



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CIRO GONÇALVES E SÁ

Extração e testes de atividades farmacológicas do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.)
Osbeck direcionados para a doença de Alzheimer.

TERESINA – PIAUÍ
2011

CIRO GONÇALVES E SÁ

Extração e testes de atividades farmacológicas do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.)
Osbeck direcionados para a doença de Alzheimer.

Dissertação como requisito complementar, para obter o título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Orientador: Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa
Co-Orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

CIRO GONÇALVES E SÁ

Extração e testes de atividades farmacológicas do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.)
Osbeck direcionados para a doença de Alzheimer.

Dissertação defendida sob a avaliação da Comissão Examinadora constituída por:

Presidente e Examinadora Interna: **Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa** (Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí)

Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa

Examinador Externo: Prof. Dr. **Reinaldo Nóbrega de Almeida**
(Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba).

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Examinador Externo: **Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior**
(Instituto Federal do Piauí)

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior

VICE-REITOR

Prof. Dr. Edwar de Alencar Castelo Branco

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Msc. Antonio dos Santos Rocha Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

A Deus, por tudo que me fez ser até hoje, e tudo que planejou para mim nos dias que me restam neste plano.

CONSAGRO!

Aos meus pais, Francisco de Assis e Sá e Aparecida Neide Gonçalves de Sá, aos meus irmãos, Júlio e Mariana Cristina Gonçalves e Sá, pela fonte de inspiração que são pelo apoio que proporcionam.

MINHA HUMILDE DEDICATÓRIA!

EPÍGRAFE

“Eu fico com a pureza
Da resposta das crianças
É a vida, é bonita
E é bonita....”
Gonzaguinha

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por tudo de bom em minha vida.

Á **Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa**, minha orientadora, por todos os conhecimentos que compartilhou comigo nessa caminhada. Meus sinceros agradecimentos e respeito.

Ao prof. Dr. **Rivelilson Mendes de Freitas**, pela paciência em ensinar e generosidade em compartilhar seus conhecimentos. E agradeço também a todo o grupo do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX).

Aos demais professores do curso, por acreditarem nesse programa e se dedicarem às aulas. Ao prof. **Sidney Gonçalo de Lima**, a profa. **Maria das Graças Lopes Citó** e a profa. **Maria do Carmo Gomes Lustosa** que me ajudaram na identificação das substâncias, ao prof **José Machado Moita Neto** e prof. **Alexandre Araújo de Souza**, pela ajuda nos cálculos estatísticos.

Agradeço aos companheiros desta jornada: **Lidiane**, companheira de pesquisa e amiga, **Márcio, Eliamara, Ana Paula, Mirna, Lina, Fernanda, Ilka, Mônica, Ana Karina, Maria, Cícera, Manoel, Marcelo**, todos no qual após esse período posso chamá-los amigos.

A **Universidade Federal do Piauí** pela possibilidade de concretização de mais um desafio.

Aos **funcionários e professores** do curso de Farmácia, grandes incentivadoras nesse início da minha vida científica.

Aos amigos, obrigado pelo convívio em nosso ambiente de trabalho, pela amizade e trabalho árduo e pelo apoio durante todo o processo do mestrado.

Devo muito a todas as pessoas mencionadas aqui, intelectual e emocionalmente. **A todos meu muito obrigado!**

LISTA DE ABREVIATURA, SÍMBOLOS E SIGLAS

AAPH	Dicloreto de 2,2-Azobis (2-AmidinoPropano)
AChE	Acetilcolinesterase
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância.
AST	Aspartato Aminotransferase
ATC	Acetilcolina
ATCI	Iodeto de Acetiotiocolina
BSA	Albumina de Soro Bovino
CEEA	Comitê de Ética e Experimentação em Animais
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CI	Concentração Inibitória
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50 Porcento
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CS	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Cu ²⁺	Íon Cúprico
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido Desoxiribose
DPPH	Radical 1,1- Difenil-2-PicrilHidrazila
DTNB	Ácido DitiobisNitrobenzóico
E.P.M.	Erro Padrão da Média
eV	Elétron-volt
FAPEPI	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado Piauí
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
IK	Índice de Kovats

i.p.	Intraperitoneal
IChE	Inibidores da Acetilcolinesterase
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Oxido Nítrico Sintetase Induzida
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LPS	Lipopolissacarídeos
m/z	Relação Massa Carga
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mRNAs	Acido Ribonucleico Mensageiro
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sódio Anidro
NaCl	Cloreto de Sódio
NF- κ B	Fator Kappa B nuclear
NO	Óxido Nítrico
O ₂ ⁻	Radicais Superóxido
°C	Graus Centígrados
OEF	Óleo Essencial das Folhas de <i>Citrus sinensis</i>
OH [·]	Radicais Hidroxilas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial Hidrogênico
PL	Peroxidação Lipídica
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TNF- α	Factor de Necrose Tumoral
Tris-HCl	Tris (Hidroximetil) Aminometano com Ácido Clorídrico
U/dL	Unidade por Decilitro
U/mL	Unidades por Mililitro
UFPI	Universidade Federal do Piauí
v.o.	Via oral
VCM	Volume Corpuscular Médio
V _o	Velocidade inicial

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

- Tabela 1 - Análise quantitativa dos principais constituintes presentes em seis espécies do gênero *Citrus*. 25

Capítulo II

- Tabela 1 - Análise morfológica macroscópica de camundongos *Swiss*, tratados com óleo essencial de *Citrus sinensis* por via oral durante 30 dias 46
- Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos *Swiss*, tratados com óleo essencial de *Citrus sinensis* por via oral durante 30 dias 47
- Tabela 3 - Parâmetros hematológicos obtidos do soro de camundongos *Swiss*, tratados com óleo essencial de *Citrus sinensis* por via oral durante 30 dias 48

Capítulo III

- Tabela 1 - Rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de *Citrus sinensis* 57
- Tabela 2 - Efeitos do OE de *Citrus sinensis* na peroxidação lipídica (PL), a concentração de nitrito e glutatona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongo 63

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1 - Estrutura básica dos flavonóides (A) e com grupo carbonila no C-4 (B) 28
- Figura 2 - Estrutura química da limonina (A) e do limoneno (B) 28
- Figura 3 - Estrutura química dos principais flavonóides encontrados em *Citrus* 29

Capítulo III

- Figura 1 - Estrutura química dos constituintes identificados no óleo essencial de folhas de *Citrus sinensis* 58
- Figura 2 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* obtido em equipamento CG/EM Shimadzu (Modelo GC 17A). 59
- Figura 3 - Efeitos sobre a atividade de acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo de camundongo com 2 meses de idade tratamento agudo com o óleo essencial de *Citrus sinensis* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg 61

Capítulo IV

- Figura 1 - Ratos machos *Wistar* com 2 meses de idade que foram tratados com doses agudas oralmente do óleo essencial de *C. sinensis* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (grupo OE 50, OE 100 e OE 200, n = 6) e com Neostigmina na dose de 0,5 mg/kg (n = 7). 74

RESUMO

SÁ, C.G. **Extração e testes de atividades farmacológicas do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck direcionados para a doença de Alzheimer.** Teresina-PI: UFPI, 2011. (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

As plantas com atividades psicoativas exercem importantes efeitos sobre a consciência, as emoções e a cognição. A investigação farmacológica de produtos naturais que apresentam atividade sobre o sistema nervoso central (SNC) tem auxiliado a compreensão das bases neuroquímicas de muitas doenças. Os extratos vegetais e os produtos isolados exercem suas ações por meio de interações com moléculas endógenas transdutoras de sinal, por isso, faz-se necessário o conhecimento aprofundado dessas fontes naturais. Diante deste contexto, realizou-se estudo da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja). A caracterização química do óleo essencial das folhas (OE) de *C. sinensis* resultou na identificação da mistura dos constituintes: limoneno (20,14%), citrionelol (30,42%), geranial (31,42%), mirceno (0,64%), trans-beta-ocimeno (0,73%), linalol (2,58%), citronelal (1,23%), neral (1,71%) e beta-cariofileno (2,04%). As estruturas dos compostos do OE foram identificadas por cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa (CG/EM) e comparados com dados da literatura. Os efeitos da administração oral aguda com doses repetidas do OEF de *C. sinensis* foram investigados avaliando-se os parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos *Swiss* machos adultos. Avaliou-se ainda a atividade *in vitro* e *in vivo* da enzima acetilcolinesterase (AChE) e o potencial da atividade antioxidante no hipocampo de camundongos. Os camundongos foram tratados por um período de 30 dias com o OE de *C. sinensis* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Quanto aos parâmetros bioquímicos e hematológicos o OE de *C. sinensis* não produziu efeitos tóxicos sobre os camundongos *Swiss* estudados, apenas observou-se uma redução nos níveis de triglicerídeos, sugerindo, assim, futuros estudos. Quanto aos resultados da atividade anticolinesterásica, houve uma diminuição significativa na atividade da AChE na região do hipocampo nos testes “*in vivo*” e nos testes “*in vitro*” o OE de *C. sinensis* apresentou um valor de concentração de inibição de $CI_{50} = 63 \mu\text{g/mL}$ enquanto para o padrão (neostigmina) foi obtido o valor de $CI_{50} = 1,87 \mu\text{g/mL}$. Para a atividade antioxidante foi observada uma significativa redução de 20% no hipocampo de camundongos tratados com dose de 150 mg/kg sobre a peroxidação lipídica, reduzindo, assim, o estresse oxidativo e o conteúdo de nitrito, essas dosagens apresentaram uma redução significativa em todos os grupos, sugerindo um efeito neuroprotetor contra lesões cerebrais. Em experimentos no labirinto aquático de Morris, que avalia a memória espacial em ratos, foram realizadas análises com 4 grupos, sendo um grupo controle tratado com solução de *Tween* 80 a 0,05% e três grupos tratados previamente com doses do OE de *C. sinensis* de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg., que apresentaram resultados significativamente menores do que o grupo controle [$p < 0,05$], como também o grupo tratado com um inibidor de AChE, indicando uma maior capacidade de memória espacial nos animais tratados, mais que devem ser reforçados por outros testes de memória preconizado pela literatura. Nossos resultados indicam que os efeitos do óleo essencial de *C. sinensis* pode envolver o sistema colinérgico e produzir uma reversão do prejuízo da memória, causado pelo excesso da atividade da AChE.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*. Monoterpenos. Antioxidante. Acetilcolinesterase. Oleo essencial, Doença de Alzheimer.

