

SELIN-11-EN-4-ALFA-OL ALTERA POTENCIAL DE MEMBRANA EM SINAPTOSSOMA DE CAMUNDONGO

Patrícia Rodrigues¹

Quelen Iane Garlet²

André Luís Londero³

Carlos Fernando Mello⁴

Berta Maria Heinzmann⁵

Resumo:

Nectandra grandiflora Nees, é produtora de óleo essencial (OE) e se tornou alvo de pesquisas devido ao seu potencial biológico/ farmacológico. Este OE é composto majoritariamente por sesquiterpenoides, dentre eles destaca-se o constituinte selin-11-en-4-alfa-ol (SEL). Este composto possui atividades farmacológicas que refletem o seu potencial, como as atividades antimicrobiana e repelente de carrapatos. Além disso, o composto SEL possui estrutura química semelhante à outra substância presente no OE de *N. grandiflora*, denominada de (+)-deidrofuquinona, cuja atividade depressora do sistema nervoso central (SNC) foi descrita em estudos recentes. Sinaptossomas são estruturas vesiculares constituídas de terminais pré-sinápticos e são consideradas um modelo in vitro que mimetiza a função sináptica. Este modelo vem sendo utilizado para a elucidação de vias de sinalização que regulam a neurotransmissão, fluxo iônico e interação de proteínas sinápticas com fármacos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do composto SEL sobre o potencial de membrana em sinaptossomas de camundongo. O OE foi submetido ao fracionamento através de coluna cromatográfica (CC), utilizando gel de sílica como fase estacionária e mistura de solventes como fase móvel. O OE foi adicionado a uma CC dando origem ao SEL isolado. Adicionalmente, o composto SEL teve seu espectro de massas comparado com o de uma amostra autêntica previamente caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear. Foram utilizados neste estudo camundongos Swiss machos. Essa metodologia foi aprovada pelo Comitê de Ética da UFSM (3627041115). Para a obtenção do tecido, para o preparo dos sinaptossomas os camundongos foram eutanasiados por decapitação e imediatamente foi removido o córtex, o qual foi homogeneizado em meio contendo sacarose seguindo-se uma série de centrifugações e isolamento dos sinaptossomas em gradiente de Percoll. As variações no potencial de membrana sinaptossomal foram detectadas utilizando o indicador fluorescente. O potencial de membrana foi expresso como razão entre a variação de unidades relativas de fluorescência e os valores da linha de base (RFU/F). O composto SEL apresentou ação sobre o potencial de membrana sinaptossomal semelhante ao DZP (1 M) nas

concentrações de 1-100 M. Adicionalmente, este efeito sobre o potencial de membrana, caracterizado como hiperpolarização, foi sustentado durante todo o tempo do teste (70 s), sendo essa uma característica de moléculas capazes de causar inibição neuronal. Em modelos experimentais, um dos mecanismos utilizados para proteção contra hiperexcitabilidade do SNC é o aumento da inibição neuronal através da promoção de hiperpolarização. Além disso, este aumento da inibição neuronal pode resultar em efeitos farmacológicos como efeito ansiolítico, sedativo, hipnótico e anestésico. O sesquiterpenoide (+)-deidrofuquinona, composto majoritário do OE de *N. grandiflora* também induziu hiperpolarização de membrana e este efeito foi ligado a uma atividade neurodepressora in vivo em camundongos. Portanto, o composto SEL, se mostra como uma molécula promissora, uma vez que possui potencial neurodepressor em camundongos. Desse modo, os resultados sugerem que SEL modula o potencial de membrana em camundongos. Desta forma, este composto pode ter a habilidade de induzir atividade de inibição neuronal.

