

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

LETICIA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO ÓLEO DA SEMENTE DE CHIA (*Salvia hispânica L.*) NA  
ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RATOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2017

LETICIA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO ÓLEO DA SEMENTE DE CHIA (*Salvia hispânica L.*) NA  
ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina TCC, do curso de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnóloga em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Porto Ineu

Ministério da Educação  
Universidade Tecnologia Federal do Paraná  
Coordenação de Engenharia e Tecnologia de Alimentos

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO ÓLEO DA SEMENTE DE CHIA (*Salvia hispânica L.*) NA  
ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RATOS**

**POR**

**LETÍCIA DE SOUSA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 28 de novembro de 2017 como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após a deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

---

Prof. Dr Rafael Porto Ineu

Orientador

---

Prof. Idineia Fernandes dos Santos Pereira

---

Prof. Dr Paulo Henrique Março

---

NOTA: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no Departamento Acadêmico de Alimentos da UTFPR campus Campo Mourão

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter iluminado o meu caminho durante este período e jamais ter me deixado desanimar, fazendo com que eu percebesse que sempre é possível realizar nossos projetos. Sem essa força maior o caminho com certeza teria sido mais doloroso e distante.

Tenho uma eterna gratidão por meus pais Luiz e Valdete e minha amada irmã Iolanda, que sempre foram meu apoio e me incentivaram a buscar novos horizontes, enfrentar desafios e experiências, sem medirem esforços para que eu concluísse esta etapa de minha vida. O que eu sinto por eles é maior amor do mundo e uma grande admiração.

Mesmo não estando fisicamente entre nós, não poderia deixar de agradecer e lembrar de minha doce e amada avó Mercê, que desde cedo acreditava e torcia pelo meu sucesso, nutrindo um carinho muito especial por mim, o que torna essa conquista dela também, pois tua lembrança sempre me trazia esperança e coragem para continuar minha caminhada.

A todos os professores do curso, tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento de minha vida profissional, agradeço por cada ensinamento, experiência passada e pela amizade construída durante esse tempo, o meu mais sincero agradecimento. Ao professor Rafael, meu orientador, pela sua paciência ao me ajudara concluir este trabalho, aprimorando meu conhecimento e trazendo para o meu campo de visão tudo aquilo que a sala de aula não me mostraria, muito obrigado por cada ensinamento e toda experiência que me passou durante o tempo de pesquisa, tenho muita admiração e gratidão pela sua pessoa.

Aos amigos e colegas que construí durante o curso, cada um de vocês ficaram marcados em minha memória com muito carinho, citar nomes é difícil e muitas vezes injusto, mas agradeço em especial a minha amiga Mônica pelo companheirismo e pelas diversas vezes em que me ajudou e nunca me deixou desanimar, sempre com seu pensamento positivo que tudo iria dar certo. A Cristiane, Jaqueline, Igor e Felipe, meus companheiros de pesquisa. Aos amigos Polyana, Rosa, Ana, Érika, Joberson, que sempre estiveram presentes e nutro um grande carinho.

Nessa vida ninguém é uma ilha, só obtemos sucesso ao concluir nossas tarefas com a ajuda daqueles que convivemos.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo, fará coisas admiráveis (José de Alencar)

## RESUMO

SOUZA, Letícia de. **AVALIAÇÃO *in vitro* DO ÓLEO DA SEMENTE DE CHIA (*Salvia hispânica L.*) NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RATOS** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2017.

Os neurônios colinérgicos estão relacionados a importantes funções neurológicas que são prejudicadas nos casos de deficiência na secreção do neurotransmissor acetilcolina (ACh), um dos primeiros neurotransmissores descobertos e amplamente difundido no Sistema Nervoso Central (SNC). A ação da ACh é interrompida quando a mesma é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), presente na fenda sináptica. Sabe-se que o Ômega-3 têm ajudado na redução de triacilglicerol e apresenta efeito benéfico em relação a doenças coronárias, hipertensão, desordens inflamatórias, câncer, artrite, depressão, mal de Alzheimer. Dentre os alimentosnutraceuticos consumidos atualmente encontra-se a chia (*Salvia hispânica L.*), uma semente com consideráveis ações benéficas ao organismo humano. A semente de chia apresenta em seu conteúdo o ácido linolênico (Ômega-3) entre 60 e 68% da sua composição. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a modulação causada pelo óleo extraído de semente de chia na atividade enzimática *in vitro* de AChE, da butirilcolinesterase (BChE) e da glutathione-S-transferase (GST), em fígado e rim de ratos mediante diferentes concentrações de óleo de chia. A avaliação foi conduzida pelo método espectrofotométrico Ellman, com algumas adaptações. A mistura contém ácido 5'-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 1,04 mM, tampão fosfato de potássio 24 mM pH = 7,2 e a amostra (fonte de AChE). O meio foi pré-incubado durante 2 minutos a 25°C e depois adicionou-se 0,83 mM de acetiltiocolina (ASCh). Foram utilizados 0µL; 10µL; 20µL; 30µL e 50µL de óleo de chia, os resultados obtidos para as diferentes concentrações de óleo de chia mostraram que somente quando utilizado 10 µL de óleo de chia houve uma inibição na atividade da AChE. Para a atividade da GST, foram utilizados 0µL; 50µL; 75µL e 100µL de óleo de chia e observou-se uma inibição significativa somente em 75µL do óleo da semente de chia. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o óleo da semente de chia modula as enzimas antioxidantes.

**Palavras-chave:** Acetilcolina; Acetilcolinesterase; Óleo de Chia.

## ABSTRACT

SOUZA, Leticia de. **In vitro evaluation of chia seed oil (*Salvia hispânica L.*) on the activity of the enzyme hepatic acetylcholinesterase.**2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2017.

