

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DE UMA FRAÇÃO ATIVA DO EXTRATO DE FOLHAS DE *Citrus limon* (L.) Burm

Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho*, Antonia Amanda Cardoso de Almeida e Rivelilson Mendes de Freitas

Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, 64049-550 Teresina – PI, Brasil

Luciano Silva Lima

Instituto Federal da Bahia, Campus Porto Seguro, 45810-000 Porto Seguro – BA, Brasil

Juceni Pereira David

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-290 Salvador – BA, Brasil

Jorge Mauricio David

Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-290 Salvador – BA, Brasil

Chistiane Mendes Feitosa

Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, 64049-550 Teresina – PI, Brasil

Recebido em 18/4/13; aceito em 9/6/13; publicado na web em 2/8/13

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTICHLINESTERASE ACTIVITY OF AN ACTIVE FRACTION OF EXTRACT OF *Citrus limon* (L.) Burm LEAVES. This paper describes the chemical composition and acetylcholinesterase inhibition of an active chromatographic fraction of the EtOAc extract of *Citrus limon* leaves. The composition of the active fraction presented a mixture of two coumarins, 5,8-dimethoxy-psoralen and 5,7-dimethoxycoumarin, identified by ¹H and ¹³C NMR data analysis, including DEPT, COSY, HMBC and HSQC experiments. It was also demonstrated that this mixture presents qualitative and quantitative AChE inhibition. *In vitro* studies indicated a CE50 value of 340 µg/mL with 95% of confidence. *In vivo* studies (10 and 25 mg/kg) revealed inhibition of 30.09 and 30.06% of AChE activity in relation to neostigmine, respectively.

Keywords: *Citrus limon* (L.) Burm; psoraleno; acetylcholinesterase.

INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas com fins medicinais desde o início da civilização humana com a finalidade de prevenção, tratamento e cura de diversas doenças.^{1,2} Nas práticas tradicionais da medicina chinesa, diversas plantas têm sido usadas para tratar distúrbios cognitivos, incluindo doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA).³ A DA é caracterizada por um panorama progressivo de demência comprometendo inicialmente a memória para fatos recentes. Posteriormente, com a evolução da doença pode haver a deterioração das funções cognitivas com apraxias construtivas, agnosias e distúrbios afásicos.⁴

Dados estatísticos apontam que tal doença acomete aproximadamente 5 a 10% da população com idade superior a 65 anos e 20 a 40% daqueles com faixa etária superior a 85 anos.⁵ É estimado que em 2050, mais de 25% da população mundial será idosa, sugerindo um aumento da prevalência e da incidência desta doença, sendo, portanto, extremamente necessária a busca por novas formas de tratamento mais eficazes e seguras.⁶⁻⁸

As áreas cerebrais patologicamente mais afetadas na DA é o hipocampo e o neocórtex. Estas áreas estão associadas às funções mentais de forma mais predominante. Um promissor tratamento para doença é o aumento do nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores da acetilcolinesterase (AChE), justificando as pesquisas por novos agentes mais eficazes e com menor custo para a saúde humana.^{9,10}

Os portadores de DA têm níveis reduzidos de acetilcolina, neurotransmissor que intervém nos processos da memória.¹⁰ Inibidores de AChE são amplamente utilizados no tratamento, uma vez que estes alteram a função colinérgica central ao inibir as enzimas que

degradam a acetilcolina (enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase), ampliando a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores cerebrais, nicotínicos e muscarínicos.^{10,11}

Desde a introdução de medicamentos como Tacrina, Donepezil, Rivastigmina e Galantamina na prática clínica, os inibidores da AChE constituem o tratamento sintomático de escolha para a DA, porém alguns ainda apresentam efeitos colaterais indesejados sobre os diversos órgãos e sistemas, como, sistema cardiovascular, sistema respiratório, trato gastrointestinal, bexiga e sistema nervoso central.^{7,12}

Nesse contexto e após realizar uma revisão de literatura, podem ser apontadas diversos trabalhos com extratos de plantas medicinais e/ou de compostos isolados do gênero *Citrus*, como adstringente, antioxidante, antianêmico, antibiótico, antisséptico, antiemético, antidepressivo, anti-inflamatório, antiespasmódico, bactericida, antireumático e antidisentérico.^{2,10,13,14} Muitas destas atividades podem ser relevantes para o tratamento da DA, justificando a seleção de *C. limon* utilizada nesse estudo para essa possível aplicação terapêutica.