Palavras-chave: *Nectandra grandiflora*; óleo essencial; hiperpolarização

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

SELIN-11-EN-4-ALFA-OL ALTERA POTENCIAL DE MEMBRANA EM SINAPTOSSOMA DE CAMUNDONGO

¹ Aluno de graduação. patriciarodriguesp09@gmail.com. Autor principal

² Aluno de pós-graduação. qgarlet@gmail.com. Co-autor

³ Aluno de graduação. londero.andreluis@gmail.com. Co-autor

⁴ Docente. cf.mello@smail.ufsm.br. Co-autor

⁵ Docente. berta.heinzmann@gmail.com. Orientador



SELIN-11-EN-4-ALFA-OL ALTERA POTENCIAL DE MEMBRANA EM SINAPTOSSOMA DE CAMUNDONGO

1. INTRODUÇÃO

Nectandra grandiflora Nees, conhecida popularmente como canela-amarela, é nativa e endêmica do Brasil, sendo encontrada no sudeste e sul do país (BAITELLO, 2003; MARQUES, 2007; QUINET, 2017). Esta espécie é produtora de óleo essencial (OE) e se tornou alvo de pesquisas devido ao seu potencial biológico/ farmacológico. Este OE é composto majoritariamente por sesquiterpenoides, dentre eles destaca-se o constituinte selin-11-en-4-alfa-ol (SEL) (GARLET et al., 2016; SILVA, D. T., 2013). Este composto possui atividades farmacológicas que refletem o seu potencial, como as atividades antimicrobiana e repelente de carrapatos (CANTRELL; CARROLL; KLUN, 2007; RASOANAIVO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016). Além disso, o composto SEL possui estrutura química semelhante à outra substância presente no OE de *N. grandiflora*, denominada de (+)-deidrofuquinona, cuja atividade depressora do sistema nervoso central (SNC) foi descrita em estudos recentes (GARLET et al., 2016; GARLET et al., 2017).

Algumas estratégias são utilizadas para avaliar a ação de compostos com possível atividade neurodepressora, como por exemplo a modulação do potencial de membrana em sinaptossomas. Sinaptossomas são estruturas vesiculares constituídas de terminais pré-sinápticos e são consideradas um modelo *in vitro* que mimetiza a função sináptica. Este modelo vem sendo utilizado para a elucidação de vias de sinalização que regulam a neurotransmissão, fluxo iônico e interação de proteínas sinápticas com fármacos (DUNKLEY; JARVIE; ROBINSON, 2008; ERECIFISKA et al., 1996; PHILLIPS et al., 2001). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do composto SEL sobre o potencial de membrana em sinaptossomas de camundongo.

2. METODOLOGIA

2.1 ISOLAMENTO DO CONSTITUINTE SEL

O OE foi submetido ao fracionamento através de coluna cromatográfica (CC), utilizando gel de sílica 60 (Macherey-Nagel, 70-230 mesh), como fase estacionária na proporção óleo/adsorvente de 1:100 e mistura de solventes como fase móvel. O OE (SEL: 5,09%) foi adicionado a uma CC (650 mm de comprimento x 75 mm de diâmetro; eluente: hexano/acetona, 95:5; fluxo livre; 100 mL/ fração) dando origem a frações contendo o SEL isolado (450 mg; 97%). As frações de coluna foram concentradas em rotaevaporador e o constituinte isolado foi mantido a -4°C até os ensaios. A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foi realizada em um sistema hifenado AGILENT 7890A, equipado com um detector seletivo de massas AGILENT série 5975C. Os componentes foram identificados com base nos índices de retenção de Kovats (IK), determinados através da utilização de uma curva de calibração de uma série homóloga de n-alcenos (C8-C40) (ADAMS, 2011; NIST, 2008). Adicionalmente, o composto SEL

teve seu espectro de massas comparado com o de uma amostra autêntica previamente caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear.

2.2 ANIMAIS

Foram utilizados neste estudo camundongos Swiss, machos (25-30 g), obtidos do Biotério central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 h (Luzes acesas das 07 às 19h) em caixas de polipropileno, em temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e com livre acesso à água e alimento (ração comercial). Essa metodologia foi aprovada pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFSM e registrada sob número 3627041115.

