



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG**  
**Coordenadoria Geral de Pesquisa – CGP**  
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 06 – Bairro Ininga*  
*Cep: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 215-5564 – Fone/Fax (86) 215-5560*  
E-mail: pesquisa@ufpi.br; pesquisa@ufpi.edu.br

**PESQUISA DE COMPOSTOS INIBIDORES DA ENZIMA**  
**ACETILCOLINESTERASE A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS**  
**BRASILEIRAS**

*Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho (bolsista do CNPq/Balcão), Rivelilson Mendes de Freitas (colaborador, Depto de Bioquímica e Farmacologia - UFPI), Chistiane Mendes Feitosa (Orientadora, Depto de Química - UFPI)*

#### **Introdução**

O Mal de Alzheimer é uma doença degenerativa que compromete inicialmente a memória, a capacidade de raciocínio e a comunicação (RANG et al., 2001), afeta aproximadamente 10% dos indivíduos com idade superior a 65 anos e 40% acima de 80 anos.

O tratamento para a doença Alzheimer (DA) consiste na tentativa de restauração da função colinérgica. Baseado na hipótese colinérgica, inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) são amplamente utilizados no tratamento DA (FRANCIS et al., 1999; SERENIKI et al., 2008). Inibidores como: tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina produzirem algum tipo de melhora em aproximadamente 30-40% dos pacientes portadores da DA de leve a moderada (SERENIKI et al., 2008). Entre esse a galantamina é um produto natural e apresenta menos efeitos colaterais que outros inibidores utilizados.

Pesquisas indicam que drogas derivadas de produtos naturais são eficazes no tratamento do Mal de Alzheimer (RANG et al., 2001). Neste contexto, diversas plantas têm sido descritas como interessantes fontes de Inibidores da AChE (GUPTA et al., 1997; TREVIAN et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2007).

Diante do exposto, dezoito espécies de plantas medicinais brasileiras pertencentes às famílias *Convolvulaceae*, *Crussulaceae*, *Euphobiaceae*, *Leguminosae*, *Malvaceae*, *Moraceae*, *Nyctaginaceae* e *Rutaceae* foram testadas a fim de descobrir compostos que sejam efetivos no tratamento da DA,

Nesta perspectiva e a partir desse *screening* realizado por Feitosa e colaboradores (2011) realizamos estudo monitorado do extrato acetato de etila (AcOEt) das folhas de *Citrus limon* (L.) Burm. com o intuito de isolar o composto inibitório da acetilcolinesterase presente nesse extrato através do ensaio de Ellman (1961) modificado por Rhee (2001).

#### **Materiais e Métodos**

Da extração das folhas, flores e caules das dezoito plantas medicinais foram obtidos 48 extratos, destes, 17 mostraram inibição completa da AChE no teste de microplaca em uma concentração de 2 mg/mL. As amostras também foram testadas em cromatografia de camada delgada (CCD), neste método 21 extratos demonstraram atividades. Entretanto, vários destes mostrou-se falso-positivo. A partir deste trabalho e através deste screening, foi realizado a seleção da espécie *Citrus limon*.

As folhas da espécie *Citrus limon* (1Kg) foram coletadas na cidade de Picos-PI, a exsiccata de número 26.453, foi depositada no herbário Graziela Barroso da UFPI. As folhas foram secas à estufa 40°C e posteriormente maceradas. O material macerado foi submetido à extração com solventes hexânico, AcOEt e metanólico, respectivamente.

Do extrato AcOEt (962 g) foi realizada uma cromatografia em coluna filtrante com o material macerado obtendo-se, assim, uma fração A retirada a partir dos solventes diclorometano/acetato de etila 30%. Uma segunda coluna filtrante foi realizada da fração A (1,22 g) obtendo-se uma fração B a partir de diclorometano/acetato de etila 10%. Uma terceira coluna filtrante foi realizada da fração B (297 mg) na qual foi obtida uma fração C (99 mg) a partir de diclorometano 100%, por fim através de uma quarta coluna filtrante, obteve-se da fração C, um pó branco, solúvel em diclorometano e que apresentou única mancha em CCD.

Diante do exposto, foi observada a inibição da enzima AchE desse composto isolado através do teste de Ellman (1961) modificado por Rhee (2001) para detecção do poder de inibição qualitativa da enzima acetilcolinesterase.

## **Resultados e Discussão**

Através de ensaios de Ellman (1961) modificado por Rhee (2001), o composto isolado apresentou resultado positivo frente à inibição qualitativa da enzima acetilcolinesterase. O resultado positivo do teste foi observado através da placa de CCD que se apresentou amarela e com manchas brancas destacando, assim, a ação inibitória sobre a AChE. O composto isolado, que está tendo sua estrutura determinada através de diversas técnicas tais como RMN 1H e <sup>13</sup>C pode ser um futuro fármaco promissor no tratamento da doença de Alzheimer por possuir inibição da acetilcolinesterase.

## **Conclusão**

A partir do *screening* realizado por Feitosa et al. (2011), realizamos a seleção da espécie *Citrus limon* e estamos executando estudos monitorados do extrato AcOEt das folhas desta espécie com o intuito de isolar mais compostos inibitórios da acetilcolinesterase presente nesse extrato através dos ensaios descritos.

Estudos adicionais devem ser realizados com a substância isolada visando avaliação dessas atividades em modelos *in vivo*, em camundongos por um período subcrônico e crônico de tratamento.

## **Apoio**

Os autores agradecem a UFPI pela infraestrutura disponível, a FAPEPI e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## Referências Bibliográficas

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.; FREITAS R.M.; LUZ, N.N. N.; BEZERRA, MZB; TREVISAN, M.T.S. Acetylcholinesterase Inhibition by some promising Brazilian Medicinal Plants. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 71, n. 3, p. 783-790, 2011.

FRANCIS, PT., PALMER, AM., SNAPE, M. and WILCOCK, GK., The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, vol. 66, p. 137-147. 1999.

GUPTA, A., Gupta, R.. A survey of plants for presence of cholinesterase activity. **Phytochemistry** 46, p. 827-831, 1997.

MUKHERJEE, PK., VENKATESAN, K., MAINAK, M. and HOUGHTON, PJ., Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, vol. 14, p. 289-300. 2007.

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J. M., **Farmacologia**. 4a. Edição : Editora Guanabara Koogan S.A., 2001.

RHEE, I. K., VAN DE MEENT, M., INGGANINAN, K., VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**. 915, p.217-223, 2001.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de psiquiatria do Rio Grande do Sul [online]**. suppl., vol.30, n.1, 2008.

TREVISAN, MTS., BEZERRA, MZB., SANTIAGO, GMP., FEITOSA, CM., VERPOORTE, R. and BRAZ FILHO, R., Larvicides and acetylcholinesterase inhibitors from *Kalanchoe* species. **Química Nova**, vol. 29, p. 415-418, 2006.

**Palavras Chave:** *Citrus limon*. Teste de Ellman. Enzima Acetilcolinesterase.