Cholinergic neurons are related to important neurological functions that are impaired in cases of deficiency in the secretion of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), one of the first neurotransmitters discovered and widely diffused in the Central Nervous System (CNS). The action of ACh is interrupted when it is hydrolyzed by the enzyme acetylcholinesterase (AChE), present in the synaptic cleft. It is known that omega-3 has helped in the reduction of triacylglycerol and has a beneficial effect in relation to coronary diseases, hypertension, inflammatory disorders, cancer, arthritis, depression, Alzheimer's disease. Among the nutraceutical foods currently consumed is chia (*Salvia hispânica L.*), a seed with considerable beneficial actions to the human organism. The chia seed presents in its content linolenic acid (Omega-3) between 60 and 68% of its composition. Therefore, the objective of this work is to analyze the modulation caused by chia seed oil in the in vitro enzymatic activity of AChE, butyrylcholinesterase (BChE) and glutathione-S-transferase (GST) in liver and rat kidney by different concentrations of chia oil. The evaluation was conducted by the Ellman spectrophotometric method, with some adaptations. The mixture contains 1.04 mM 5'-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 24 mM potassium phosphate buffer pH = 7.2 and the sample (AChE source). The medium was preincubated for 2 minutes at 25 ° C and then 0.83 mM acetylthiocholine (ASCh) was added. 0  $\mu$ L were used; 10  $\mu$ L; 20  $\mu$ L; 30  $\mu$ L and 50  $\mu$ L of chia oil, the results obtained for the different concentrations of chia oil showed that only when 10  $\mu$ L of chia oil was used there was an inhibition of AChE activity. For GST activity, significant inhibition was observed only in 75  $\mu$ L of chia seed oil. Therefore, from the results obtained it can be concluded that the chia seed oil modulates the antioxidant enzymes.

**Keywords:** Acetylcholine; Acetylcholinesterase; Chia oil.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Transmissão do impulso Nervoso pela Acetilcolina.....	15
Figura 2 – Síntese e hidrólise da Acetilcolina.....	17
Figura 3 – Atividade da enzima acetilcolinesterase em rim de ratos.....	22
Figura 4 - Atividade da enzima acetilcolinesterase em fígado de ratos.....	23
Figura 5 - Atividade da enzima butirilcolinesterase em rim de ratos.....	23
Figura 6 - Efeito de diferentes concentrações do óleo da semente de chia na atividade da enzima glutationa-S-transferase hepática.....	25

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	13
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	13
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
<b>3.1 Sistema colinérgico</b> .....	14
<b>3.2 Colinesterases</b> .....	15
<b>3.3 Enzima Glutathione-S-Transferase (GST)</b> .....	17
<b>3.4 Semente de chia (<i>Salvia hispanica L.</i>)</b> .....	18
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
<b>4.1 Materiais</b> .....	20
<b>4.2 Atividade <i>in vitro</i> da enzima Acetilcolinesterase (AChE)</b> .....	20
<b>4.3 Análise de interação do óleo de chia com a enzima GST</b> .....	21
<b>4.4 Determinação de proteína</b> .....	21
<b>4.5 Análise estatística</b> .....	21
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
<b>5.1 Atividade <i>in vitro</i> da enzima acetilcolinesterase (AChE)</b> .....	22
<b>5.2 Análise de interação do óleo de chia com a enzima GST</b> .....	25
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	27
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28

## 1 INTRODUÇÃO

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor do sistema colinérgico difundido por todo o sistema nervoso. Os neurônios colinérgicos estão relacionados com importantes funções como o alerta, o controle motor, o aprendizado e a memória, e todas essas ações exercidas pela ACh são prejudicadas quando há deficiências na secreção desse neurotransmissor (VINUTHA et al., 2007).

As colinesterases são enzimas responsáveis por hidrolisar o neurotransmissor ACh nas sinapses colinérgicas. São divididas em dois tipos: a acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8). A AChE é predominantemente encontrada em cérebro, junção neuromuscular e eritrócitos, e hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, como o neurotransmissor acetilcolina (ACh).

A BChE é mais encontrada em plasma, rins, fígado, intestino, pulmão e tem uma distribuição neuronal mais restrita que a AChE, hidrolisando preferencialmente outros tipos de ésteres como a butirilcolina (BCh) (COKUGRAS et al., 2003).

Alguns autores sugeriram a hipótese colinérgica, onde analisaram que indivíduos com a doença de Alzheimer apresentavam uma concentração reduzida de acetilcolina quando comparados a indivíduos que não foram atingidos pela doença (POTTER et al., 2011).

Baseando-se no déficit colinérgico, diversos medicamentos desenvolvidos para o tratamento da Doença Alzheimer visam aumentar a disponibilidade de acetilcolina nas fendas sinápticas. A ação inibitória da AChE proporciona um acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, melhorando assim a transmissão colinérgica. Após realizarem algumas pesquisas, estudiosos constataram que óleos essenciais, extratos de plantas apresentam atividade anticolinesterásica (TREVISAN et al., 2003).

A Glutathione-S-Transferase (GST) (E.C 2.5.1.18) é um grupo de enzimas que apresentam especificidades comuns em relação ao seu substrato aceptor eletrofílico. Uma das características da GST é a elevada especificidade pela glutathione reduzida a GSH, que após ser combinada, apresenta maior especificidade para receber um segundo substrato. A GSH é formada pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato, que é o cofator para a GST. A capacidade redutora da GSH é determinada pelo grupamento SH, presente no aminoácido cisteína. É considerada a

principal enzima detoxificante e desempenha o papel fisiológico na iniciação da detoxificação de potenciais alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos, gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos (COELHO et al, 2014).

A semente de chia (*Salvia hispânica L.*) possui uma quantidade significativa em óleo (cerca de 40%), sendo a maior parte triglicérides, nos quais ácidos graxos poli-insaturados estão presentes em maiores proporções, como o conteúdo de ácido linolênico (Ômega-3), que está presente entre 60 e 68% em sua composição (CAPITANI et al., 2012).

Os ácidos graxos poli-insaturados como o Ômega-3 têm ajudado na redução de triacilglicerol e concentração de colesterol no soro sanguíneo. Além disso, apresenta efeito benéfico em relação a doenças coronárias, hipertensão, desordens inflamatórias, a colite ulcerativa, câncer, artrite, depressão, mal de Alzheimer, entre outros (MORAES e COLLA, 2006; BORNEO et al., 2007). São considerados ácidos graxos estritamente essenciais, pois não podem ser sintetizados pelo organismo, devendo ser adquiridos através da dieta.