ABSTRACT

SÁ, C.G. **Extraction and testing of pharmacological activities of the essential oil of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck directed to Alzheimer's disease.** (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas)

Plants with psychoactive activities have significant effects on consciousness, emotions and cognition. The pharmacological research of natural products that present activity on the central nervous system (CNS) has aided the understanding of the neurochemical basis of many diseases. The plant extracts and isolated products exert their actions through interactions with endogenous molecules transducing the signal, so it is necessary to in-depth knowledge of these natural sources. In this context, a study was made of the specie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (orange). The chemical characterization of essential oil of the leaves (EO) of the *C. sinensis* resulted in the identification of the constituents of the mixture: limonene (20.14%), citronellol (30.42%), geranial (31.42%), myrcene (0.64%), trans-beta-ocimene (0.73%), linalool (2.58%), citronellal (1.23%), neral (1.71%) and beta-caryophyllene (2.04%). The structures of the compounds of the essential oil were identified by combined gas chromatograph-mass spectrometry (GC/MS) and compared with literature data. The effects of acute oral administration with repeated doses of EO of *C. sinensis* were investigated by evaluating the biochemical and hematological parameters in adult male *Swiss* mice. We also evaluated the activity *in vitro* and *in vivo* acetylcholinesterase (AChE) and the potential of antioxidant activity in the hippocampus of mice were treated for a period of 30 days with the EO in *C. sinensis* doses of 50, 100 and 200 mg/kg by weight of the animal. As for the biochemical and hematological parameters of the EO the *C. sinensis* produced no toxic effects on *Swiss* mice studied, only there was a reduction in triglyceride levels, suggesting, more study. As for the results of anticholinesterase activity, there was a significant decrease in AChE activity in the region of the hippocampus with in the tests “*in vivo*”, and tests “*in vitro*” the EO de *C. sinenses* showed an value of inhibition $IC_{50} = 63 \mu\text{g/mL}$ while for the standard (neostigmine) the value of $IC_{50} = 1.87 \mu\text{g/mL}$. For the antioxidant activity was observed a significant 20% reduction in the hippocampus of mice treated with 150 mg/kg on lipid peroxidation, thereby reducing the oxidative stress and the content of nitrite that had a significant reduction in all groups, suggesting a neuroprotective effect against brain damage. In experiments in the Morris water maze, which assesses the spatial memory in rats, were analyzed in four groups a control group treated with solution of 0,05% *Tween* 80 and three groups previously treated with doses of EO *C. sinensis* 50 mg/kg, 100 mg/kg and 200 mg/kg, wich had significantly lower results than the control [$p < 0.05$] indicating a larger memory capacity in treated animals, which must be strengthened further by other memory tests recommended by the literature. Our results indicate that the effects of essential oil of *C. sinensis* may involve the cholinergic system and produce a reversal of memory impairment caused by excess activity of AChE.

Keywords: *Citrus sinensis*. Monoterpenes. Antioxidant. Acetylcholinesterase, Essential oil, Alzheimer's disease

SUMÁRIO

Introdução	16
Referências	18
CAPÍTULO I: Constituintes e atividades farmacológicas de plantas do gênero	
<i>Citrus</i> – uma revisão bibliográfica	20
Resumo	21
Abstract	22
Introdução	23
Constituintes Biologicamente Ativos	24
Atividade Anticolinesterásica	26
Atividade Antioxidante	27
Atividade Antiinflamatória	31
Atividade Inseticida	32
Conclusões	33
Referências	35
CAPÍTULO II: Avaliação da toxicidade de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck em	
camundongos <i>Swiss</i> : uma análise bioquímica e hematológica	40
Resumo	41
Abstract	42
Introdução	43
Material e Métodos	43
Material vegetal	43
Extração do óleo volátil.	44
Análise do óleo volátil e identificação dos compostos	44
Animais e tratamento	44
Análise dos parâmetros bioquímicos	45
Análise dos parâmetros hematológicos	45
Análises estatísticas	4
Resultados e Discussão	46
Conclusão	50
Referências	51

CAPÍTULO III: Constituintes químicos, acetilcolinesterase e ensaios de atividade antioxidante do óleo essencial de folhas de <i>Citrus sinensis</i> (L.)	
Osbeck	53
Resumo	54
Abstract	55
Introdução	56
Material e Métodos	57
Material vegetal e óleos essenciais	57
Atividade anticolinesterásica “ <i>in vitro</i> ”	57
Atividade inibitória da acetilcolinesterase “ <i>in vivo</i> ”	57
Resultados e Discussão	58
Atividade anticolinesterásica “ <i>in vitro</i> ”	60
Atividade inibitória da acetilcolinesterase “ <i>in vivo</i> ”	60
Análise antioxidante	63
Conclusão	64
Referências	65
CAPÍTULO IV: Ensaios de memórias do óleo essencial do <i>Citrus sinensis</i> (L.)	
Osbeck em ratos	70
Resumo	71
Abstract	72
Introdução	73
Material e Métodos	73
Resultados	75
Discussão	75
Referências	77
Apêndice	79

1 INTRODUÇÃO

Com o crescente número de idosos na população mundial, a necessidade de medicamentos para tratar distúrbios cognitivos, como demência senil e doença de Alzheimer têm especial urgência. Há, portanto, a necessidade de se descobrir drogas modernas para diminuir o avanço dessas doenças (SHAH; GOYAL, 2011). Além disso, estudos mostraram que o hipocampo é essencial para estruturar a memória curta que é reduzida dramaticamente em indivíduos afetados pela doença de Alzheimer (DA). A DA é uma doença neurodegenerativa que afeta a memória a capacidade de raciocínio e comunicação. O tratamento mais promissor para a DA é obtido pelo aumento do nível circulante de acetilcolina no cérebro usando inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) (SERENIKI; VITAL, 2008).

Inibidores da AChE como a fisistigmina, neostigmina, galantamina e tacrina vem sendo utilizados no tratamento da DA, entretanto, alguns destes compostos apresentam efeitos colaterais indesejáveis, a tacrina (Cognex[®]) por exemplo é hepatotóxica. A galantamina (Reminyl[®]), um alcalóide obtido de plantas, possui ação longa, seletiva, reversível, e competitiva para inibir a acetilcolinesterase (AChE), é considerado mais efetivo no tratamento da doença e apresenta menos limitações (INGKANINAN *et al.*, 2000). Diante deste contexto a busca de inibidores a partir de plantas constitui em uma alternativa promissora e viável

O gênero *Citrus*, pertencente à família Rutaceae consiste em cerca de 150 gêneros e 2000 espécies, incluindo algumas espécies importantes, como *C. sinensis* (L) Osbeck (Laranja), *C. paradisi* Macfad. (Toranja), *C. limon* (L.) Burm. (Limão), *C. reticulata* Blanco (Tangerina), *C. aurantium* L. (Laranja azeda), *C. medica* L. (Citron), e *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle (lima). As plantas da maioria das espécies de *Citrus* são sempre grandes arbustos verdes ou pequenas árvores, 5-15 m de altura (ANWAR *et al.*, 2008).