A família Rutaceae consiste aproximadamente de 150 gêneros e 1.600 espécies, distribuídas amplamente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo.¹⁵ No Brasil, a família está representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, com algumas de importância medicinal, ecológica e econômica.¹⁶ O *Citrus* é um gênero que compreende aproximadamente 70 espécies que são ricas em flavonóides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas cerebrais.¹⁰

Citrus limon (Rutaceae) é uma planta do norte e nordeste do Brasil, conhecida popularmente como “Limoeiro”, cujas folhas e frutos são aproveitados pela medicina popular para diversos fins terapêuticos.^{10,17} Nessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo isolar e identificar compostos com potencial inibição da enzima acetilcolinesterase, bem como realizar uma avaliação

*e-mail: rusbenebruno@hotmail.com

qualitativa e quantitativa da atividade desses compostos para verificar suas propriedades farmacológicas com ênfase na prevenção e/ou tratamento da DA.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal e procedimento para obtenção dos extratos

As folhas da espécie *C. limon* (L.) Burm foram coletadas às 8 horas da manhã durante o mês de Fevereiro de 2010 de hortas medicinais existentes nas proximidades do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí no município de Picos, Piauí. Identificada e depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí (UFPI), recebendo a exsicata o número 26.453.

Os extratos foram preparados partindo-se de 1000 g de folhas de *C. limon* (L.) Burm que foram secas à temperatura ambiente e maceradas estaticamente. O material obtido (300 g) foi submetido à extração por um período de cinco dias com os solventes hexano, acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), respectivamente, sendo em seguida concentrados por evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se então os seguintes extratos brutos e seus respectivos rendimentos: hexânico (8,5 g / 2,85%), acetato de etila (9,6 g / 3,2%) e metanólico (28 g / 9,3%). Estes foram cromatografados separadamente em coluna de sílica gel e monitoradas por cromatografia em camada delgada.

Isolamento dos constituintes do extrato de acetato de etila da *C. limon* (L.) Burm

O extrato AcOEt (9,62 g) foi submetido à separação por coluna cromatográfica sob gel de sílica 60, utilizando-se como eluentes, gradiente de Hexano/DCM, DCM/AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH puro, obtendo desse processo 18 frações (F 1-18). As frações DCM/AcOEt (7:3, F 10-11) 1,2215 g foram refractionadas em CC de gel de sílica, utilizando os eluentes DCM, DCM/AcOEt, AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH, gerando 14 frações (F 10-11/1-14).

As frações DCM/AcOEt (F 2-10) 297 mg foram reagrupadas e resubmetidas a cromatografia utilizando os eluentes hexano, hexano/DCM, DCM, DCM/AcOEt, AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH, gerando 62 frações (F 2-10/1-62). As frações DCM (F 18-37) 99 mg foram reagrupadas e submetidas a novo tratamento cromatográfico com hexano, DCM, DCM/AcOEt, AcOEt e MeOH, tendo por fim 24 frações (F 18-37/1-24). As sub-frações (F 2-14) constituída de um pó branco (20 mg), solúvel em diclorometano, com a faixa de ponto de fusão 91-92 °C; o valor do TLC em clorofórmio 100%, R_f = 0,48, que embora apresentasse uma única mancha em CCD, revelou tratar-se de uma mistura de dois constituintes.

A mistura isolada foi caracterizada através da análise de dados obtidos pelos espectros de RMN de ¹H, RMN de ¹³C, DEPT 135, COSY, HMBC e HSQC além de comparação com dados da literatura. Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram registrados em espectrômetro da Varian, modelo Gemini 2000, operando a 300 MHz para o ¹H e 75 MHz para ¹³C. Os deslocamentos químicos foram registrados em δ (ppm) em referência ao TMS.

