

DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA SÓLIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *CITRUS LIMON* DIRECIONADAS PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER.

Cassio H.S. Melo(Bolsista PIBIT), Katricia M.F. Cardoso¹, Lidianne Mayra L. Campêlo (Bolsista CNPQ - Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Rivellilson M. de Freitas (Colaborador, Depto de Farmácia – UFPI), Chistiane Mendes Feitosa (Orientador, Depto de Química – UFPI).

RESUMO

O presente projeto tem como objetivo geral desenvolver uma formulação farmacêutica sólida a partir do óleo essencial das folhas de *Citrus limon* através de um complexo de inclusão com a β -ciclodextrina enfocando sua importância para a produção industrial de medicamentos que atuam no Sistema Nervoso Central (SNC). Objetivou-se neste estudo forma realizados testes farmacológicos, neurológicos e de comportamento tanto com o óleo essencial e futuramente como com a formulação farmacêutica sólida obtida. Pretendeu-se inicialmente investigar os mecanismos de ação e identificação de possíveis alterações (maléficas ou benéficas) na atividade da enzima acetilcolinesterase no hipocampo (H), corpo estriado (CE) e córtex frontal (CF) dos cérebros de camundongos tratados oralmente com o óleo essencial de *C. limon*.

Palavras chaves: Óleo essencial, *Citrus limon*, Enzima acetilcolinesterase.

INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OES) são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Os OES Podem ser obtidos por diversas técnicas como: arraste por vapor d'água, extração por CO₂ supercrítico, hidrodestilação, dentre outras. OES são bastante utilizados na indústria farmacêutica ou cosmética e possuem várias atividades comprovadas: antibacteriano, antiséptico, antiinflamatório, dentre outras (SIMÕES et al., 2000).

Citrus limon conhecida popularmente como limão, foi descrita como tendo um largo número de ações, antifúngica (EZZAT, 2001), antimicrobiana, antioxidante (LUZIA, 2009), mostrando ser uma substância biologicamente ativa. Por apresentar flavonóides, óleos voláteis e cumarinas em sua constituição, onde sua atuação no sistema nervoso central-SNC ..

Pretende-se como objetivo final deste trabalho produzir comprimidos contendo óleo essencial de *Citrus limon* utilizando-se como excipiente farmacêutico a β -ciclodextrina, para investigar o seu potencial farmacológico para o tratamento da doença de Alzheimer. Inicialmente foram realizados testes farmacológicos e testes de inibição *in vivo* e *in vitro* diante da enzima acetilcolinesterase com o óleo essencial *in natura* desta espécie.

METODOLOGIA

O óleo essencial de *C. limon* foi obtido, partindo-se de 1 kg de folhas frescas trituradas utilizando-se o sistema de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (Matos et al., 1999) durante o período de quatro horas. O óleo coletado foi subseqüentemente seco com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e mantido sob refrigeração até a realização da análise. O rendimento do óleo foi de 0,29%.

Os camundongos foram tratados com o óleo essencial de *Citrus limon* (via oral) com solução salina 0,9% (controle) em três doses diferentes (50mg/Kg; 100 mg/ Kg e 200 mg/Kg) durante 30 dias de tratamento divididos em grupos de 6 animais utilizando-se 24 camundongos machos Swiss adulto com peso variando (25-30 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Após esse período, os animais tratados e controles foram submetidos aos estudos comportamentais e da enzima acetilcolinesterase.

Os testes de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) *in vivo* do óleo essencial das folhas de *Citrus limon* para detecção de inibição qualitativa da AChE foi realizada com o óleo essencial obtido das folhas de *Citrus limon*. Cada amostra foi dissolvida em metanol, 1,5-2,5 µl, aplicada na placa de sílica gel e eluída em clorofórmio: metanol 9:1. Após a placa ser desenvolvida a atividade inibitória do spot será detectada utilizando revelador baseado no método de Ellman, utilizando-se 5 units/mL da enzima (ELMANN et al., 1961; FEITOSA et al., 2007; INGKANINAN et al. 2000). Inibiu-se utilizando a cafeína como padrão obtido da espécie *Paulinia cupana*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após análise no CG/MS foi verificado o constituinte mais abundante encontrado nas folhas de *Citrus limon* foi o limoneno de (52,77%), foram identificados ainda como principais constituintes: acetato de geraniol (9,92%), *trans*-óxido limoneno (7,13%), neral (6,85%) além de outros. Todos estes compostos são citados na literatura como fazendo parte da constituição química de outras espécies de *Citrus*.

A avaliação dos efeitos de OE *in vitro* e *in vivo* sobre a atividade da AChE foi realizado pelo método de Ellman. Nos testes *in vitro* o OE apresentou inibição da AChE nas concentrações de 100, 50, 40 e 30 mg/mL. Por sua vez, os testes de inibição *in vivo* da atividade da AChE no hipocampo de camundongos adultos após tratamento por via oral durante o período de 30 dias demonstraram uma redução significativa de 19, 32 e 4% [$p < 0,001$] da atividade da enzima AChE no hipocampo dos animais tratados com as doses de 50, 100 e 150 mg/kg, respectivamente, quando comparado ao grupo tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%; controle).

Constitui-se em uma das próximas etapas deste projeto a elaboração do complexo de inclusão, que realiza-se através de mistura física entre o óleo essencial e a β -ciclodextrina. Este método baseia-se na simples mistura dos componentes sem adição de água. O método de compressão direta será usado para produção da formulação farmacêutica sólida (comprimido) e tem sido apontada como o procedimento de escolha pela indústria farmacêutica para a produção de comprimidos dada a sua facilidade, rapidez e simplicidade (BOLHUIS & ARMSTRONG, 2006).

CONCLUSÕES

Considerando-se a extração do óleo essencial da espécie *C. limon* neste projeto, observou-se que a extração Cleverger possui êxito e obteve um rendimento efetivo.

O óleo essencial da espécie estudada neste trabalho produz efeito inibitório da AChE *in vitro* nas concentrações testadas e *in vivo* no hipocampo dos animais tratados com as três doses

estudadas. Esses achados nos estimulam a prosseguir com as análises para a comprovação do uso da espécie como um futuro fármaco para o tratamento da DA.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal do Piauí - UFPI; ao Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental – LAPNEX e à FAPEPI / CNPq pelo Apoio Financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLHUIS, G.K., ARMSTRONG, N.A. Excipients for direct compaction - an update. **Pharm Dev Technol** v. 11, p. 111-24, 2006.

CAMPELO, L.M.L. , ALMEIDA, A.A.C. , FREITAS, R. M., MENDES, R.L. , CERQUEIRA, G.S.S. , SALDANHA, G. B. , Feitosa, C.M. , Antioxidant and Antinociceptive Effects of Citrus limon Essential Oil in Mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** (Print), v. 2011, p. 1-8, 2011.

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.

FEITOSA, C.M.; Barreto, J.C.; Trevisan, M.T.S.; Araújo, R.M. Alzheimer e produtos naturais como inibidores da acetilcolinesterase, in: **produtos Naturais estudos químicos e biológicos**. Moraes, S.M. Braz-Filho, R.B. (Org.). Fortaleza, EdUECE, 240 p, 2007.

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, 2000a.

SIMÕES, M.O; Schenkel. E.P; Gosmann, G.; Mello, J.C.P. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da Universidade UFSC. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis, 2000.

LUZIA, D.M.M., JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Quím. Nova** v. 32, n. 4, p. 946-949, 2009.