A China, o Brasil e os EUA são os principais produtores de *Citrus* no mundo, chegando a produzirem cerca de 43,7% da produção mundial. Os EUA ficam atrás do Brasil na produção de *Citrus* (FAO, 2009). Outros países têm uma significativa produção de *Citrus* como a Índia, o México, a Espanha, a Itália e o Egito (SINGH; RAJAM, 2009)

Os óleos cítricos são muito versáteis e são principalmente utilizados como aromatizantes em bebidas, sabonetes, cosméticos, produtos domésticos e outros. Esses óleos são também bastante usados em tratamentos médicos e são conhecidos por exibir

propriedades antimicrobianas, como antifúngica, antibacteriana, antiviral e antiparasitária (REHMAN *et al.* 2007).

Espécies do gênero *Citrus* são ricas em flavonóides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas. A maioria dos compostos flavônicos são heterosídeos de flavanonas (hesperidosídeo, neohesperidosídeo, naringosídeo, eriodictiosídeo. Ocorrem também outros flavonóides, como a diosmina e o rutosídeo (BRUNETON, 1993). O óleo volátil da casca do fruto de *Citrus aurantium* L. apresentou atividade sedativa, hipnótica, contrastando com o extrato etanólico das folhas, que não apresentou esta atividade (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002).

As ações comprovadas em extratos de plantas medicinais ou compostos isolados, a saber: antioxidantes, antiinflamatórias, antiacetilcolinesterásicas, sedativas e inseticidas são atividades relevantes ao tratamento da Doença de Alzheimer (DA) (HOWES; HOUGHTON, 2003), justificando, portanto, a seleção da espécie *C. sinensis* (L.) Osbeck para esse estudo.

Neste trabalho investigamos por CG-EM a composição química do óleo essencial das folhas de *C. sinensis*, espécie bastante consumida no Brasil e conhecida popularmente como laranja. Foram realizados testes toxicológicos avaliando-se os parâmetros bioquímicos e hematológicos e algumas atividades farmacológicas como a atividade anticolinesterásica *in vivo* e *in vitro*, ações antioxidantes, e ainda testes de memória através do teste do labirinto aquático de Morris.

A investigação de ações do óleo essencial de *C. sinensis* (L.) Osbeck sobre o sistema nervoso central e ações anticolinesterásica descritas neste trabalho poderá possibilitar seu uso como um agente antioxidante sendo uma alternativa para a elaboração de uma futura formulação farmacêutica para auxiliar no tratamento do Mal de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- BRUNETON, J. **Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales**. 2.ed. Paris: Lavoisier, 1993.
- CARVALHO-FREITAS, M. I. R., COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biol Pharm Bull** v. 25, p. 1629-1633, 2002.
- FAO. Statistic Database [On line] disponível: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Produção de Citrus (Fao, 2009). Acessado em 20 de agosto de 2011.
- Anwar F., Naseer R., Bhangar M. I., Ashraf S., Naz T. F., Aladedunye F. A., Physico-Chemical Characteristics of Citrus Seeds and Seed Oils from Pakistan, **J Am Oil Chem So**, v. 85, p. 321–330, 2008.
- HOWES, M-JR, HOUGHTON, P.J.; Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. **Pharmacol Biochem Behav** v. 75: p. 513-527. 2003.
- INGKANINAN, C. M. de Best.; R. van der Heidjen.; A. J. P. Hofte; B. Karabatak; Irth, H.; U. R. Tjaden; J. Van der Greef; R. Verpoorte, High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products, **J. Chromatogr. A**, v. 61, p. 872, 2000.
- JS SHAH¹, RK GOYAL; Investigation of neuropsychopharmacological effects of a polyherbal formulation on the learning and memory process in rats, **Pharmacology**; v. 3 n. 2, p. 119-124, 2011
- REHMAN, S-U.; HUSSAIN, S.; NAWAZ, H.; MUSHTAQ, A. M.; MURTAZA, M. A.; RIZVI, A. J.; Inhibitory effect of Citrus peel essential oils on the microbial growth of bread. **Pak J Nutrit.** v. 6. n. 6: p. 558–561, 2007.

SANDEEPA S.; MANCHIKATLA V.; RAJAM, Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions, **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v. 15 n. 1, 2009.

SERENIKI A.; VITAL, M.A.B.F: A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev psiquiatr Rio Gd Sul**. v 30. 2008

Capítulo 1

REVISÃO DE LITERATURA

Constituintes e atividades farmacológicas de plantas do gênero *Citrus*
– uma revisão bibliográfica.

Constituintes e atividades farmacológicas de Plantas do gênero *Citrus* – uma revisão bibliográfica

Ciro Gonçalves e Sá¹, Diarlle Carvalho Nascimento², Rivelilson Mendes Freitas³, Chistiane Mendes Feitosa⁴

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, 64.049-550, Teresina, Piauí.

² Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, 64.049-550, Teresina, Piauí.

³ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, 64.049-550, Teresina, Piauí.

⁴ Centro de Ciências da Natureza, Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, 64.049-550, Teresina, Piauí.

***CORRESPONDÊNCIA:** Chistiane Mendes Feitosa: email: chistiane@ufpi.edu.br

RESUMO - As plantas do gênero *Citrus*, além de sua importância na área alimentícia, também são conhecidas por apresentarem relevantes atividades biológicas, os óleos essenciais destas espécies são compostos por uma grande variedade de substâncias tais como, flavonóides, cumarinas e terpenóides. Esta revisão reuniu informações sobre a constituição e ações biológicas exercidas por óleos essenciais extraídos de variadas partes de espécies do gênero *Citrus*. O *d*-limoneno é o composto que está presente em maiores quantidades nas espécies de *Citrus*, exercendo tanto ações inseticidas quanto inibidora da enzima acetilcolinesterase. Os flavonóides também estão presentes e são responsáveis pela capacidade sequestradora de radicais livres. Aos flavonóides dos *Citrus* atribui-se também um papel importante na inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórios, comprovando sua notável capacidade antiinflamatória.

PALAVRAS-CHAVE: *Citrus*, Óleo Essencial, Antioxidantes, Acetilcolinesterase, Antiinflamatório, Inseticida.

ABSTRACT - Constituents and pharmacological activities from plants of the genus *Citrus* – a review – Plants of the genus *Citrus*, and its importance in the food industry, are also known by various biological activities, the essential oils of these species are composed of a several substances such as flavonoids, coumarins and terpenoids. This review attempts to describe the present constitution and biological actions exerted by essential oils from various parts of the plants of the genus *Citrus*. The d-limonene is the compound that is present in higher amounts in *Citrus* species, acting as both actions insecticides inhibiting the enzyme acetylcholinesterase. Flavonoids are also present and are responsible for the sequestering capacity of free radicals. Attributed to flavonoids also play an important role in the inhibition of proinflammatory mediators, proving his remarkable ability antiinflammatory.

KEYWORDS: *Citrus*, Essential Oil, Antioxidant, Acetylcholinesterase, Anti-inflamatory, Insecticide.

INTRODUÇÃO

As frutas cítricas compõem o maior setor de produção mundial de frutas, com mais de 100 milhões de toneladas produzidas a cada temporada (HO; LIN, 2008). O gênero *Citrus* é um dos mais importantes da família Rutaceae por causa das suas frutas, que são estimados primariamente como artigos de dieta (WAHEED *et al.*, 2009). Seus óleos aromáticos são usados como agentes flavorizantes em uma ampla variedade de alimentos, bebidas, produtos de confeitaria e para aplicações em fragrâncias. Há relatos de espécies do gênero *Citrus* com importantes atividades biológicas, a saber: antioxidantes (CAMPÊLO *et al.*, 2011[a]), antimicrobianas (CHOI *et al.*, 2000), antiinflamatórias (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008), inseticidas (KARR; COATS, 1988) e anticolinesterásica (CONFORTI *et al.*, 2007).

Na tradicional medicina chinesa as cascas secas de *Citrus reticulata* Blanco vem sendo amplamente utilizadas por séculos como um remédio para tratar indigestão e no combate às síndromes inflamatórias do trato respiratório como asma e bronquite (HO; LIN, 2008). *Citrus aurantium* L. comumente conhecida como laranja-azedo é usada na medicina popular brasileira e em outros países para tratar ansiedade, insônia e como anticonvulsivante, sugerindo uma ação depressiva sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), dentre outras propriedades (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002). *C. limon* (L.) Burm conhecida popularmente como limão, foi descrita como tendo um largo número de ações, como larvicida (FURTADO *et al.*, 2005), antifúngica (EZZAT, 2001), antimicrobiana (GUTKIND *et al.*, 1981), antioxidante (LUZIA; JORGE, 2009) e antinociceptiva (CAMPÊLO *et al.*, 2011[b]), mostrando ser uma substância biologicamente ativa. Por apresentar flavonóides, óleos voláteis e cumarinas em sua constituição, onde sua atuação no SNC ainda não é bem conhecida, é sugerido que os constituintes químicos do óleo essencial de *C. limon* (L.) Burm, também exerça atividade central, o que é reforçada pelo uso popular em situações de ansiedade e depressão (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005).

O presente artigo registra informações sobre atividades dos compostos biologicamente ativos presentes em espécies do gênero *Citrus*, atividades estas que incluem ações antioxidantes, antiinflamatórias, inseticidas e anticolinesterásica.