Portanto o presente trabalho tem como objetivo verificar se o óleo de chia possui atividade moduladora na AChE, BChE e GST em fígado e rim de ratos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a modulação do óleo da semente de chia (*Salvia hispânica* L.) na atividade enzimática *in vitro* da enzima acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE) e glutationa-S-transferase (GST) em fígado e rim de ratos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade da AChE e BChE frente a diferentes concentrações do óleo de chia;
- Definir as concentrações de óleo de chia necessárias para alterar a atividade enzimática da AChE e BChE;
- Verificar se o óleo de chia tem a capacidade de inibir *in vitro* a atividade das enzimas AChE e BChE em fígado e rim de ratos;
- Determinar a cinética de reação da enzima AChE e BChE na presença de diferentes concentrações de óleo de chia;
- Analisar a interação do óleo de chia com a enzima Glutaciona-S-Transferase (GST) *in vitro* em fígado hepático de rato.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Sistema colinérgico

O sistema colinérgico é uma das mais importantes vias de modulação do sistema nervoso central (SNC) desempenhando um papel fundamental em várias funções de nosso organismo (MESULAM et al., 2002). As colinesterases são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica.

No sistema nervoso central são encontrados os neurônios que exercem funções de sensibilidade, atividade muscular e regulação de secreções de glândulas. Possuem a capacidade de responder a estímulos e transformá-lo em uma ação. O potencial de ação é um sinal elétrico que se propaga pela membrana de um neurônio (TORTORA; DERRICKSON, 2010).

A sinapse colinérgica caracteriza-se por possuir a acetilcolina como neurotransmissor. No sistema nervoso periférico, ela é liberada por todos os neurônios motores do sistema nervoso somático e, no sistema nervoso autônomo, por todos os neurônios pré-ganglionares, além dos neurônios pós-ganglionares do sistema nervoso parassimpático e dos pós-ganglionares que inervam as glândulas sudoríparas, pertencentes ao sistema nervoso simpático.

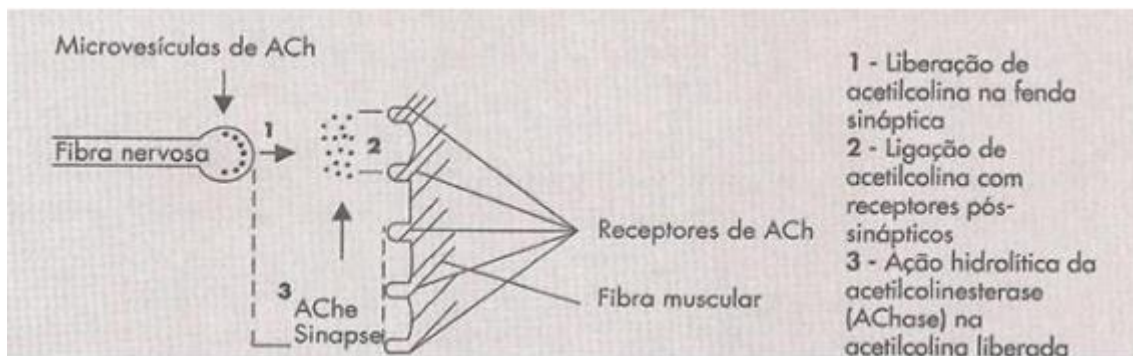
Já no sistema nervoso central, a ACh é distribuída por todo o cérebro, particularmente nas regiões do córtex cerebral, prosencéfalo basal, hipocampo, diencéfalo, ponte e, em menor quantidade, no cerebelo (VINUTHA et al., 2007).

O neurotransmissor acetilcolina é sintetizado no citosol do neurônio a partir da acetilcoenzima-A e da colina. Sendo formado e armazenado em vesículas nas terminações nervosas e é liberado na célula pré-sináptica após despolarização do neurônio colinérgico. Quando liberada na fenda sináptica, a acetilcolina encontra-se com os receptores pré e pós-sinápticos, podendo ser ligada a um receptor ou degradada (BERTÉ, 2009; SILVA; et al, 2002; FONSECA, 2011).

Os receptores de ACh estão em macromoléculas encontradas nas membranas pré- e pós-sináptica, sendo esses receptores classificados como nicotínicos e muscarínicos. No entanto, a molécula de ACh possui a característica de flexibilidade, podendo variar sua estrutura de acordo com a afinidade específica de acordo com o receptor que tenha que interagir (XIA, WANG, 2012).

Os nicotínicos estão presentes nas sinapses entre o neurônio e os músculos estriados e também nas sinapses ganglionares. Os muscarínicos nas sinapses colinérgicas neuromiocardia, neuromuscular lisa (nas vísceras), neuroglandular, neuronal (em certos circuitos do sistema nervoso (SILVA; et al, 2002).O mecanismo de transmissão sináptica pela acetilcolina é demonstrado na figura a seguir.

**Figura 1** – Transmissão do impulso Nervoso pela Acetilcolina.



Fonte: CALDAS, 2000, p.13

Alguns autores sugeriram a hipótese colinérgica, onde analisaram que indivíduos com a doença de Alzheimer apresentavam uma concentração reduzida de acetilcolina, quando comparados a indivíduos que não foram atingidos pela doença (POTTER, P. E. et al. 2011; AULD, 2002).

Baseando-se no déficit colinérgico, diversos medicamentos desenvolvidos para o tratamento da Doença Alzheimer visam aumentar a disponibilidade de acetilcolina nas fendas sinápticas. A ação inibitória da AChE proporciona um acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, melhorando assim a transmissão colinérgica. Trabalhos presentes na literatura constataram que óleos essenciais, extratos de plantas apresentam uma atividade anticolinesterásica (TREVISAN et al. 2003; ORHAN, 2009).

