL, E. R. Overview of synaptic transmission. **Principles of Neural Science**, p. 177-188, 2013.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: “classical” and “non-classical” functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 293–302, 2005.

SILVA, D. A. **Screening de produtos naturais com potencialidade para tratamento de doenças ocasionadas por *Helicobacter pylori*: um estudo *in vitro* e *in silico***. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

SILVA, F. M. **Reinfecção pelo *Helicobacter pylori* em pacientes brasileiros com úlcera péptica, em seguimento de 5 anos.** 2009. Dissertação (Doutorado em Medicina), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TERSTAPPEN, G. C.; REGGIANI, A. *In silico* research in drug discovery. **Trends in pharmacological sciences**, v. 22, n. 1, p. 23-26, 2001.

UPADHYAY, L. S. B. Urease inhibitors: A review. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 381-388, 2012.

VALDUGA, E. **Caracterização estrutural e química da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e de espécies utilizadas na adulteração.** 1994. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.

VALENZUELA, B. *et al.* El consumo te y la salud: Características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 31, n. 2, p. 72-82, 2004.

VOET, D. *et al.* Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular. **Artmed Editora**, 2014.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.

WESELER, A. *et al.* A novel colorimetric broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and essential oils against *Helicobacter pylori*. **Die Pharmazie-an International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 7, p. 498-502, 2005.

ZHANG, Y. *et al.* Current role of *in silico* approaches for food enzymes. **Current Opinion in Food Science**, v. 31, p. 63-70, 2020.