Neste contexto fez-se uma revisão bibliográfica sobre as atividades e constituintes de espécies do gênero *Citrus*. Descreveram-se a estrutura química de alguns constituintes biologicamente ativos tais como flavonóides, cumarinas e terpenóides. Também foram relatadas as principais atividades referidas para espécies deste gênero, a saber: antioxidante,

inibidores da enzima acetilcolinesterase, antiinflamatória e inseticida. Realizou-se uma revisão sistemática até 2011 por meio do MEDLINE e LILACS, usando as seguintes palavras chaves: *Citrus*, *antioxidant*, *antioxidante*, *inseticida* e *essential oil*. Foram selecionados artigos publicados entre 1966 a 2011. Todos os artigos encontrados, preferencialmente artigos de revisão, revisões sistemáticas e de ensaios clínicos foram utilizados.

CONSTITUINTES BIOLOGICAMENTE ATIVOS

Além de serem ricas em vitamina C (ácido ascórbico) as frutas cítricas também contêm outros compostos bioativos que incluem flavonóides, cumarinas (YU *et al*, 2005), e terpenóides (OTHA; HIROSE, 1966) com propriedades potenciais de promoção à saúde (YU *et al*, 2005).

Os flavonóides podem atuar como varredores de radicais livres, moduladores de atividades enzimáticas, e inibindo a proliferação celular, bem como exercendo atividades antibiótica, antialérgica, anti-diarreica, anti-úlceras e antiinflamatória (YU *et al*, 2005). Os compostos hesperidina e o diosmina são exemplos de flavonóides que são relatados como efetivos contra radicais livres. A eriocitrina presente em grandes quantidades somente em algumas espécies como no limão e na lima, tem a maior atividade antioxidante de todos os flavonóides presentes nessas frutas (DEL-RÍO *et al*, 2003).

Os monoterpenos como, por exemplo, o *d*-limoneno chegam a representar mais de 90% da composição de alguns óleos essenciais de *Citrus* (OTHA; HIROSE, 1966). O mirceno é o segundo composto mais abundante no óleo da laranja seguido do α -pineno e do sabineno (SHAW, 1979) (Tabela 1). Foram registrados como principais constituintes presentes no óleo essencial de *C. limon* (L.) Burm os constituintes: limoneno, β -pineno, e γ -terpineno (MISHARINA; SAMUSENKO, 2007). Segundo Otha e Hirose (1966), parece não haver diferença significativa na série de composições em monoterpenos das várias espécies de *Citrus*. Os sesquiterpenos (β -elemeno, farneseno, α -selineno) também são bastante similares em sua composição, embora algum ou outro seja específico e varie na sua quantidade de acordo com o subgrupo de espécie de *Citrus*. De acordo com Yu e colaboradores (2005), há também a presença de triterpenóides altamente oxigenados, como os limonóides.

TABELA 1 - Análise quantitativa (%) dos principais constituintes presentes em óleos essenciais da casca de cinco espécies do gênero *Citrus*. ¹Kawaii *et. al.* (2000), ²Shaw (1979).

Compostos	Laranja-doce (<i>Citrus sinensis</i>)	Toranja (<i>Citrus paradisi</i>)	Limão (<i>Citrus limon</i>)	Lima (<i>Citrus latifolia</i>)	Laranja-azedada (<i>Citrus aurantium</i>)
Rutina	0,21 ¹	0,00 ¹	0,59 ¹	0,25 ¹	0,00 ¹
Hesperidina	0,49 ¹	0,00 ¹	0,00 ¹	0,05 ¹	0,00 ¹
Diosmina	0,16 ¹	0,00 ¹	0,20 ¹	0,12 ¹	0,00 ¹
Eriocitrina	0,00 ¹	0,00 ¹	0,06 ¹	0,25 ¹	0,00 ¹
α-pineno	0,60 ²	0,20 ²	0,40-2,50 ²	1,20 ²	
β-pineno			2,20-9,80 ²	0,90 ²	2,40 ²
Sabineno	0,60 ²	0,70 ²	0,50 ²	1,60 ²	
α-terpineno		0,10 ²	0,70 ²	0,80 ²	
γ-terpineno	0,10 ²	0,50 ²	2,90 ²	16,26 ²	
Terpinoleno	0,10 ²		0,60 ²	0,60 ²	0,20 ²
Citronelol			0,50 ²		
Elemol		0,40 ²			
Linalool	0,30 ²	0,86 ²	0,08 ²	0,09 ²	0,5 ²
α-terpineol	0,10 ²	0,20 ²	0,20 ²	0,30 ²	0,20 ²
Citronelal	0,10 ²	0,14 ²	0,03 ²	1,40 ²	0,30 ²
Decanal	0,10 ²	0,30 ²	0,06 ²	0,10 ²	
Geranial	0,06 ²	0,10 ²	0,60 ²	5,10 ²	
Neral	0,01 ²	0,03 ²	0,40 ²	0,40 ²	
α-sinensal	0,03 ²				
β-sinensal	0,06 ²				
β-bisaboleno			0,14 ²	2,50 ²	
β-elemeno	0,05 ²	0,06 ²			
Farneseno	0,07 ²				
Limoneno	97,0 ²	95,0 ²	80,0 ²	47,0 ²	86,0 ²
Mirceno	0,90 ²	1,40 ²	0,90 ²	0,70 ²	
Não-voláteis	1,0 ²	1,37 ²	2,20 ²	6,70 ²	0,23 ²

As cumarinas representam outra classe de compostos bioativos encontrados em *Citrus*, derivam de uma via do metabolismo da fenilalanina que leva ultimamente à síntese de furanocumarinas (YU *et al.*, 2005), apresentam atividades anticarcinogênicas e trombolíticas (DEL-RÍO *et al.*, 2003). Segundo Stanley e Jurd (1971), as cumarinas e os furanocumarinas presentes nos óleos da casca de *Citrus* spp. são essencialmente não-voláteis e, conseqüentemente, não são encontrados nos óleos essenciais. O 7-geranoxicumarina e o isopimpinellina representam dois exemplos dessa classe de compostos que foram encontradas na toranja (*grapefruit*) e na lima, respectivamente.

ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA (AChE)

Alguns inibidores da AChE têm sido encontrados naturalmente em plantas medicinais. Inibidores reversíveis da colinesterase são atualmente usados em ensaios clínicos no tratamento da doença de Alzheimer (DA). O tratamento baseia-se na inibição da AChE, que hidrolisa a acetilcolina, aumentando a sua disponibilidade para a transmissão colinérgica (MIYAZAWA; YAMAFUJI, 2005). Estudos realizados por Conforti e colaboradores (2007) com a espécie *Citrus medica* L. cv. Diamante (cidra) demonstraram atividade anticolinesterásica, podendo ser justificada pela alta quantidade de monoterpenos presentes na casca da fruta. Na verdade essa classe de compostos foi a primeira a apresentar atividade inibidora de AChE.

De acordo com estudos realizados em 17 tipos de monoterpenóides com esqueleto *p*-metano, a atividade inibidora da AChE de compostos como o γ -terpineno e o terpinen-4-ol chegam à 22,6% e 21,4% em 1,2 mM, respectivamente. Outros terpenos como o limoneno e o linalol, exercem em 164 $\mu\text{g/mL}$, uma inibição de 27% e 37%, respectivamente. Segundo Chaiyana e colaboradores (2010) a mesma atividade é apresentada ao se estudar a espécie *Citrus hystrix* DC., que provocou inibição de 10% da enzima AChE sendo que essa ação foi relacionada a presença dos monoterpenos acíclicos e monocíclicos como o citronelal e β -felandreno, respectivamente, presentes no óleo essencial extraído da folha dessa planta.

A diversidade estrutural dos terpenóides que exercem atividade inibitória da AChE dificulta a predição do potencial de relação estrutura-atividade. Mas sabe-se que algumas características, como a presença de um ligante hidrofóbico, podem estar associadas a uma maior efetividade na inibição, já que o sítio ativo da AChE é conhecido por ser susceptível à interações hidrofóbicas. Os monoterpenos consistem de um esqueleto hidrocarboneto que podem ser cíclicos (α -pineno) ou acíclicos (linalol), uma característica que também pode influenciar em sua atividade inibidora da AChE. Para os monoterpenóides bicíclicos com um esqueleto careno ou pinano, o potencial de inibição da AChE foi associado com a posição da dupla ligação (CONFORTI *et al*, 2007). A presença de olefinas terminais resultou em diminuição da inibição de AChE, assim como a presença de um grupo funcional oxigenado (MIYAZAWA; YAMAFUJI, 2005).

Além dos terpenóides, outros compostos, como as cumarinas, também mostraram exercer ação inibitória sobre a enzima AChE. Essa ação pode, por exemplo, ser atribuída ao composto citropteno (5,7-dimetoxicumarina), presente na casca da cidra, ou ao aurapteno (7-

geraniloxicumarina), presente em *C. paradisi* Macfad., que demonstrou ser um possível inibidor da AChE eritrocitária (CONFORTI *et al.*, 2007).