2.3 PREPARAÇÃO DOS SINAPTOSSOMAS

Os sinaptossomas foram preparados de acordo com método adaptado de (NAGY; DELGADO-ESCUETA, 1984). Para a obtenção do tecido, camundongos foram eutanasiados por decapitação e imediatamente foi removido o córtex, o qual foi homogeneizado em meio contendo sacarose 320 mM, HEPES 5 mM e EDTA 0,1 mM em pH 7,4, seguindo-se uma série de centrifugações e isolamento dos sinaptossomas em gradiente de Percoll. O conteúdo proteico foi determinado usando o método de Bradford (1976). Os sinaptossomas foram mantidos a 4°C e usados entre 3–4 h após sua obtenção. A viabilidade dos sinaptossomas foi monitorada em paralelo a cada experimento através do ensaio enzimático da lactato desidrogenase (LDH), realizado com kit comercial (LDH kit, Biotécnica, Brasil). A absorbância foi medida em 340 nm em equipamento FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader® e a viabilidade foi expressa como porcentagem relativa da liberação máxima de lactato.

2.4 POTENCIAL DE MEMBRANA

As variações no potencial de membrana sinaptossomal foram detectadas utilizando o indicador fluorescente FLIPR-Blue (Molecular Devices, California, USA), o qual indica efeito hiperpolarizante pela diminuição da fluorescência detectada em relação ao potencial basal (antes da adição de substâncias). Todos os experimentos de avaliação de potencial de membrana foram realizados em duplicata e a viabilidade dos sinaptossomas se manteve em $83,4 \pm 2,8\%$. Os dados de fluorescência foram obtidos antes e depois da adição do veículo (líquido cérebro espinhal artificial, aCSF), SEL (0,1 a 100 μM) ou diazepam (DZP, 1 e 10 μM), em um comprimento de onda de emissão de 565 nm (excitação a 530 nm e cut-off a 550 nm) em intervalos de 1,53 s no equipamento FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader®. O potencial de membrana foi expresso como razão entre a variação de unidades relativas de fluorescência e os valores da linha de base ($\Delta\text{RFU}/\text{F}$).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média $\pm$ DP (desvio padrão) e foram submetidos à análise por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares Microsoft Excel® e GraphPad Prism® versão 6.05.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

O composto SEL (Figura 1) apresentou ação sobre o potencial de membrana sinaptossomal semelhante ao DZP (1 μ M) nas concentrações de 1-100 μ M (Figura 2A).

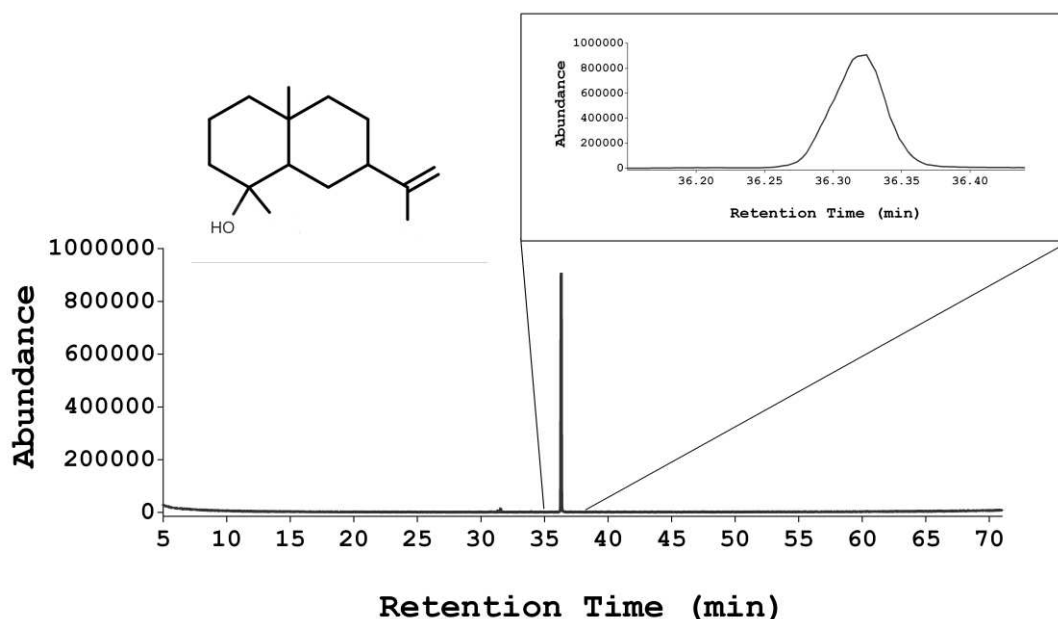


Figura 1. Estrutura química e cromatograma do sesquiterpenoide selin-11-en-4- α -ol

Adicionalmente, este efeito sobre o potencial de membrana, caracterizado como hiperpolarização, foi sustentado durante todo o tempo do teste (70 s) (Figura 2B), sendo essa uma característica de moléculas capazes de causar inibição neuronal (FARRANT; NUSSER, 2005).