Ensaio em cromatografia de camada delgada (CCD) – Atividade de inibição qualitativa

A amostra contendo a mistura dos constituintes isolados foi dissolvida em metanol para uma concentração de 1 mg/mL, em seguida aplicada em CCD (DC Alufolien, Silicagel 60 F₂₅₄, 0,2 mm, Merck), e eluída em clorofórmio:metanol 9:1. Após a placa ser desenvolvida,

a atividade inibitória foi detectada utilizando revelador baseado no método de Ellman¹⁸ modificado por Rhee e colaboradores.¹⁹

A placa foi pulverizada com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico])/ATCI (Iodeto de acetiltiocolina) (1 mM DTNB e 1 mM ATCI em tampão A). Depois de seca (5 min) foi pulverizada com 3 units/mL da enzima acetilcolinesterase, tipo VI-s, liofilizada, 292 U/mg sólida, 394 U/mg proteína (Sigma Chemical Co.) e, após 10 min, foi observada a coloração amarela. A visualização da inibição foi feita pela observação de halos brancos. A coloração desaparece em aproximadamente 15 a 30 min. A cafeína foi utilizada como substância padrão.²⁰

Avaliação *in vitro* da atividade da enzima acetilcolinesterase

O efeito inibitório da mistura dos constituintes isolados sobre atividade da enzima acetilcolinesterase *in vitro* é avaliada por uma adaptação do método espectrofotométrico de Ellman e colaboradores¹⁸ e os procedimentos para o ensaio foram detalhados posteriormente em estudos realizados por Moyo e colaboradores.²¹

Para a atividade de inibição quantitativa, foi utilizado um espectrofotômetro Biospectro System 220. Inicialmente, 100 µL da amostra (concentrações de 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 e 0,00625 mg/mL em solução tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8, e 10% de metanol) foram misturados com 100 µL de AChE (0,22 U/mL em 50 mMol/L Tris-HCl, tampão pH 8, 0,1% BSA) e 200 µL de tampão (50 mMol/L Tris-HCl, pH 8, 0,1% BSA). A mistura foi incubada durante 5 min a 30 °C. Posteriormente, 500 µL de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) (3 mMol/L em Tris-HCl, pH 8, 0,1 mol/L de NaCl, 0,02 mol/L MgCl₂) e 100 µL de iodeto de acetiltiocolina (ATCI) (4 mMol/L em água) foram adicionados.

Um teste branco também foi preparado substituindo a enzima AChE com 100 µL de tampão (50 mMol/L Tris-HCl, pH 8, 0,1% BSA). As amostras foram analisadas em triplicata. A reação foi monitorada durante 5 min em 412 nm e velocidade inicial (V₀) gravada. Como controle negativo foi utilizado o Tampão (0,1% de metanol em 50 mMol/L Tris-HCl, pH 8, 10%) e o medicamento neostigmina (Atrovent®) foi usado como padrão. A atividade anticolinesterásica (%I) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$I (\%) = 1 - \left(\frac{V_o \text{ amostra}}{V_o \text{ branco}} \right) \times 100$$

V_o amostra e V_o branco representam as velocidades iniciais de amostras e branco. Os valores da concentração efetiva inibitória de 50% (CE₅₀) foram obtidos por intermédio de plotagem Log-Probit.

Avaliação do efeito inibitório da mistura dos constituintes isolados do extrato de acetato de etila das folhas de *C. limon* (L.) Burm na atividade da enzima acetilcolinesterase *in vivo*

Animais

Nesse estudo foram utilizados 32 camundongos Swiss machos albinos (*Mus musculus*) adultos com dois meses de idade com peso variando entre 25 e 30 gramas, provenientes do Biotério Central do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí.

Os animais foram divididos em quatro grupos de oito camundongos para a avaliação do efeito inibitório da fração isolada na atividade da enzima acetilcolinesterase. O primeiro grupo foi tratado com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% por via oral (v.o.) (controle negativo; n = 8), o grupo controle positivo foi tratado com neostigmina (25 mg/kg; via intraperitoneal (i.p.); n = 8) e os dois outros grupos foram tratados com a mistura dos compostos isolados nas doses de 10, 25 mg/kg (v.o.; n = 8).