A atividade anticolinesterásica de extratos das folhas de *C. limon* (L.) Burm. em comparação a galantamina, medicamento bastante utilizado no tratamento do Mal de Alzheimer, e outras espécies utilizadas na medicina popular do Nordeste do Brasil, são relatadas em um *screening* divulgado por Feitosa e colaboradores. (2011).

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O estresse oxidativo produzido por radicais livres tem sido implicado na patogênese e progressão de uma ampla variedade de doenças clínicas como câncer, doenças cardiovasculares, inflamação, epilepsia, diabetes e doença de Alzheimer. O estresse oxidativo é resultante da deficiência natural das defesas antioxidantes, ou pelo aumento dos níveis de espécies reativas derivadas do oxigênio (TOMÉ *et al.*, 2010). Espécies reativas de oxigênio (ROS), como os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas (OH^\cdot) são produzidos em decorrência de muitas reações bioquímicas e podem ser consideradas a principal causa dos danos oxidativos, como desnaturação protéica, mutagênese e peroxidação lipídica (FREITAS *et al.*, 2005; CONFORTI *et al.*, 2007).

As plantas do gênero *Citrus* são ricas em compostos que possuem propriedades antioxidantes (YU *et al.*, 2005). Os compostos fenólicos, particularmente os flavonóides, têm mostrado uma importante atividade antioxidante, que é baseada principalmente nas suas características estruturais devido entre outras características químicas pelo número e posição de hidroxilas fenólicas (ANAGNOSTOPOULOU *et al.*, 2004).

Segundo Yu e colaboradores (2005), os flavonóides possuem uma ampla variedade de atividades *in vitro*. Essa classe de compostos bioativos é conhecida por atuar como sequestrante de radicais livres, como os radicais: peroxila, alquila peroxila, superóxido, hidroxila e peroxinitrito. A atividade antioxidante dos flavonóides depende da estrutura química e dos substituintes no anel heterocíclico e em seu anel B (Figura 1). A maior capacidade antioxidante pode ser relacionada a dois fatores: (a) a presença de um grupo catecol no anel B, doador de elétron e alvo dos radicais, e (b) uma 2,3-dupla ligação conjugada com um grupo 4-oxo, que é responsável pelo deslocamento de elétrons. A presença de um grupo 3-hidroxil no anel heterocíclico também aumenta a atividade antioxidante, enquanto que os grupos hidroxil ou metil adicionais nas posições 3, 5, e 7 dos anéis A e C tem menor importância para a atividade antioxidante (YU *et al.*, 2005).

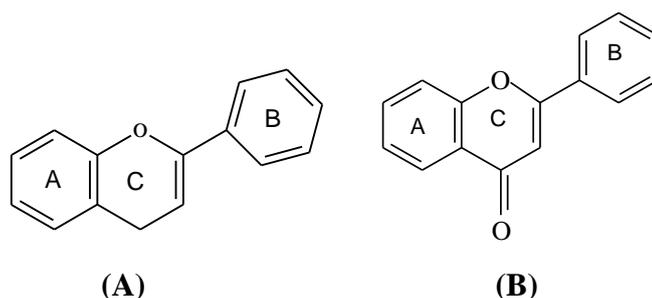


FIGURA 1 – Estrutura básica dos flavonóides (A) e com grupo carbonila no C-4(B).

De acordo com experimentos realizados por Yu e colaboradores (2005), os flavonóides encontrados em *Citrus paradisi* Macfad. demonstraram atividade sequestrante de radicais 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) maior que os compostos limonóides (Figura 2).

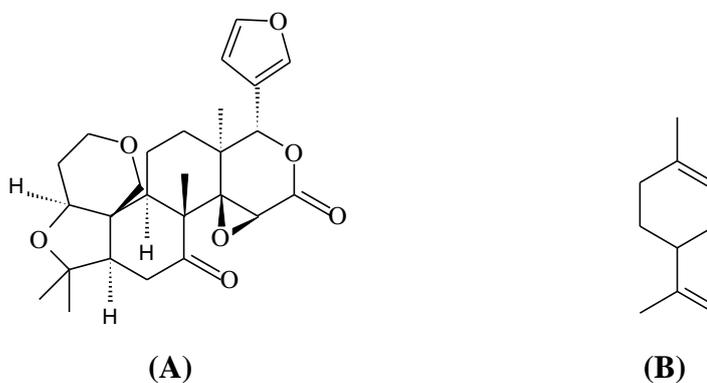


FIGURA 2- Estrutura química da limonina (A) e do limoneno (B).

Os limonóides são triterpenóides altamente oxigenados e com menos grupos hidroxil que os flavonóides. Ambas as características estruturais contribuem para fraca atividade antioxidante mostrada por esses compostos. A rutina (Figura 3) mostrou a maior atividade dentre os flavonóides, seguida da escutelareína, da neoeriocitrina e do kaempferol. Outros flavonóides como a naringina e a naringenina, e um cumarínico, o bergapteno, mostraram atividade sequestrante apenas quando em altas concentrações.

A presença de um grupo hidroxil na posição 6 do anel A, como ocorre na escutelareína (Figura 3), pode aumentar a atividade antioxidante do flavonóide. Essas características estruturais contribuem para aumentar a capacidade antioxidante das classes de flavonóides. Assim, flavonóides e flavonas contendo um grupo catecol no anel B são altamente ativos, sendo os flavonóides mais potentes que as flavonas correspondentes por causa da presença do grupo 3-hidroxil. A glicosilação deste grupo, como ocorre na rutina, reduz a capacidade sequestrante de radical. A metilação de uma das hidroxilas e a presença de somente uma

hidroxila no anel B diminuem a atividade antioxidante, como ocorre em neohesperidina, apigeína, Kaempferol e escutelareína. Flavanonas, como a naringenina e a naringina, devido à falta de conjugação na 2,3-dupla ligação com o grupo 4-oxo, são fracos antioxidantes (YU *et al* 2005).

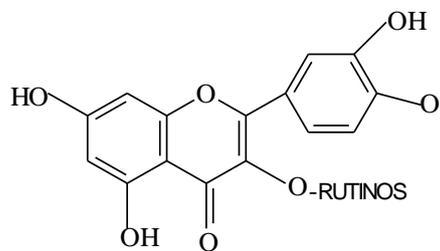
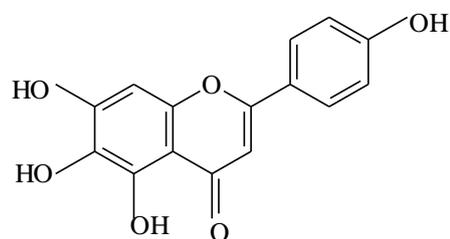
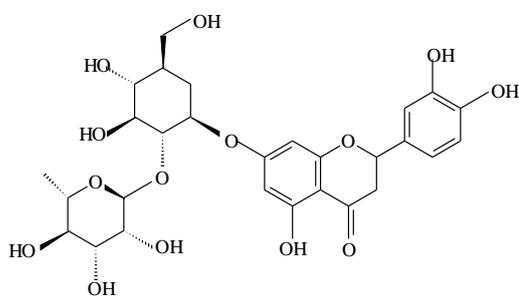
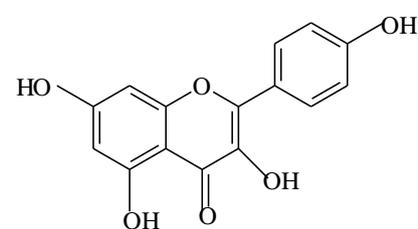
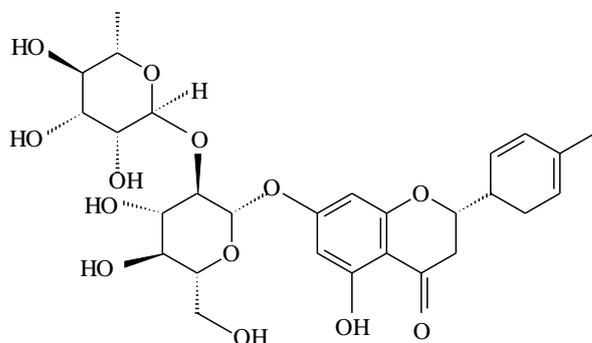
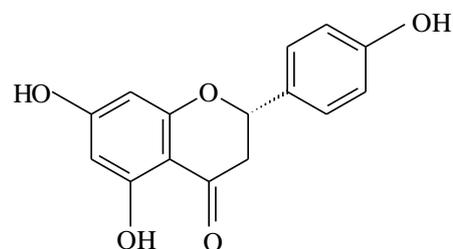
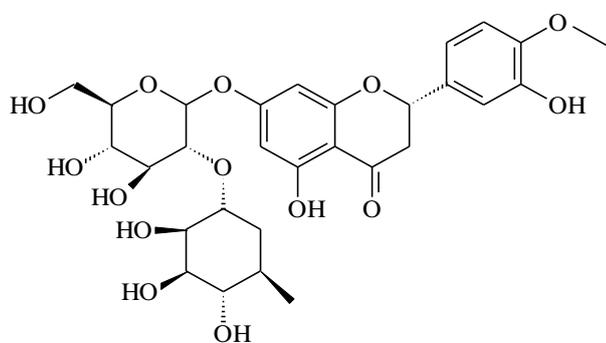
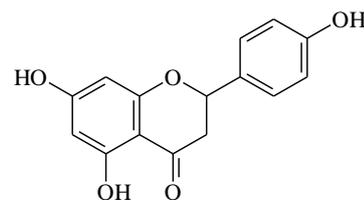
**Rutina****Escutelareína****Neeriocitrina****Kaempferol****Naringina****Naringenina****Neohesperidina****Apigenina**

FIGURA 3 - Estrutura química dos principais flavonóides encontrados no gênero *Citrus*.