### 3.2 Colinesterases

A acetilcolinesterase, localizada na fenda sináptica, hidroliza a acetilcolina em colina e acetato (TAYLOR e BROWN, 1999). As colinesterases (ChEs; EC 3.1.1.x) são enzimas do grupo das  $\alpha/\beta$  hidrolases. As  $\alpha/\beta$  hidrolases têm uma habilidade de fornecer um arcabouço estável de sítios ativos de uma ampla

variedade de enzimas, sendo que a tríade catalítica, altamente conservada, é formada por um nucleófilo composto por resíduos de serina, cisteína ou ácido aspártico, um resíduo ácido e um resíduo de histidina (NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

Estas enzimas são classificadas de acordo com as suas propriedades catalíticas, especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ et al., 1993). Existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8).

A AChE é predominantemente encontrada em cérebro, (10 vezes mais abundante que a BChE), junção neuromuscular e eritrócitos e hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, tal como o neurotransmissor acetilcolina (ACh). Já a BChE, é principalmente encontrada em plasma, rins, fígado, intestino, pulmão e tem uma distribuição neuronal muito mais restrita que a AChE hidrolisando preferencialmente outros tipos de ésteres como a butirilcolina (BCh) (COKUGRAS et al., 2003).

A AChE ou acetil-hidrolase, é uma enzima regulatória responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos. É a enzima mais eficiente em hidrolisar ésteres de colina e sua eficiência catalítica bem como sua alta reatividade com vários inibidores covalentes e não covalentes são determinadas pela arquitetura funcional única do seu sítio ativo (MATOS, 2012).

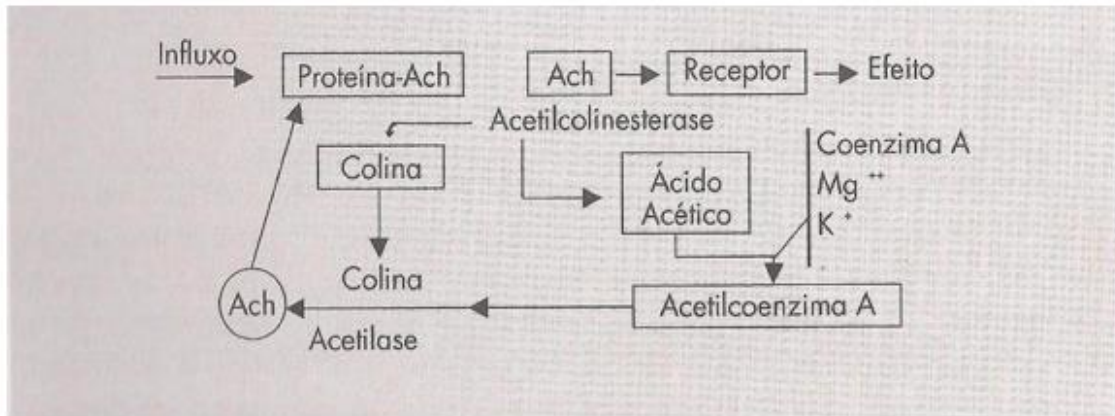
A BChE (EC 3.1.1.8), é sintetizada no fígado, sendo também encontrada no plasma, músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, massa branca do cérebro e coração (WESCOE et al., 1947). Hidrolisa vários ésteres de colina, desde a acetilcolina até a heptanoilcolina, sendo mais eficiente na hidrólise da butirilcolina.

A sequência de aminoácidos da BChE e da AChE tem 53% de identidade, sendo bem conservada no sítio ativo, apresentam respostas similares a diversos inibidores e semelhança imunológica (GEORGE et al., 2001).

A acetilcolina liga-se a AChE e é hidrolisada, liberando a colina e acetado, que podem ser reutilizados para produção de novas moléculas de acetilcolina. A síntese e hidrólise da acetilcolina são demonstradas na figura 2.



**Figura 2** – Síntese e hidrólise da Acetilcolina.



Fonte: CALDAS, 2000, p.12

### 3.3 Enzima Glutationa-S-Transferase (GST)

A Glutationa-S-Transferase (GST) (E.C 2.5.1.18) é um grupo de enzimas que apresenta especificidades comuns em relação ao seu substrato aceptor eletrofílico. Uma das características da GST é a elevada especificidade pela glutatona reduzida a GSH. Após ser combinada, ela apresenta maior especificidade para receber um segundo substrato. A GSH é formada pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato, que é o cofator para a GST (COELHO, 2014).

A capacidade redutora da GSH é determinada pelo grupamento SH, presente no aminoácido cisteína. É considerada a principal enzima detoxificante e desempenha o papel fisiológico na iniciação da detoxificação de potenciais alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos, gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos. A reação de conjugação do grupo sulfidrílico da glutatona com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos, catalizadas pela GST, torna os produtos de reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando sua excreção (PRAKASH ., et al 2017).

Diferentes compostos, incluindo alguns xenobióticos tóxicos e produtos reativos de processos intracelulares, como peroxidação de lípideos, atuam como substratos para a GST (JIN., et al 2012).

A enzima é amplamente encontrada em fígado de mamíferos e desempenha um papel fisiológico na iniciação de detoxificação de potenciais agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos, gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos (DUNN., et al 2010).

### 3.4 Semente de chia (*Salviahispanica L.*)

A semente é nativa da região entre o centro-oeste do México ao norte da Guatemala. Cultivada por mais de dois milênios no México e na Colômbia, onde os maias e astecas utilizavam-no para aumentar a resistência física, como fonte importante de energia na alimentação, e atualmente são utilizadas na culinária em todo o mundo, relacionadas á diversas propriedades medicinais (ALI 2012).

Com a tendência de consumo de produtos naturais, ou que apresentem efeito benéfico, os consumidores buscam, na escolha do produto, associar saúde e bem-estar, situação que pode ser claramente observada no mercado com o fornecimento de produtos distinguidos pelo seu conteúdo em ômega ( $\omega$ ), antioxidantes, fibras e outros componentes que os consumidores estão aprendendo a reconhecer como uma contribuição saudável (MARTINEZ et al., 2012).

A semente de chia (*Salvia hispanica L.*) apresenta em sua composição, cerca de 40% de óleo, sendo a maior parte de seus constituintes triglicerídeos, nos quais ácidos graxos poli-insaturados estão presentes em maiores proporções, como por exemplo, o conteúdo de ácido linolênico (Ômega-3) presente entre 60 e 68% (CAPITANI et al., 2012).

