

# EXTRAÇÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cymbopogon citratus*, *Citrus limonia* e *Citrus sinensis*, PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO DE PICOS-PI

Fabrcio Custódio de Moura Gonçaves (bolsista do PIBIC/CNPq), Chistiane Mendes Feitosa (Orientadora, CCN – UFPI)

## INTRODUÇÃO

O Mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa, atinge inicialmente a memória, o raciocínio e comunicação (INGKANINAN, 2000). O tratamento para a Doença de Alzheimer (DA) é sintomático e consiste na tentativa de restauração da função colinérgica; a elevação do nível da acetilcolina pode se mostrar útil na melhora da deficiência da aprendizagem, um dos sinais da doença. Inibidores da acetilcolinesterase (AChE) são amplamente usados baseado na hipótese colinérgica. O óleo essencial da espécie *Centela asiática* já é indicado na medicina indiana e chinesa para uso terapêutico no tratamento da DA e apresenta os compostos:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e  $\gamma$ -terpineno, inibidores da AChE, enzima associada a DA (HOUGHTON *et al.*, 2003). Pesquisas demonstram ainda que o tratamento à base de antioxidantes corrige problemas relativos à memória, ao aprendizado e à cognição, provocados por envelhecimento ou moléstias e seu uso pode ser útil no tratamento da DA (SOCCI *et al.*, 1995; PEERING *et al.*, 1997; MONTINE *et al.*, 2002).

Extratos, óleos essenciais e constituintes de plantas, que apresentam as atividades farmacológicas relacionadas ao tratamento da DA, tais como: inseticida, anticolinesterásica, antiinflamatórias e antioxidantes são fontes promissoras de medicamentos naturais que poderão ser utilizados no seu tratamento (HOUGHTON *et al.*, 2003). As análises “*in vivo*” com camundongos através de estudos comportamentais, avaliação do efeito antidepressivo, avaliação do efeito ansiolítico, avaliação do efeito hipnótico, avaliação do efeito neuroléptico e avaliação dos efeitos antioxidantes fornecem importantes resultados para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

O presente trabalho teve como objetivos realizar extração, identificação dos constituintes, testes de citotoxicidade e testes de atividade anticolinesterásica de óleos essenciais (OE) de espécies utilizadas na medicina popular do município de Geminiano, micro-região de Picos-PI: *Cymbopogon citratus* (capim-santo), *Citrus limonia* (limão) e *Citrus sinensis* (laranja).

## METODOLOGIA

As plantas para o estudo proposto foram coletadas no município de Geminiano, micro-região de Picos-PI, cerca de 300g, 300g e 200g das folhas das plantas medicinais: *Cymbopogon citratus*, *Citrus limonia* e *Citrus sinensis*, respectivamente. O material vegetal (folhas) foi submetido à extração do óleo essencial pelo processo de hidrodestilação por cerca de 3h. O óleo essencial (OE) foi obtido por hidrodestilação-Clevenger, seco com sulfato de sódio anidro e realizado por CG-EM (Shimadzu, GC-17A /MS-QP5050A). 100g de cada óleo foram diluídos em metanol e adicionado em cromatografia em camada delgada para o teste com a enzima AChE. O teste foi realizado utilizando-

se os reagentes: ácido 5,5'-Ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman) e ATCl (Iodeto de acetilcolina), com borrifração posterior da enzima (AChE), o resultado positivo da inibição foi obtido através da visualização de um campo amarelo na placa com manchas brancas (ELLMAN *et al.*, 1961; INGKANINAN *et al.*, 2000). A identificação dos constituintes presentes nos óleos foram identificados por Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas. A análise foi realizada na Universidade Federal do Piauí, no Laboratório de Petróleo (LAPETRO) do Campus Petrônio Portella, em Teresina-PI.

Estudos de citotoxicidade com células tumorais, foram realizados em colaboração com pesquisadores do laboratório de oncologia (UFC). No estudo, foram utilizadas as seguintes células: HCT-8 (cólon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e MDA-MB435 (Melanoma – humano), cedidas pelo *Instituto Nacional do Câncer* (NCI - EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril e testadas na concentração de 10 µg/mL. Análise de citotoxicidade foi feita pelo método do MTT; método rápido, sensível e barato. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996). A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais (OE) das espécies *Cymbopogon citratus* (capim-santo), *Citrus limonia* (limão), *Citrus sinensis* (laranja), foram identificados por comparação de seus respectivos espectros de massas com os registros da biblioteca computacional Wiley229 e pela determinação experimental dos índices de Kovats, com padrões de n-alcenos e comparação com dados da literatura (ADAMS, 2005). A análise por CG-EM, indicou os principais constituintes: limoneno (52,77%), linalol (1,73%), cis-limoneno-óxido- (2,68%), trans-limoneno-óxido (7,13%), citronelal (2,77%), neral (6,85%), geranial (5,49%), nerol (4,04%) e geranil acetato (9,92%) no óleo essencial do limão, enquanto que no óleo de capim santo foram identificados: linalol (2,44%), neral (30,15%), geranial (31,92%), 2-undecanona (1,14%) e metil dodecanoato (2,52%). As análises dos constituintes do OE da laranja por CG-EM e outros testes comportamentais está sendo realizado.

O resultado positivo de inibição da enzima AChE das espécies *Cymbopogon citratus* (capim santo), *Citrus limonia* (limão) e *Citrus sinensis* (laranja) foi comprovado pela visualização de um campo amarelo na placa com manchas brancas. Estudos de citotoxicidade com as linhagens tumorais utilizadas, cólon, glioblastoma e melanoma humanos não apresentaram inibição nas linhagens na concentração de 10 µg/mL dos OE testados.

## CONCLUSÃO

O resultado de inibição da enzima apresentado pelos OE das espécies *Cymbopogon citratus*, *Citrus limonia* e *Citrus sinensis* aliado aos estudos comportamentais com camundongos que

estão sendo realizados, onde já obtivemos resultados bastante promissores, poderão fornecer subsídios, particularmente na área dos transtornos de ansiedade e depressão, aspectos relevantes para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer. Os estudos com as células tumorais utilizadas com OE das espécies não apresentaram inibição nas linhagens testadas na concentração de 10 µg/mL.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem ao NTF da UFPI e CNPq pela infra-estrutura disponível e financiamentos.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. 4th Edition. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, USA, 2005.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4: 14-19, 1996.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, D. K., ANDRES, V. Jr., FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology** 7, p 88-95, 1961.

HOUGHTON, P. J. HOWES, M. J. R. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p 513-527, 2003.

INGKANINAN, K., HAZEKAMP, A., DE BEST, C. M., IRTH, H. TJADEN, U. R., VAN DER HEIJDEN, R., VAN DER GREEF, J., VERPOORTE, R. The application of HPLC with on-line UV-MS-biochemical detection for isolation of an acetylcholinesterase inhibitor from *Narcissus* "Sir Winston Churchill". **Jornal of Natural Products** 63, p.803-806, 2000.

MONTINE, T. J.; Neely, M. D.; Quinn, J. F. Beal, M. F.; et al. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n<sup>o</sup> 55, p 620-626, 2002.

PEERING, W., PERING, P., Stahelin, H.. *J. Am. Geriatr. Soc*, 45, 6, p 718-724, 1997.

SOCCI, D., Crandall, B., Arendash, G. *Brain Res.*, 20, 1-2, p 88-94, 1995.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Óleos Essenciais. Enzima Acetilcolinesterase.