Resultados positivos foram encontrados após a avaliação da atividade antioxidante dos constituintes do extrato da casca de *Citrus medica* L. cv. Diamante utilizando diferentes ensaios *in vitro* (teste de branqueamento do β -caroteno, teste DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoleico) (CONFORTI *et al.*, 2007). Conforti e colaboradores (2007) atribuíram a ação antioxidante à presença de monoterpenos, particularmente o γ -terpineno, limoneno, nerol, geraniol e α -terpineol que são os compostos mais abundantes nesse extrato. O γ -terpineno possui uma potente atividade antioxidante quando comparado ao α -tocoferol (um potente antioxidante natural) e a outros fenóis. Esse comportamento foi atribuído à presença de grupos metilenos fortemente ativos na molécula.

Choi e colaboradores (2000) investigaram trinta e quatro tipos de óleos essenciais de *Citrus* e seus componentes foram investigados quanto às suas atividades antioxidantes pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando DPPH. A atividade dos componentes quando comparada com um antioxidante padrão, o Trolox, revelaram efeitos sequestrantes em DPPH variando entre 18 e 64%. Uma possível explicação sobre a diferença em eficiência encontrada nesse estudo pode ser a variação substancial nos compostos dos óleos essenciais de *Citrus*. Dentre os 34 tipos de óleos essenciais, a atividade sequestrante de radicais do limão ichang (*C. ichangensis* Swingle), foi a maior, em comparação aos óleos do limão Tahiti (*C. aurantifolia* var. tahiti.) e do limão eureka (*C. limon* (L.) Burm.). Podendo estar relacionado à alta quantidade de terpenos com exceção do limoneno e mirceno.

Geralmente a alta atividade sequestrante de radicais foi encontrada quando os terpenos incluíam grandes quantidades de γ -terpineno e terpinoleno. Nos limões Mexicanos, tahiti, eureka e lisboa, a percentagem combinada de neral e geraniol varia de 1,7 a 3,5%. Também foi considerado que os componentes neral e geraniol contribuem para seu efeito sequestrante nessas amostras. Em *C. sinensis* (L.) Osbeck e *C. reticulata* Blanco os compostos mais efetivos, como o γ -terpineno e terpinoleno, estavam presentes em pequenas quantidades (Choi *et al.*, 2000).

O efeito antioxidante do α -terpineno, nootkatona, citronelal, citral, γ -terpineno, terpinoleno e geraniol apresentou-se muito maior do que o Trolox ($p < 0,05$). De acordo com os cálculos baseados na altura do pico de DPPH, γ -terpineno (84,7%), terpinoleno (87,4%), e geraniol (87,7%) tiveram um efeito sequestrante de radicais 3,5 vezes maior que o Trolox. A atividade antioxidante do linalol, citronelol, α -pineno, e octanal (18,7 a 22,4%) foi maior que a do α -terpineol, octanol, mirceno, decanol, β -pineno, terpen-4-ol, *p*-cimeno e d-limoneno (8,8 a 16,5%) (CHOI *et al.*, 2000).

A oxidação do LDL plasmático desempenha um papel de importância significativa no desenvolvimento da aterosclerose. A atividade antioxidante do óleo essencial de três espécies de *Citrus* (*C. natsudaidai* Hayata, *C. hassaku* HORT. Tanaka e *C. unshiu* Marcovitch) foi avaliada por Takahashi e colaboradores (2002). Estes autores verificaram os efeitos inibidores na oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) humana, induzida por Cu^{2+} e AAPH (dicloreto de 2,2-azobis (2-amidinopropano) utilizando modelos *in vitro*. Constatou-se que o γ -terpineno foi o principal responsável por inibir a ação oxidativa provocada por ambos os métodos, enquanto que outros componentes também apresentaram ação inibitória significativa, porém apenas durante a oxidação induzida por Cu^{2+} (terpinoleno e α -terpineno) ou apenas durante a oxidação induzida por AAPH (bisabolenos).

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A inflamação é tipicamente caracterizada pelo aumento da permeabilidade do tecido endotelial e influxo de leucócitos do sangue para o interstício, resultando em edema. Diferentes mediadores influenciam cada etapa da cascata de inflamação, e caracteristicamente, os agentes inflamatórios exibem propriedades terapêuticas ao bloquear a ação ou síntese desses mediadores. Apesar da inflamação ser uma resposta normal a injúria tecidual, é muitas vezes descontrolada em doenças crônicas auto-imunes, como na artrite reumatóide e doença de Crohn, ou quando relacionada à resposta alérgica como asma e choque anafilático. Nesses casos, os compostos antiinflamatórios são administrados terapêuticamente para controlar a resposta inflamatória (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Plantas ricas em certos flavonóides têm sido tradicionalmente usadas por suas propriedades antiinflamatórias, e recentemente, vem sendo verificada a presença e realizado isolamentos de flavonóides, incluindo os do gênero *Citrus*, como potenciais agentes antiinflamatórios (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008).

As propriedades antiinflamatórias apresentadas pelos compostos diosmina e hesperidina são justificadas pela inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórios, principalmente os derivados do ácido araquidônico, prostaglandinas E_2 e F_2 e tromboxano A_2 (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008; HUANG; HO, 2008). A nobiletina, um polimetoxi flavonóide, em baixas concentrações (6 μM) foi responsável por inibir a produção de PGE_2 e NO. Enquanto que a hesperidina e a naringina, produziram os mesmos efeitos em maiores concentrações (20 e 100 μM , respectivamente) (HUANG; HO, 2008). A nobiletina interfere com a produção de PGE_2 por via da *downregulation* seletiva do gene da COX-2 em

fibroblastos sinoviais humanos. Além disso, diminui a expressão de mRNAs das citocinas pró-inflamatórias e imunomodulatórias (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , e IL-6) em macrófagos de camundongos (LIN *et al.*, 2002).

A produção incontrolada de NO produzido pela oxido nítrico sintetase induzida (iNOS) produz espécies reativas de nitrogênio, que induzem danos biomoleculares e celulares, estando vinculadas à patogênese de várias doenças inflamatórias. A iNOS é induzida em resposta a várias citoninas pró-inflamatórias. Estudos realizados com extratos da casca de *Citrus reticulata* Blanco demonstrou inibição da produção de NO e na expressão de mRNA do iNOS em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) (JUNG *et al.*, 2007). LPS é uma grande molécula compreendendo um lipídio e um polissacarídeo unidos por uma ligação covalente, e que promove a secreção de citocinas pró-inflamatórias de muitos tipos de células, especialmente macrófagos (WANG *et al.*, 2010).

O efeito bloqueador de *C. reticulata* Blanco na expressão de iNOS induzido por LPS pode ser resultado da inibição transcricional do gene iNOS em macrófagos. A ativação do fator kappa B nuclear (NF- κ B) também é crítica para a indução da expressão gênica de iNOS (JUNG *et al.*, 2007). NF- κ B é uma proteína complexa que controla a transcrição do DNA. Ela é encontrada em quase todos os tipos de células animais e está envolvida na resposta celular a estímulos como estresse, citocinas, radicais livres e outros. A regulação incorreta de NF- κ B tem sido relacionada à inflamação. Uma inibição significativa dessa proteína, assim como da diferenciação de monócitos induzidos por LPS, foi constatada na presença de certas concentrações do extrato da casca de *Citrus sulcata* Tanaka, cujos principais componentes eram os flavonóides hesperidina e narirutina (WANG *et al.*, 2010).

A naringenina e a hesperetina, duas flavononas, atenuaram a produção de TNF- α induzidas por LPS/IFN- γ em células da glia. A naringenina também inibiu a expressão de iNOS e óxido nítrico induzidas por LPS/IFN- γ em células da glia, mostrando assim, forte atividade antineuroinflamatória e uma alternativa potencial para o tratamento clínico das doenças neurodegenerativas (VAFEIADOU *et al.*, 2009).