Os ácidos graxos poli-insaturados tais como o Ômega-3 têm ajudado na redução de triacilglicerol e de colesterol no soro sanguíneo, além disso, apresenta efeito benéfico em relação a doenças coronárias, hipertensão, desordens inflamatórias, a colite ulcerativa, câncer, artrite, depressão, mal de Alzheimer, entre outros (MORAES e COLLA, 2006; BORNEO et al., 2007).

A semente de chia tem se tornado cada vez mais importante para a saúde e nutrição humana devido ao seu teor de óleo que é uma excelente fonte de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) como o ácido linoleico (LA, de 17 a 26%) e o alfa – linolênico (LNA, até 68%) (AYERZA e COATES, 2000). O LNA (18:3n-3) e o LA (18:2n-6) são os precursores da série ômega 3 (n-3) e ômega 6 (n-6), respectivamente, sendo considerados ácidos graxos estritamente essenciais, pois não podem ser sintetizados pelo organismo, devendo ser adquiridos através da dieta (MORAES e COLLA, 2006).

A composição da semente ainda inclui 25% de proteínas de alto valor biológico e 30% de fibras (5,7% solúveis e 24,3% insolúveis). A presença de antioxidantes como glicosídeos fenólicos, ácido clorogênico, ácido cafeico,

quercetinae outros flavonoides, os quais têm comprovados efeitos contra doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (MUÑOZ et al., 2012).

Contém uma quantidade de compostos com potente atividade antioxidante devido a substâncias como miricetina, quercetina, kaempfenol e ácido cafeico. Esses compostos são antioxidantes primários e sinérgicos que contribuem para a sua potente atividade antioxidante. A importância destes é a atividade contra a oxidação de lipídios que afeta não só a qualidade dos alimentos como também a saúde do consumidor (CASTROMARTINEZ et al., 1986; TAGA et al., 1984).

Battiston e Pereira (2013) realizaram estudos com ratos Wistar, para comprovar o benefício hipocolesterolêmico do Ômega 3 retirado da semente de chia, onde as cobaias foram tratadas com suplementação da semente, resultando em menor nível de Colesterol Total quando o suplemento da Chia era maior.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Óleo de chia (Veris) extraído a frio foi armazenado em frasco âmbar e congelado para preservação das características naturais do produto. Os reagentes ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), iodeto de acetiltiocolina, tampão fosfato de potássio, ácido tricloroacético (TCA), foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

A enzima cristalizada em pó GSH, o substrato CDNB, albumina e o corante coomassie brilliant blue foram obtidos diretamente a SIGMA. As amostras de fígados de rato foram obtidas com a UFSM (Universidade Federal de Santa Maria) no Rio Grande do Sul.

Os equipamentos UV-Vis, banho maria, cronômetro, cubeta, micropipetas, ponteiros, tubos de ensaio e entre outros materiais utilizados para a realização dos experimentos estão disponíveis na UTFPR –Campus Campo Mourão – Paraná no laboratório de pesquisas do programa de pós-graduação em tecnologia de alimentos -PPGTA.

### 4.2 Atividade *in vitro* da enzima Acetilcolinesterase (AChE)

A avaliação *in vitro* da atividade da AChE em tecido hepático de ratos na presença de óleo de chia foi conduzida pelo método descrito previamente por Ellman et al., (1961) com algumas adaptações. A mistura continha 1,04 mM de DTNB (ácido 5'-5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)), 24 mM de tampão fosfato de potássio pH=7,2 e a amostra. O meio foi pré-incubado por 2 minutos à 25°C e então adicionado 0,83 mM de ASCh (acetiltiocolina). A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis (Ocean Optics, modelo USB-650-UV-VIS Red Tide), observando-se o aumento na absorbância das amostras em 412 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (% do controle).

A técnica tem como objetivo avaliar a degradação pela AChE da acetiltiocolina em acetato e tiocolina seguida da reação da tiocolina com o DTNB para formar TNB, um composto de coloração amarelada. Assim, quanto maior for a concentração de tiocolina formada, maior será a atividade da AChE.

### **4.3 Análise de interação do óleo de chia com a enzima GST**

Para a determinação da GST seguiu-se o protocolo segundo Habig (HABIG et al., 1981), para isso pesaram-se 0,1536 gramas de GSH, diluindo em 5 mL de água destilada. Para o CDNB pesaram-se 0,0506 gramas, diluídas em 10 mL de etanol. Ambos reagentes foram preparados etiquetados e armazenados em condições adequadas.

Em uma cubeta foram adicionados 150  $\mu$ L de tecido hepático, quantidade de água destilada variável de acordo com o ajuste de óleo de chia a ser adicionado, 20 $\mu$ L de óleo de chia, 20 $\mu$ L de GSH e por fim 20  $\mu$ L de CDNB, seguidos de uma pré incubação à 25 °C por 2 minutos com exceção do CDNB adicionado no momento da leitura. Em seguida, foram realizadas as leituras com comprimento de onda de 340 nm, por 4 minutos com intervalo de 15 segundos. Os resultados foram expressos em  $\mu$ mol de GSH/min/mg de proteína .

### **4.4 Determinação de proteína**

A determinação da quantidade de proteínas seguiu-se conforme o protocolo de Bradford (BRADFORD, 1976), no qual foram pesado 5 mg de albumina e dissolvidas em 5 mL de água. As amostras foram dosadas mediante o uso de espectrofotômetro com comprimento de onda em 595nm.