Após os tratamentos, os animais foram colocados em gaiolas de acrílico (30 x 30 cm²) com água e ração *ad libitum* e observados durante 24 horas para verificação dos parâmetros comportamentais. Durante esse período foi registrado o número de morte entre os animais de cada grupo, os animais que sobreviveram ao período de observação foram anestesiados pela administração de pentobarbital sódico (10-15 mg/100 g de peso, i.p.) e em seguida, eutanasiados por decapitação para a remoção do encéfalo e dissecação da área cerebral (hipocampo) em ambos os lados dos cérebros em estudo.

A atividade enzimática de acetilcolinesterase no hipocampo de camundongos foi medida por meio de métodos espectrofotométricos e os resultados comparados aos valores obtidos dos grupos tratados com o veículo (controle negativo; *n*=8) e com neostigmina (controle positivo; *n*=8).

O experimento foi realizado de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA). Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEEA / UFPI # 44/09). Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais estavam em conformidade com o Parágrafo Único do Artigo 2º da Resolução Nº 714, de 20 de Junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV.

Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase *in vivo*

De acordo com método descrito por Ellman¹⁸ foi determinada a atividade acetilcolinesterásica, utilizando como princípio básico a medida da velocidade de produção de tiocolina a partir do substrato acetiltiocolina (ATC), a proporção em que a ATC era hidrolisada.

Os tecidos hipocampais foram homogeneizados em tampão fosfato (pH 8,0; 0,1 M) 10% e o homogenato (10 µL) foi adicionado a uma cubeta contendo 500 µL do tampão, 890 µL de água destilada e 50 µL de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,01M e a absorbância zerada. Após a absorbância ser deixada em zero, a cubeta foi retirada e a ela foi acrescentado iodeto de acetiotiocolina 0,075 M. A absorbância foi registrada durante 3 min em 412 nM. A atividade da enzima foi calculada como modificações na absorbância do minuto 3 para o minuto 0, relativo ao conteúdo de proteína contido no homogenato.²² O procedimento completo foi feito usando um espectrofotômetro Biospectro SP 220 ajustado para um comprimento de onda de 412 nM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação da mistura dos constituintes isolados do extrato de acetato de etila das folhas de *C. limon*

A análise dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C, incluindo experimentos de DEPT, permitiu concluir que a fração é formada por uma mistura de duas cumarinas principais. Pode ser verificado no espectro de RMN ¹H a existência uma substância predominante. Pela análise das integrais pode ser concluído que aproximadamente 85% da fração é composta de uma furanocumarina do tipo linear.

Os espectros bidimensionais HMQC e HMBC permitiram correlacionar os dados observados de hidrogênio com os carbonos diretamente ligados e vizinhos, facilitando a identificação do componente principal. Os dados de RMN do composto principal foram comparados com os descritos na literatura,²³ permitindo assim identificar de maneira inequívoca a presença do 5,8-dimetoxipsoraleno (A) (Figura 1) como sendo o componente principal.

5,8-Dimetoxipsoraleno (A) RMN de ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): d (ppm): 4.17 (6H, s, 2 × OCH₃), 6.29 (1H, *d*, *J* = 10 Hz, H-3), 7.0 (1H, *d*, *J* = 2.4 Hz, H-9), 7.63 (1H, *d*, *J* = 2.8 Hz, H-10), 8.13 (1H,

d, *J* = 9.6 Hz, H-4). RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) d (ppm): 160.42 (C-2); 112,77 (C-3); 139,41 (C-4); 107,54 (C-4a); 144,25 (C-5); 114,72 (C-6); 149,95 (C-7); 144,25 (C-8), 138,73 (C-8a); 105,07 (C-9); 145,10 (C-10); 60,71 (5-OCH₃); 60,71 (8-OCH₃).

Análise dos sinais de RMN da substância presente em menor quantidade na fração permitiu sugerir a presença de uma cumarina dimetoxilada. Os sinais observados no espectro de RMN de ¹³C em d 94,7 e 92,7 foram indicativos que a segunda substância era uma cumarina substituída nas posições 5 e 7. Além disso, os dados de RMN dos grupos metoxilícos corroboram com a proposta que o composto em menor quantidade como sendo a 5,7-dimetoxicumarina (B) (Figura 1).