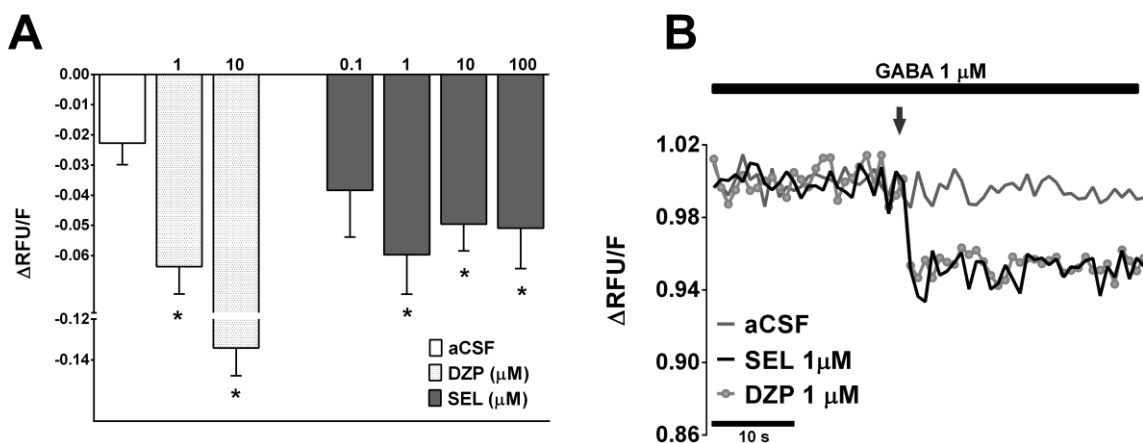


Figura 2. Alterações no potencial de membrana depois da adição do selin-11-en-4- α -ol (SEL) e controle positivo Diazepam (DZP). Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. * $p < 0,001$ versus o grupo controle (aCSF), ANOVA de uma via, teste de Dunnett, $F_{(6, 21)} = 35,84$, $n = 4$.

Em modelos experimentais, um dos mecanismos utilizados para proteção contra hiperexcitabilidade do SNC é o aumento da inibição neuronal através da promoção de hiperpolarização (KAMINSKI; ROGAWSKI; KLITGAARD, 2014;

ROGAWSKI; LOSCHER, 2004). Além disso, este aumento da inibição neuronal pode resultar em efeitos farmacológicos como efeito ansiolítico, sedativo, hipnótico e anestésico (JEMBREK; VLAINIC, 2015). O sesquiterpenoide (+)-deidrofuquinona, composto majoritário do OE de *N. grandiflora* também induziu hiperpolarização de membrana e este efeito foi ligado a uma atividade neurodepressora *in vivo* em camundongos (GARLET et al., 2017). Outros compostos sesquiterpenoides apresentam atividade depressora do SNC, como por exemplo, globulol e espatulenol, para os quais foram descritas sedação e anestesia em peixes da espécie *Rhamdia quelen* (BENOVIT et al., 2015; SILVA, L. L. et al., 2013). Além disso, o beta-cariofileno apresentou as atividades ansiolítica e anticonvulsivante (DE OLIVEIRA et al., 2016; GALDINO et al., 2012) e para o bisaboleno foi descrita uma atividade anticonvulsivante em ratos (ORELLANA-PAUCAR, et al., 2012). Portanto, o composto SEL, se mostra como uma molécula promissora, uma vez que possui potencial neurodepressor em camundongos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados sugerem que SEL modula o potencial de membrana em camundongos. Desta forma, este composto pode ter a habilidade de induzir atividade de inibição neuronal. Entretanto mais estudos são necessários a fim de investigar os efeitos deste composto *in vivo* e avaliar possíveis atividades anticonvulsivante, sedativa e/ou ansiolítica.