### **4.5 Análise estatística**

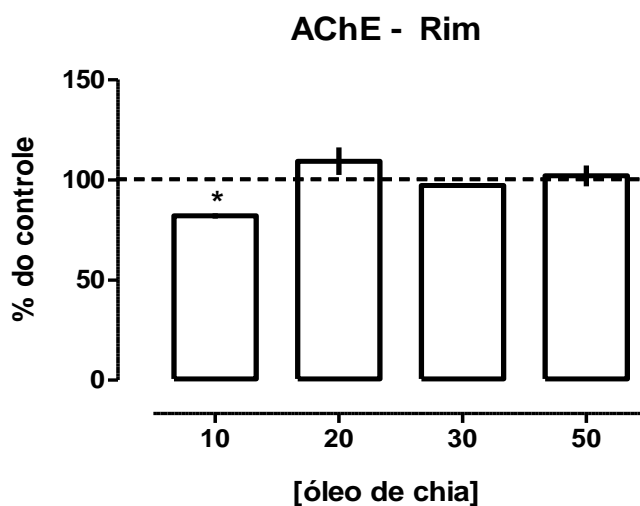
A análise de variância (ANOVA) de uma via foi executada com a finalidade de verificar a existência de diferença significativa entre os grupos estudados. O teste de comparação múltipla de SNK foi o *post hoc* selecionado para identificar os pares de médias que diferiram entre si. Para isso, foi utilizado o software GraphadPrism versão 5.0 considerando nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

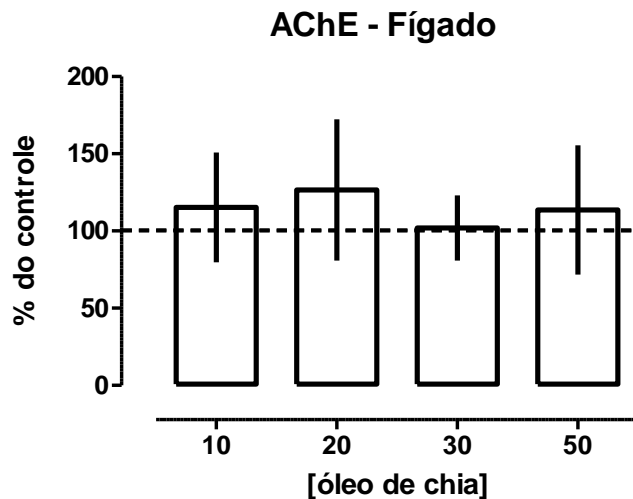
### 5.1 Atividade *in vitro* da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A figura 3 mostra uma inibição significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade da AChE de rim de ratos somente quando utilizado 10 $\mu$ L de óleo de chia. Os demais resultados indicam nenhuma alteração na atividade da AChE tanto em rim (figura 3) quanto em fígado (figura 4). Observa-se na figura 5 que o óleo da semente de chia não altera a atividade da enzima BChE em rim de ratos.

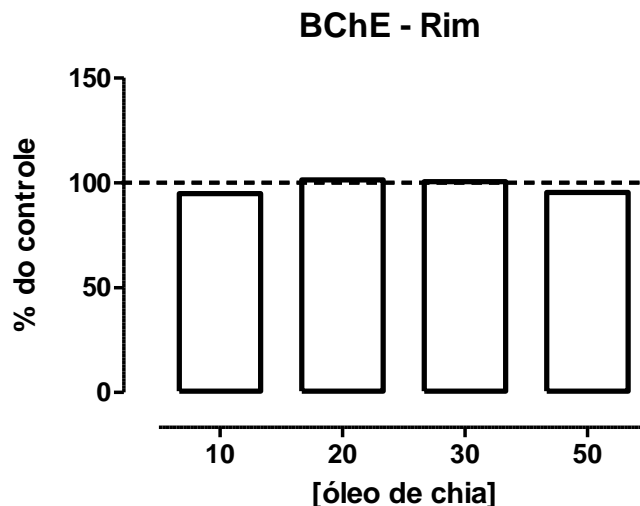
**Figura 3.** Atividade da enzima acetilcolinesterase em rim de ratos. Os resultados estão em média $\pm$ SEM. Os dados foram analisados em ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de SNK, com índice de significância de  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle).



**Figura 4.** Atividade da enzima acetilcolinesterase em fígado de ratos. Os resultados estão em média±SEM. Os dados foram analisados em ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de SNK, com índice de significância de  $p < 0,05$ .



**Figura 5.** Atividade da enzima butirilcolinesterase em rim de ratos. Os resultados estão em média±SEM. Os dados foram analisados em ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de SNK, com índice de significância de  $p < 0,05$ .



Em estudo realizado por Okello et al. (2008) diversos óleos essenciais demonstraram atividade inibitória na AChE, como *Narcissus poeticus L.* *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* (Siramou et al., 2009) e diversos óleos da família *Lamiaceae* apresentaram modulação na atividade da enzima AChE (DOHI et al., 2009).

O óleo de chia apresenta em sua composição óleos essenciais, substância esta que já apresentou resultados satisfatórios quando utilizada para inibição enzimática em experimentos realizados por outros autores, assim como também

obtivemos um resultado satisfatório, com uma inibição significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade da AChE de rim de ratos somente quando utilizado na concentração de 10 $\mu$ L de óleo de chia, sendo que os demais resultados indicaram nenhuma alteração na atividade da AChE, tanto em rim quanto em fígado de ratos.

Óleos essenciais tem sido utilizado na terapia da doença de Alzheimer em vários estudos que comprovaram sua eficácia. Assim como óleos essenciais do gênero *Salvia* tem sido utilizado em estudos *in vitro* e apresentaram resultados positivos (PERRY, 2003).

Em experimentos realizados com ratos, em que foram administradas doses diárias de óleo essencial de *Salvia lavandulaefolia*, foi constatado a inibição da AChE com melhora na doença de Alzheimer. Nos experimentos com humanos houve uma importante melhora cognitiva e comportamental no grupo que foi administrado o óleo essencial, quando comparado ao controle (PERRY, 2003; LOIZZO, 2009).

Diversos estudos têm sido realizados com objetivo de se encontrarem substâncias naturais com atividade inibitória da AChE. Deste modo, extratos de plantas medicinais tem sido objeto de diversos estudos. Vários extratos avaliados por vários autores mostraram propriedades como pró-colinérgica, antioxidante, anti-amiloide e anti-inflamatória, indicando o uso promissor de substâncias provenientes de fármacos vegetais no tratamento de pacientes com DA (ANEKONDA & REDDY, 2005).