5,7-Dimetoxicumarina (B) RMN de ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): d (ppm): 3,82 (3H, s, OCH₃-5), 3,86 (3H, s, OCH₃-7), 6,23 (1H, *d*, *J* = indt, H-3), 6,18 (1H, *d*, *J* = 1,9 Hz, H-6), 6,20 (1H, *d*, *J* = 1,9 Hz, H-8) 7,93 (1H, *d*, *J* = 10,2 Hz, H-4). RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) d (ppm): 162.30 (C-2); 110,87 (C-3); 138,73 (C-4); 106,69 (C-4a); 143,61 (C-5); 94,78 (C-6); 156,91 (C-7); 92,73 (C-8). C8a não foi detectado.

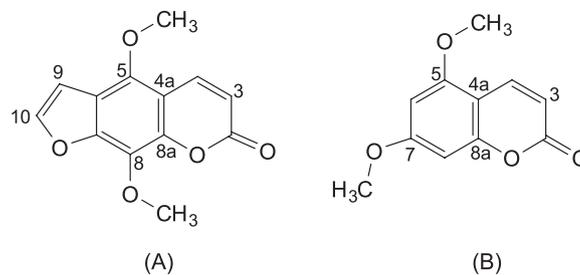


Figura 1. Estrutura química da mistura dos constituintes isolados do extrato de acetato de etila das folhas de *C. limon* (L.) Burm

Avaliação da inibição qualitativa da mistura dos constituintes isolados do extrato de acetato de etila das folhas de *Citrus limon* (L.) Burm

A amostra contendo a mistura dos constituintes isolados da *C. limon* (L.) Burm apresentou resultado positivo frente à inibição qualitativa da enzima acetilcolinesterase. O resultado foi observado através da placa de CCD que apresentou coloração amarela, com halos brancos, sugerindo que a fração possui ação inibitória sobre a enzima de AChE. A constatação da inibição é possível seguindo-se a metodologia de Elmann,¹⁸ adaptada por Rhee e colaboradores.¹⁹ Comparando aos resultados de outros estudos, nossos dados corroboram com a hipótese de que compostos cumarínicos apresentam um potencial anticolinesterásico.^{8,24}

Avaliação do efeito inibitório da mistura dos constituintes isolados do extrato de acetato de etila das folhas de *C. limon* (L.) Burm na atividade da enzima acetilcolinesterase *in vitro*

Em nossos estudos *in vitro* foi verificado uma inibição da atividade da AChE de 95,9% quando a neostigmina (controle positivo) foi usada em uma concentração de 0,1 mg/mL. Quando avaliada a mistura dos constituintes isolados do extrato AcoET das folhas de *C. limon* (L.) Burm nas concentrações de 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 e 0,00625 mg/mL foi detectado uma inibição de 57,75, 49,89, 35,03, 23,78 e 8,71% na atividade da AChE *in vitro*, respectivamente. Com base nesses resultados também foi determinada a CE₅₀ que corresponde a 0,061 mg/mL com intervalo de confiança de 95% (0,033 a 0,18 mg/mL; *r*² = 0,9835).

Estudos com óleos essenciais e extratos já foram divulgados na literatura com atividade anticolinesterásica *in vitro*. As espécies

C. sinensis (L) Osbeck,¹³ *S. lavandulaefolia* Vahl,²⁵ *Eucalyptus camaldulensis* Dehnhardt e *Ocimum canum* Sims²⁶ apresentaram um CE₅₀ da atividade de AChE igual a 0,063, 0,05, 0,018, 0,036 mg/mL, respectivamente. Os extratos em éter de petróleo, diclorometano e metanol das folhas da *Leucosidea sericea* Eckl. & Zeyh.²⁷ apresentam CE₅₀ de 0,16; 0,14 e 0,24 mg/mL, respectivamente.