5. REFERÊNCIAS

- ADAMS, T. B. e. a. The FEMA GRAS assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavor ingredients. Food and Chemical Toxicology, v.49, n.10, 804 p., 2011.
- BAITELLO, J. B. Lauraceae. In: WANDERLEY, M. G. L. et al (eds). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, Fapesp-Instituto de Botânica, , 2003
- BENOVIT, S. C., et al. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. An Acad Bras Cienc, v.87, n.3, p.1675-1689, 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, p.248-254, 1976.
- CANTRELL, C. L. ;CARROLL, J. F. ;KLUN, J. A. Plant compounds repel ticks. Industrial Bioprocessing, v.29, n.3, p.7-8, 2007.
- DE OLIVEIRA, C. C., et al. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. Epilepsy Behav, v.56, p.26-31, 2016.
- DUNKLEY, P. R. ;JARVIE, P. E. ;ROBINSON, P. J. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. Nat Protoc, v.3, n.11, p.1718-1728, 2008.
- ERECIFISKA, M., et al. Metabolic and energetic properties of isolated nerve ending particles (synaptosomes) Biochimica et Biophysica Acta Bot. Bras., v.1277, n.1-2, p.13-34, 1996.
- FARRANT, M. ;NUSSER, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. Nat Rev Neurosci, v.6, n.3, p.215-229, 2005.
- GALDINO, P. M., et al. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -

caryophyllene, in male mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v.38, n.2, p.276-284, 2012.

GARLET, Q. I., et al. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish model. *Braz J Med Biol Res*, v.49, n.1, p.e4872, 2016.

GARLET, Q. I., et al. (+)-Dehydrofukinone modulates membrane potential and delays seizure onset by GABAA receptor-mediated mechanism in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.332, p.52-63, 2017.

JEMBREK, M. ;VLAINIC, J. GABA Receptors: Pharmacological Potential and Pitfalls. *Current Pharmaceutical Design*, v.21, n.34, p.4943-4959, 2015.

KAMINSKI, R. M. ;ROGAWSKI, M. A. ;KLITGAARD, H. The potential of antiseizure drugs and agents that act on novel molecular targets as antiepileptogenic treatments. *Neurotherapeutics*, v.11, n.2, p.385-400, 2014.

MARQUES, T. P. Subsídios à recuperação de formações florestais ripárias da Floresta Ombrófila Mista do Estado do Paraná, a partir do uso espécies fontes de produtos florestais não-madeiráveis. p.235, 2007.

NAGY, A. ;DELGADO-ESCUETA, A. V. Rapid Preparation of Synaptosomes from Mammalian Brain Using Nontoxic Isoosmotic Gradient Material (Percoll) *Journal of Neurochem*, v.43, n.4, p.1114-1123, 1984.

NIST, N. I. o. S. a. T. Mass spectral library (NIST/EPA/NIH). 2008.

ORELLANA-PAUCAR, A. M., et al. Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy Behav*, v.24, n.1, p.14-22, 2012.

PHILLIPS, G. R., et al. The Presynaptic Particle Web: Ultrastructure, Composition, Dissolution, and Reconstitution. *Neuron*, v.32, n.1, p. 63–77, 2001.

QUINET, A. e. a. *Nectandra* in Flora do Brasil 2020 em construção. v., n., p., 2017.

RASOANAIVO, P., et al. Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Athanasia brownii* Hochr. (Asteraceae) endemic to Madagascar. *Chem Biodivers*, v.10, n.10, p.1876-1886, 2013.

RODRIGUES, P., et al. Antimicrobial activity of Selin-11-en-4 α -ol isolated from *Nectandra grandiflora* essential oil. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2016.

ROGAWSKI, M. A. ;LOSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci*, v.5, n.7, p.553-564, 2004.

SILVA, D. T. Óleos essenciais de *Nectandra grandiflora* e *Ocotea acutifolia*: rendimento, composição química e atividades biológicas. 2013.

SILVA, L. L., et al. Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Braz J Med Biol Res*, v.46, n.9, p.771-779, 2013.