De acordo com Chattipakorn e colaboradores (2007) o extrato metanólico da espécie *Tabernaemontanadivaricata* foi capaz de inibir em 90% a atividade da enzima AChE quando testado *in vitro*. Vieira e colaboradores (2008) avaliaram o potencial anticolinesterásico de frações de treze alcaloides obtidos de *Tabernaemontanalaeta* e *Tabernaemontanahytrix* e confirmaram a atividade para alguns dos alcaloides avaliados.

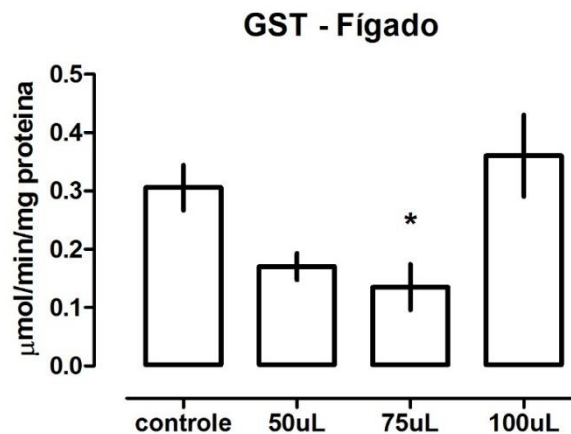
*Amburana cearensis* (cumaru), cujo extrato inibiu a enzima em 100% segundo Kang e colaboradores (2001), é uma planta rica em cumarina, em *Angelica gigas*. Seu fracionamento bioguiado, utilizando a atividade inibitória da AChE, levou ao isolamento e identificação de uma nova cumarina e ao isolamento de mais 11 cumarinas já presentes na literatura.



## 5.2 Análise de interação do óleo de chia com a enzima GST

Observa-se na Figura 6 que a atividade da enzima glutathione-S-transferase hepática foi inibida e teve uma tendência de inibição em 50µL de óleo de chia. No entanto somente quando foram adicionados 75µL do óleo da semente de chia é que a inibição foi significativa. Com o resultado, podemos observar que o óleo da semente de chia inibe a enzima GST hepática em experimentos *in vitro*.

**Figura 6.** Efeito de diferentes concentrações do óleo da semente de chia na atividade da enzima glutathione-S-transferase hepática. Análise estatística de uma via (ANOVA), seguido pelo teste *post hoc* de SNK, onde \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle.



ANOVA de uma via, seguido de *post hoc* de SNK, \* $p < 0,05$

SEEHOFER et al. (2009) desenvolveram vários estudos com compostos antioxidantes com a finalidade de reverter ou amenizar doenças ou casos de intoxicação, em sua pesquisa utilizou a curcumina e obteve resultados satisfatórios, podendo ser utilizada em terapias alternativas contra a injúria cerebral associada à neurotoxicidade. Com os resultados obtidos da interação do óleo de chia com a enzima GST, podemos concluir que óleo de chia pode amenizar este efeito recuperando o nível normal de ACh ou inibindo sua degradação.

Na análise de interação do óleo de chia com a enzima GST, podemos observar que a atividade da enzima glutathione-S-transferase hepática foi inibida, apresentando tendência de inibição em 50µL de óleo de chia. No entanto, somente quando foi adicionado 75µL do óleo da semente de chia é que a inibição foi significativa. Com este resultado, podemos concluir que o óleo da semente de chia inibe a enzima GST hepática em experimentos *in vitro*.

A presença de compostos antioxidantes do óleo de chia pode ter contribuído para a atividade inibitória observada nos experimentos, visto que a glutathione (GSH) é um marcador da saúde celular e sua queda é indicativa de lesão oxidante.

## 6 CONCLUSÕES

Com base no resultado dos experimentos realizados foi possível observar a atividade inibitória do óleo de chia nas enzimas, quando utilizado 10  $\mu$ L do óleo de chia houve uma inibição significativa na atividade da enzima acetilcolinesterase. Já para enzima glutathione-S-transferase hepática observou-se uma inibição significativa quando adicionado 75 $\mu$ L do óleo da semente de chia. Demonstrando o benefício do consumo da semente de chia, assim como sua possível utilização para tratamento de algumas doenças que envolvam essas enzimas dentre elas a demência, sendo um composto natural que apresenta atividade anticolinesterásica *in vitro*, porém mais experimentos necessitam ser realizados para um melhor aprofundamento dos resultados.

## REFERÊNCIAS

- ALI, et al. The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L. **J of Biomed and Biotech.** 2012.
- ANEKONDA, T.S.; REDDY, P.H. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease. **Brain Res Rev.** 50: 361-376.2005.
- AULD DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition and treatment strategies. **Prog Neurobiol.**;68(3):209-45.2002.
- AYERZA, R; COATES, W. Dietary levels of chia: Influence on Yolk Cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. **PoultrySci**, V. 79, P 724739, 2000.
- BATTISTON, FrancielleGarghetti; PEREIRA, Cristiani. **Efeitos do consumo de Ômega 3 extraído de Salviahispanica na redução dos Níveis Séricos de Colesterol e Triglicerídeos em ratos tratados com dieta hipercalórica.** Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 3, n. 1, 2013.
- BERTÉ, TALITA E. Estudo da atividade anticolinesterásica dos compostos taraxerol e ácido ursólico: implicações sobre o processo de memória. **Dissertação de Mestrado.**100f Universidade do Vale Itajaí, Itajaí –SC (2009).
- BORNEO, R.; KOCER, D.; GHAI, G.; TEPPER, B.; J. KARWE, M. V. Stability and consumer acceptance of long-chain omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic acid, 20:5, n-3 and docosahexaenoic acid, 22:6, n-3) in cream-filled sandwich cookies. **J. FoodSci.** v. 72, n. 1, p. S049–54, Jan. 2007.
- BRADFORD, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.**; 72: 248-254.1976.
- CALDAS, Luiz Queiroz; **Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos biperídílicos e piretróides.** 1 a ed. Niterói-RJUFF,. p. 5-25.2000.
- CAPITANI, M. I.; SPOTORNO, V.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Physicochemical and Functional Characterization of By-products from Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds of Argentina. **LWT – Food Sci Tech**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 94-102, 2012.
- CASTRO-MARTINEZ, R.; PRATT, D. E.; MILLER, E. E. Natural Antioxidants of Chia Seeds. In: World Conference On Emerging Technologies In The Fats And Oils Industry, Riverside. **Proceedings.** Illinois, USA: American Oil Chemists' Society, Champaign, 1986. p. 392-396.1986.
- CHATTIPAKORN, S. etal.Tabernaemontanadivaricata extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. **J Ethnopharmacol** 110: 61-68.2007.