Nessa perspectiva, a mistura dos constituintes isolados do extrato de AcOEt das folhas de *C. limon* (L.) Burm (5,8-dimetoxi-psoraleno e 5,7-dimetoxicumarina) apresentou um valor para CE₅₀ menor que os valores mensurados para os extratos obtidos de outras espécies de plantas medicinais já estudados. No entanto, quando comparado o valor inibitório da atividade da AChE correspondente a CE₅₀ determinada em nosso estudo foi verificado que essa CE₅₀ foi inferior apenas em comparação ao valor detectado para o óleo essencial extraído das folhas de *C. sinensis* (L) Osbeck.¹³

Dessa forma, nosso estudo sugere que a referida fração pode demonstrar resultados inibitórios sobre a atividade da AChE *in vitro*, com potencial aplicação em modelos farmacológicos experimentais em roedores para avaliar seu potencial farmacológico em ensaios pré-clínicos em procedimentos experimentais que simulem as patologias relacionadas com o sistema nervoso central, nas quais a modulação da AChE responda pela fisiologia inerente dos transtornos psicossociais, particularmente a DA.

Avaliação do efeito inibitório da mistura dos constituintes isolados do extrato de acetato de etila das folhas de *C. limon* (L.) Burm na atividade da enzima acetilcolinesterase *in vivo*

Complementando a análise dos efeitos inibitórios sobre a atividade de AChE, nesse estudo foi observado que no grupo ($n = 8$) tratado com neostigmina (droga de referência) apenas cinco animais sobreviveram ao período de observação, no qual pode ser verificado uma redução de 43,32% na atividade da enzima acetilcolinesterase quando comparado ao grupo controle negativo [$10,03 \pm 0,16$; $q=6,060$; $p<0,001$].

Por sua vez, o tratamento com 10 e 25 mg/kg da referida fração isolada do extrato AcOEt das folhas de *C. limon* (L.) Burm reduziu em 60,37% [$3,974 \pm 0,66$; $q=6,06$; $p<0,001$] e 60,36% [$3,976 \pm 0,43$; $q=6,05$; $p<0,001$] a atividade da AChE em relação ao controle negativo [$10,03 \pm 0,16$], respectivamente. Além disso, em comparação ao grupo controle positivo tratado com neostigmina [$5,685 \pm 0,47$] foi detectada uma redução de 30,09 e 30,06% na atividade da AChE entre os camundongos tratados com a dose de 10 mg/kg [$3,974 \pm 0,66$; $q=1,711$; $p<0,001$] e 25 mg/kg [$3,976 \pm 0,43$; $q=1,709$; $p<0,001$] da referida fração isolada de *C. limon* (L.) Burm.

A referida fração isolada de *C. limon* (L.) Burm não produziu alteração na atividade da AChE entre os camundongos tratados com a dose de 10 mg/kg [$3,974 \pm 0,66$] em relação ao grupo tratado com a dose de 25 mg/kg [$3,976 \pm 0,43$; $p>0,05$] (Figura 2). Sugerindo que o referido composto pode ser usado em menor dose, bem como pode aumentar de forma mais eficaz a estimulação colinérgica que a droga de referência.

Dessa forma, os dados fornecem indícios para a obtenção de composto com melhor aplicabilidade em estudos farmacológicos para o tratamento e/ou profilaxia do quadro de demência relacionado com alterações na atividade da enzima acetilcolinesterase. Nossos dados também revelam que a referida fração pode não apresentar propriedades tóxicas em ensaios pré-clínicos, uma vez que nenhum dos animais tratados com as doses de 10 e 25 mg/kg morreram durante o período de observação de 24 horas, entretanto, os camundongos tratados com a dose de 25 mg/kg da neostigmina apresentaram uma taxa de mortalidade de 37,5% durante o mesmo período de observação.