ATIVIDADE INSETICIDA

As propriedades inseticidas têm sido reconhecidas no óleo essencial de muitas espécies do gênero *Citrus* e recentemente, vários produtos contendo (+)-limoneno, linalol, ou extrato bruto do óleo de *Citrus* vem ganhando espaço no mercado. Essas substâncias podem ser

tóxicas ao ser humanos via penetração pela cutícula, pelo sistema respiratório e/ou pelo trato digestório (IBRAHIM *et al.*, 2001).

O estudo da atividade inseticida do *d*-limoneno foi investigada sobre a barata alemã, (*Blattella germânica* L.), mosca (*Musca domestica* L.), gorgulho do arroz (*Sitophilus oryzae* L.), e no crisomelídeo do milho (*Diabrotica virgifera virgifera* LECONTE). Por via tópica, o *d*-limoneno foi ligeiramente tóxico para *Blattella germânica* e para a *Musca domestica* L.. altas concentrações de vapor causaram mortalidade em *Blattella germânica* e *Sitophilus oryzae* (L.). Também em altas concentrações, o *d*-limoneno apresentou toxicidade contra ovos e larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* LECONTE (KARR; COATS, 1988).

Ezeonu e colaboradores (2000) observaram a atividade inseticida por meio da pulverização de extratos voláteis da casca de duas espécies de laranja, *C. sinensis* (L.) Osbeck e *C. aurantifolia* (L.). Ambas exibiram, em graus diferentes, atividade inseticida contra mosquito, barata e mosca. A atividade inseticida foi melhor no maior período de exposição (60 minutos) em comparação aos 30 minutos de pulverização. Os extratos voláteis de *C. sinensis* (L.) Osbeck mostraram melhor potencia inseticida, e a barata (*Blattella germânica* L.) foi à espécie mais susceptível aos efeitos da casca da laranja dentre os três insetos estudados.

Zayed e colaboradores (2009) estudaram o efeito do óleo extraído de *C. limon* (L.) Burm. sobre as larvas do inseto *Culex pipiens fatigans* e encontrou uma relação positiva entre o tempo de exposição e a porcentagem de mortalidade das larvas.

O extrato da casca de *C. aurantium* (L.) foi avaliado quanto a sua toxicidade contra a mosca-da-oliveira (*Bactrocera oleae* Gmelin), e mosca-do-mediterrâneo (*Ceratitis capitata* Wiedemann). As moscas *Bactrocera oleae* Gmelin foram mais susceptíveis ao extrato do que a *C. capitata* Wiedemann em bioensaios residuais e de contato. Ambos os sexos de *B. oleae* Gmelin foram igualmente suscetíveis nos dois testes. Entretanto, machos de *C. capitata* Wiedemann foram mais susceptíveis que as fêmeas, fato que pode ser explicado pela sua melhor capacidade de metabolizar inseticidas químicos (SISKOS *et al.*, 2008).

CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de plantas do gênero *Citrus* são abundantes em compostos biologicamente ativos que podem atuar de várias formas na promoção à saúde. Sua potente ação antioxidante é atribuída à presença de compostos fenólicos, principalmente aos flavonóides. Esses compostos além de apresentarem ação sequestrante de radicais livres,

também atuam no combate aos processos inflamatórios via inibição de mediadores pró-inflamatórios. A atividade inibitória da AChE constitui um significativo efeito induzido por cumarinas e principalmente por monoterpenóides, como o *d*-limoneno. É também devido à presença de *d*-limoneno que os extratos de *Citrus* apresentaram ações tóxicas em insetos, representando uma alternativa em potencial farmacológico aos inseticidas sintéticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro e bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

- ANAGNOSTOPOULOU, M.A.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIU, V.P.; ASSIMOPOULOU, A.N.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **J. Agr Food Chem**, v. 94: p. 19-25, 2006.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of *Citrus* flavonoids: New findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. **J. Agr Food Chem**, v. 56: p. 6185-6205, 2008.
- CAMPÊLO, L.M.L.; GONÇALVES, F.C.M.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant activity of *Citrus limon* essential oil in mice hippocampus. **Pharmac. Biol.** v. 49: p. 709-715, 2011[a].
- CAMPÊLO, L.M.L.; ALMEIDA, A.C.; FREITAS, R.L.M.; CERQUEIRA, G.S.; SOUSA, G.F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, *in press*, 2011[b].
- CARVALHO-FREITAS, M.I.R.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biol. Pharmac. Bull.**, v. 25: p. 1629-1633, 2002.
- CHAIYANA, W., SAEIO, K.; HENNINK, W.E.; OKONOGIET, S. Characterization of potent anticholinesterase plant oil based microemulsion. **Int. J. Pharmac.**, v. 40: p. 32-40, 2010.
- CHOI, H.; SONG, H.S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical-Scavenging activities of *Citrus* essential oil and their components: Detection using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. **J. Agr. Food Chem.**, v. 48: p. 4156-4161, 2000.
- CONFORTI, F.; STATTI, G.A.; TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F. *In vitro* Activities of *Citrus medica* L. vc. Diamante (Diamante citron) relevant to treatment of diabetes and Alzheimer's disease. **Phytother. Res.**, v. 21: p. 427-433, 2007.

- DEL-RIO J.A.; FUSTER, M.D.; GÓMEZ, P.; PORRAS, I.; GARCIA-LIDÓN, A.; ORTUÑO, A. *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. **Food Chem.**, v. 84: p. 457-461, 2004.
- EZEONU, F C.; CHIDUME, G.I.; UDEDI, S.C. 2001. Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. **Bior Source Technol.**, v. 76: p. 273-274, 2001.
- EZZAT, S.M. In vitro inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17: p. 757-759, 2001.
- FEITOSA, C. M.; FREITAS, R.M.; LUZ, N.N. N.; BEZERRA, MZB; TREVISAN, M.T.S. Acetylcholinesterase Inhibition by some promising Brazilian Medicinal Plants. **Braz. J. Biol.**, v. 71: p. 108-110, 2011.
- FREITAS, R.M.; SOUZA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. **FEBS J.**, v. 272: p. 1307-1312, 2005.
- FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; ANDRADE-NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V.. Atividade larvica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**. v. 34 n. 5: p. 843-847, 2005.
- GUTKIND, G.O., MARTINO, V., GRANÃ, N., COUSSIO, J.D., TORRES, R.A. 1981. Screening of south American plants for biological activities: Antibacterial and antifungal activity. **Fitoterapia**, v. 1: p. 213-218, 1981.
- HO, S.; LIN, C. Investigation of heat treating conditions for enhancing the anti-inflammatory Activity of *Citrus* Fruit (*Citrus reticulata*) peels. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56: p. 7976-7982, 2008.
- HUANG, Y.S.; HO, S.C. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of *Citrus* fruit peel. **Food Chem.**, v. 119: p. 868-873, 2010.

- IBRAHIM, M. A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; IKKALA, K. T.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: whit special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agric Food Scienc Finland*, v. 10: p. 243-259, 2001.
- JUNG K. H.; HA, E.; KIM, M. J.; WON, H. J.; ZHENG, L. T.; KIM, H. K.; HONG, S. J.; CHUNG, J. H.; YIM, S.V. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by *Citrus reticulata* extract in RAW 264.7 macrophage cells. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45: p. 1545-1550, 2007.
- KARR, L. L.; COATS, J. R. Insecticidal Properties of *d*-limonene. **J Pest Science**, v. 13: p. 287-290, 1988.
- KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M.; KOIZUMI, M.; ITO, C.; FURUKAWA, H. Quantitative study of flavonoids in leaves of *Citrus* plants. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48: p. 3865-3871, 2000.
- LIN, N.; SATO, T.; TAKAYAMA, Y.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y.; YANO, M.; ITO, A. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. **Biochem. Pharmacol.**, v. 65: p. 2065-2071, 2003.
- 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: p. 946-949, 2009.
- MISHARINA, T. A.; SAMUSENKO, A. L. Antioxidant properties of essential oil from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 44: p. 482-486, 2007.
- MIYAZAWA, M.; YAMAFUJI, C. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53: p. 1765-1765, 2005.

- OTHA, Y.; HIROSE, Y. Constituents of Cold-Pressed oil of *Citrus natsudadai* HAYATA. **Agric. Biol. Chem.**, v. 30: p. 1196-1201, 1966.
- ROBBINS, S.; KUMAR, V.; Abbas, A.K. **Bases patológicas das doenças**, 7^a ed., Elsevier, 1592 pp, 2005.
- SHAW, P.E. Review of Quantitative Analyses of *Citrus* Essential Oils. **J. Agric. Chem**, v. 27: p. 246-257, 1979.
- SISKOS, E.P.; KONSTANTOPOULOU, M.A.; MAZOMENOS, B.E. Insecticidal activity of *Citrus aurantium* peel extract against *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* adults (Diptera: Tephritidae). **J.Appl. Entomol.**, v. 133: p. 108-116, 2009.
- STANLEY, W. L.; JURD, L. Citrus coumarins. **J. Agric.Food Chem.**, v. 19: p. 1106-1110, 1971.
- TAKAHASHI, Y.; INABA, N.; KUWAHARA, S.; KUKI, W. Antioxidative effect of Citrus essential oil components on human low-density lipoprotein *in vitro*. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, v. 67: p. 195-197, 2003.
- TOMÉ, A.R.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Inhibitory action of antioxidants (ascorbic acid or alfa-tocopherol) on seizures and bran damage induced by pilocarpine in rats. **Arq. Neuro-Psiq.**, v. 68: p. 355-361, 2010.
- VAFEIADOU, K.; VAUZOUR, D.; LEE, H. Y.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E. The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 484: p. 100-109, 2009.
- VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 15: p. 361-372, 2005.