COELHO, Michele. Composição, química propriedades funcionais e aplicações tecnológicas da semente de chia ( *Salvia hispânica L*) em alimentos. Campinas,v.17, n 4 p.259-268. 2014:**Braz J. of Food Tech**,2014.

COKUGRAS, A.N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turk J Biochem** 18:54-61, 2003.

DOHI, S., TERASAKI, M., MAKINO, M. 2009. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils. **J. of Agri and Food Chem**, v.57, p.4313-4318.

DUNN, J. The Chia Company Seeks Entry Into European Market. **AustralianFood News**, 2010. Disponível em: <[http:// www.ausfoodnews.com.au/2010/02/08/the-chia-companyseeks-entry-into-european-market.html](http://www.ausfoodnews.com.au/2010/02/08/the-chia-companyseeks-entry-into-european-market.html)>. Acesso em: 24 de Outubro de 2017.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, **BiochemPharmacol** 7:88-90, 1961.

FONSECA, J. L. Síntese de análogos de diidrocumarina e avaliação da atividade anticolinesterásica. Universidade Estadual de Goiás.**Dissertação de Mestrado** Anápolis - GO, 2011.

GEORGE, K.M.; MONTGOMERY, M.A.; SANDOVAL, L.E.; THOMPSON, C.M. Examination of cross-antigenicity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase using anti-acetylcholinesterase antibodies. **Toxicol. Lett.**, v. 126, p. 99-105, 2001.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione-S-transferases. **Methods Enzymol.** 77:398–405; 1981

JIN, F.; NIEMAN, D.C.; SHA, W.; XIE, G.; QIU, Y.; JIA, W. Supplementation of Milled Chia Seeds Increases Plasma ALA and EPA in Postmenopausal Women. **Plasts Food for Human Nutrition**, Kannapolis, v. 67, n. 2, p. 105-110, 2012.

KANG, S. Y.; LEE, K. Y.; SUNG, S. H.; PARK, M. J.; KIM, Y. C. **J. Nat. Prod.** 2001, 64, 683.

LOIZZO, M.R. et al. (2009) In vitro biological activity of *Salvia leriifoliabenth* essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. **J Oleo Sci** 58 (8): 443- 446.

MARTINEZ, M. L. et al. Chia (*Salvia hispanica L.*) oil extraction: Study of processing parameters. **LWT - Food Sci and Tech**, Argentina, v.47, p.78-82, 2012.

MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in Neurobiology**, v.41, n.1, p.31-91, 1993.

MATOS, K.S. **Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano / Karina Silvia Matos. –Lavras: UFLA, 2012.148 p.:** il. Dissertação (mestrado) –Universidade Federal de Lavras, 2012.

MESULAM, M.M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. **Neuroscience** 110:627-639, 2002.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Functional Foods and Nutraceuticals: Definition, Legislation and Health Benefits. **Bra J of Pharma Sci**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 99-112, 2006.

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W.  $\alpha/\beta$  hydrolase, fold enzymes: the family keeps growing. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 9, n. 6, p. 732-737, June 1999

OKELLO, E.J.; DIMAKI, C.; HOWES, M.R.; HOUGHTON, P.J.; PERRY, E.K. 2008. In vitro inhibition of human acetyl and butyryl-cholinesterase by *Narcissus poeticus* L. **Inter J of Essen Oil Therap**, v. 2, p. 105-110.

ORHAN I., ASLAN, M. . Appraisal of scopolamine- induced anti-amnesic effect in mice and in vitro anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. **J of Ethnophar**, v.122, p.327-332, 2009.

PERRY NSL, BOLLEN C, PERRY EK, BALLARD C (2003). *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacol. Biochem. Behavior** 75: 651- 659.

POTTER, P. E. et al. Pre- and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to amyloid plaque presence and density at preclinical stages of Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol.**, Berlin, v. 122, n. 1, p. 49-60, Jul. 2011.

PRAKASH, A.; RIGELHOF, F.; MILLER, E. **Antioxidant Activity**. Minneapolis: Medallion Labs. 4 p. Disponível em: <[http://www.medlabs.com/downloads/antiox\\_acti\\_.pdf](http://www.medlabs.com/downloads/antiox_acti_.pdf)>. Acesso em: 26 de outubro de 2017.

SEEHOFER, D. et al. Curcumin attenuates oxidative stress and inflammatory response in the early phase after partial hepatectomy with simultaneous intra-abdominal infection in rats. **J Surg Res** 17:1-6, 2009.

SILVA, PENILDON & colaboradores. **Farmacologia**. 6ª Edição. Editora Guanabara Koogan, p. 227 – 275, 2002

SIRAMON, P., OHTANI, Y., ICHIURA, H. 2009. Biological performance of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. **J of Wood Sci**. 2009.

TAYLOR P, BROWN JH. 1999. Acetylcholine. In: Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Alberts, R.W., Fisher, S.K., Uhler, M.D., editors. Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects. 6th ed. New York: **Raven Press**; p. 231–60.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. Princípios de anatomia e fisiologia. **Guanabara**, v.12, p.409- 915, 2010.

TREVISAN, M.T.S.; et al. (2003). Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Quim Nova**, 26: 301-304.

VIEIRA, I.J.C. et al. 2008. Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures. **An Aca Bras Cien** 80: 419-426.

VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **J of Ethnophar**, v.109, p.359-63, 2007.

WESCOE, W.C.; HUNT, C.H.; RIKER, W.F. e LITT, I.C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol.**, v. 149, p. 549-51, 1947.

XIA, Y.; WANG, Q.; XU, Y; YAN, J.; ZHOU, P.; LI, J.; GAO, H. Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Prog in Neurobiol**, v. 97, p.1–13, 2012.