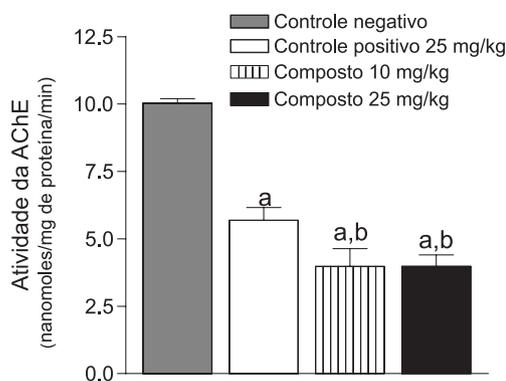


Figura 2 - Efeito da mistura dos constituintes isolados do extrato de acetato de etila das folhas de *Citrus limon* (L.) Burm sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo de camundongos. Os grupos foram tratados conforme descritos no protocolo experimental ($n = 8$ por grupo). Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. A atividade da acetilcolinesterase foi determinada em 10 mL de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como post-hoc test. ^a quando comparado ao controle negativo (solução salina 0,9%; $p<0,05$); ^b quando comparado ao controle positivo (neostigmina 25mg/kg; $p>0,05$). Composto = mistura dos constituintes isolados do extrato de acetato de etila das folhas de *C. limon* (L.) Burm

CONCLUSÕES

Nossos estudos sugerem que a fração isolada da *C. limon* (L.) Burm pode demonstrar resultados inibitórios sobre a atividade da AChE *in vitro* e *in vivo*, com potencial aplicação em doenças neurodegenerativas que dependem da modulação desta enzima, incluindo a DA. A amostra contendo a mistura dos constituintes isolados não apresentou propriedades tóxicas em roedores, uma vez que nenhum dos animais tratados com as doses de 10 e 25 mg/kg morreram durante o período de observação de 24 horas. Sugerindo que o referido composto pode ser usado em menor dose, bem como pode aumentar de forma mais eficaz a estimulação colinérgica.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Noldin, V. F.; Cechinel Filho, V.; Monache, F. D.; Benassi, J. C.; Christmann, I. L.; Pedrosa, R. C.; Yunes, R. A.; *Quim. Nova.* **2003**, *26*, 331; Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C.; *Quim. Nova.* **2005**, *28*, 519.
- Campêlo, L. M. L.; Almeida, A. A. C.; Freitas, R. L. M.; Cerqueira, G. S.; Sousa, G. F.; Saldanha, G. B.; Feitosa, C. M.; Freitas, R. M.; *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 678673.
- Houghton, P. J.; Howes, M. J. R.; *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, *75*, 513.
- Bores, G. M.; Huger, F. P.; Petko, W.; Mutlib, A. E.; Camacho, F.; Rush, D.K.; Selk, D. E.; Wolf, V.; Kosley, R. W. Jr.; Davis, L.; Vargas, H. M.; *Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *277*, 728; Barbosa, R. L.; Moraes, J. M.; Resck, Z. M. R.; Dázio, E. M. R.; *Rev. Rene* **2012**, *13*, 1191; Ministério da Saúde (BR). Portaria n. 491/GM, de 23 de setembro de 2010.
- Minett, T. S. C.; Bertolucci, P. H. F.; *Rev. Neurociências* **2000**, *8*, 11.
- Gupta, A.; Gupta, R.; *Phytochemistry* **1997**, *46*, 827; Mukherjee, P. K.; Venkatesan, K.; Malb, M.; Houghton P. J.; *Phytomedicine* **2007**, *14*, 289.

7. Sereniki, A.; Vital, M. A. B. F.; *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul.* **2008**, *30* (1 Supl.).
8. Yamaguchi, K. K. L.; Alcantara, J. M.; Veiga Junior, V. F.; *Acta Amaz.* **2012**, *42*, 541.
9. Marques, T. H. C.; Santos, P. S.; Melo, C. H. S.; Carvalho, R. B. F.; Lima, L. S.; David, J. M.; David, J. P. L.; Freitas, R. M.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 549; Recuero, M.; Vicente, M. C.; Martínez-García, A.; Ramos, M. C.; Carmona-saez, P.; Sastre, I.; Aldudo, J.; Vilella, E.; Frank, A.; Bullido, M. J.; Valdivieso, F.; *Aging Cell* **2009**, *8*, 128.
10. Sá, C. G.; Cardoso, K. M. F.; Freitas, R. M.; Feitosa, C. M.; *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **2012**, *33*, 211.
11. Rang, H. P.; Dale, M.M.; Ritter, J. M.; *Farmacologia*, 4a. ed., Editora Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, **2001**; Mota, W. M.; Barros, M. L.; Cunha, P. E. L.; Santana, M. V. A.; Stevam, C. S.; Leopoldo, P. T. G.; Fernandes, R. P. M.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2012**, *14*, 624; Jung, M.; Park, M.; *Molecules* **2007**, *12*, 2130.
12. Gutierrez, C. A. C.; *Rev. Colomb. Psiquiatr.* **2007**, *36*, 157; Cunha, U. G. V.; Thomaz, D. P.; Marino, C. G.; Balabram, K.; Marquete, C. R.; *Geriatrics & Gerontologia* **2008**, *2*, 162; Tiedeman, M.; Kim, E. C.; Flurie, R.; Korch-Black, K.; Brandt, N. J.; *Patient Care* **2011**.
13. Sá, C. G.; *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal do Piauí, Brasil, 2011.
14. Campelo, L. M. L.; Feitosa, C. M.; Tomé, A. R.; Freitas, R. M.; *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* **2011**, *10*, 116; Campelo, L. M. L.; Sá, C. G.; Almeida, A. A. C.; Costa, J. P.; Marques, T. H. C.; Feitosa, C. M.; Saldanha, G. B.; Freitas, R. M.; *Pharmazie* **2011**, *66*, 1; Campelo, L. M. L.; Gonçalves, F. C. M.; Feitosa, C. M.; Freitas, R. M.; *Pharm. Biol.* **2011**, *49*, 709; Campelo, L. M. L.; De Lima, S. G.; Feitosa, C. M.; Freitas, R. M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, *21*, 668; Gerhardt, C.; Wiest, J. M.; Girolometto, G.; Silva, M. A. S.; Weschenfelder, S.; *Braz. J. Food Technol.* **2012**, *15*, 11; Almeida, A. A.; Costa, J. P.; Carvalho, R. B.; Sousa, D. P.; Freitas, R.M.; *Brain Res.* **2012**, *144*, 56.
15. Cortez, L. E. R.; Cortez, D. A. G.; Ferreira, A. G.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 164; Albarici, T. R.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Pirani, J. R.; *Quim. Nova.* **2010**, *33*, 2130.
16. Melo, M. F. F.; Zickel, C. S.; *Acta Bot. Bras.* **2004**, *18*, 73.
17. Kuster R. M.; Rocha L. M.; Cumarinas, cromonas e xantonas. In: Simões C.M.O.; Shenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz L. A.; Petrovick, P. R.; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFSC: Florianópolis, **2003**, 247; Santana, O. A.; Encinas, J. I.; *Biotemas* **2008**, *21*, 29.
18. Ellman, G.E.; Coutney, D.; Andres Junior, V.; Featherstone, R.M.; *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.
19. Rhee, I. K.; Meent, M. V. D.; Ingkanina, K.; Verpoorte, R.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *915*, 217.
20. Karadsheh, N.; Kussie, P.; Linthicum, D. S.; *Toxicol. Lett.* **1991**, *55*, 335.
21. Moyo, M.; Ndhala, A. R.; Finnie, J. R.; Staden, J. V.; *Food Chem.* **2010**, *123*, 69.
22. Lowry, H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265.
23. Liu, R.; Feng, L.; Sun, A.; Kong, L.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1055*, 71
24. Trevisan, M. T. S.; Bezerra, M. Z. B.; Santiago, G. M. P.; Feitosa, C. M.; *Quim. Nova.* **2006**, *29*, 415.
25. Savelev, S.; Okello E.; Perry, N. S.; Wilkins, R. M.; Perry, E. K.; *Pharmacol Biochem Behav.* **2003**, *3*, 661.
26. Kiendrebeogo, M.; Coulibaly, A. Y.; Nebie, R. C. H.; Zeba, B.; Lamien, C. E.; Lamien-Meda, A.; Nacoulma, O. G.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2003**, *21*, 63.
27. Aremu, A. O.; Amoo, S. O.; Ndhala, A. R.; Finnie, J. F.; Van Staden, J.; *Food Chem Toxicol.* **2011**, *49*, 1122.