- WAHEED, A.; MAHMUD, S.; SALEEM, M; AHMAD, T. Fatty acid composition of neutral lipid: Classes of Citrus seed oil. **J. Saud. Chem.Soc.**, v. 13: p. 269-272, 2009.
- WANG, A. Y.; ZHOU, M. Y.; LIN, W. C. 2011. Antioxidative and anti-inflammatory properties of *Citrus sulcata* extracts. **Food Chem.**, v. 124: p. 958-963, 2011.
- YU, J.; WANG, L.; WAZEM, R. L. MILLER, E. G.; PIKE, L. M.; PATIL, B. S. Antioxidant activity of *Citrus limonoides*, Flavonoids, and coumarins. **J. Agric. Chem**, v. 53: p. 2009-2014, 2005.
- ZAYED, A. A.; SAEED, R. M. A.; EL NAMAKY, A. H.; ISMAIL, H. M.; MADY, H. Y. Influence of *Allium satvium* and *Citrus limon* oil extract and *bacillus thuringiensis israelensis* on some biological aspects of *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). **W. J. Zool.**, v. 4: p. 109-121, 2009.

Capítulo 2

Avaliação da toxicidade de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em camundongos *Swiss*: uma análise bioquímica e hematológica.

Avaliação da toxicidade de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em camundongos *Swiss*: uma análise bioquímica e hematológica.

Chistiane M. Feitosa^{1,*},* Ciro G. e Sá,² Lidianne M. Lopes Campêlo,² Geane F. de Sousa²,
Fabrício C. de Moura Gonçalves³, Rivelilson M. de Freitas¹

¹Centro de Ciências da Natureza, Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí,
Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, 64.049-550,

²Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela,
Ininga, 64.049-550, Teresina, Piauí.

³Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí,
Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, 64.049-550, Teresina, Piauí.

⁴Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí,
Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, 64.049-550, Teresina, Piauí.

RESUMO - A caracterização Química do óleo essencial das folhas (OEF) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja) resultou na identificação da mistura de limoneno, neril acetato, citronelol, neral, e trans geraniol. As estruturas dos compostos do óleo essencial foram identificadas por CG/EM e comparação com dados da literatura. Os efeitos da administração oral aguda com doses repetidas do óleo essencial das folhas de *C. sinensis* foram investigadas sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos *Swiss* machos adultos. Os camundongos (grupo n=9) foram tratados por um período de 30 dias com o OEF de *C. sinensis* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg por peso de animal e os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram avaliados. Conclui-se que a administração aguda com doses repetidas do OEF de *C. sinensis* não produziu efeitos tóxicos sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos sobre os camundongos *Swiss* estudados. Uma redução nos níveis de triglicérides observados sugere futuros estudos com o OEF de *C. sinensis* para possível uso no tratamento de dislipidemias.

Palavras-chaves: *Citrus sinensis*, toxicidade, bioquímica, hematológica, óleo essencial.

ABSTRACT – Toxicity evaluation of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck in male mice: a biochemical and hematological analysis - The chemical characterization of the essential oil of leaves from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja) resulted in identification of a mixture of limonene, neryl acetate, citronellol, neral, and trans geraniol. The structures of the compounds of essential oil were identified by GC/MS by comparison with literature data. The effects of the acute doses repeated oral administration of the essential oil of leaves from *C. sinenses* were investigated on biochemical and hematological parameters in male adult Swiss mice. Male rats (n=9/group) were orally treated daily for 30 days with essential oil of leaves from *C. sinensis* at the doses of 50, 100 and 200 mg/kg body weight and the biochemical and hematological parameters evaluated. In conclusion, the acute doses repeated administration of essential oil of leaves from *C. sinensis* does not produce toxic effects on most of the biochemical and hematological parameters of *Swiss* mice studied. A reduction in triglyceride levels observed suggest further studies of the essential oil of *C. sinensis* for possible use in the treatment of dyslipidemia.

Keywords: *Citrus sinensis*, toxicity, hematology, biochemistry, essential oil.

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OE) podem ser encontrados em muitas plantas aromáticas tais como as plantas cítricas. As frutas cítricas são as mais cultivadas no mundo, sendo a laranja a principal delas. A produção de laranjas e a industrialização do suco estão concentradas em quatro países, sendo o Brasil o primeiro deles, respondendo por um terço da produção mundial da fruta e quase 50% do suco fabricado. Aproximadamente 70% é processado e 30% vai para o consumo interno. O óleo essencial de laranja, extraído do pericarpo do fruto, é um subproduto da indústria do suco (SILVA-SANTOS *et al.*, 2006).

Os *Citrus* compreendem uma cultura cultivada em mais de 100 países em todo o mundo em áreas tropicais e subtropicais, onde as temperaturas são predominantemente quentes (SINGH; RAJAM, 2009). Os óleos cítricos são muito versáteis e são principalmente usados para aromatizar alimentos, bebidas, cosméticos e produtos de uso doméstico. Na terapêutica são conhecidos por exibir importantes atividades: antimicrobiana, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antiparasitários (FUSELLI *et al.*, 2008.). Os OE de espécies de *Citrus* são obtidos de diferentes partes da planta por prensagem a frio das cascas e por destilação e apresentam: terpenos, sesquiterpenos alifáticos, derivados oxigenados e hidrocarbonetos aromáticos. Tem uma proporção diferente de limoneno, α -pineno, β -pineno, mircenos, linalol e terpineno. Os monoterpênicos são os constituintes mais importantes dos OE de frutas cítricas. (MONAJEMI *et al.*, 2005)

Portanto, diante da grande utilização desses *Citrus* é importante realizar análises de sinais clínicos de toxicidade e ganho ou perda de massa corporal de animais tratados com OE destes *Citrus*. O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (IATSYNO *et al.*, 1978). No presente trabalho, foi realizada extração do óleo essencial das folhas de *C. sinensis* (L.) Osbeck. Após a extração do óleo essencial foram avaliados os seus efeitos após administração aguda em doses repetidas em parâmetros bioquímicos e hematológicos de camundongos, além de seu efeito sobre a massa de algumas vísceras.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

As folhas obtidas de *C. sinensis* para o referido estudo foram coletadas às 8 horas da manhã do 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. As exsiccatas da espécie (Número 27.143) foram depositadas no Herbário Graziella Barroso da Universidade Federal do Piauí.

EXTRAÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL

O óleo essencial de *C. sinensis* foi obtido, partindo-se de 1.080 g de folhas frescas trituradas e utilizando-se o sistema de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger durante o período de quatro horas. O óleo coletado foi subsequentemente seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e mantido sob refrigeração até a realização da análise. O rendimento do óleo foi de 0,17%, calculados com base nos volumes de óleo obtido e do peso do material vegetal fresco.

ANÁLISE DO ÓLEO VOLÁTIL E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES

A análise dos constituintes voláteis foi realizada em cromatógrafo à gás da marca Shimadzu, modelo GC 17 A, acoplado a um espectrômetro de massa CG/EM QP5050A equipado com coluna capilar de sílica fundida J & Scientific não-polar DB-5, (30 m comprimento x 0,25 mm de espessura e 0,25 μm de espessura do filme); as condições de operações foram: temperatura do injetor a 250 °C interface de 270 °C e a coluna foi programada para operar 50 °C, com elevação da temperatura na taxa de 5° C min^{-1} , até 180 °C e taxa de 10 °C min^{-1} até a temperatura de 250 °C (ADAMS, 1995), carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 1 mL/min e modo de divisão. Os espectros de massas foram gravados a partir de 30-450 m/z. Componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, 70 eV, com os da base de dados usando a biblioteca construída através do espectrômetro Wiley e outros dois computadores utilizando índices de retenção como uma pré-seleção, bem como por comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura. (ADAMS, 1995)

ANIMAIS E TRATAMENTO

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e com peso de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade

Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta (Labina[®]) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (23 ± 2 °C).

Trinta e sete camundongos correspondendo a quatro grupos (n = 10 / grupo controle e n = 9 / grupo com óleo essencial de *C. sinensis* foram tratados durante 30 dias consecutivos, por via oral, com o óleo essencial de *C. sinensis* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg dissolvido em Tween 80 0,05% (grupos OECS 50, OECS 100 e OECS 200), Tween 80 0,05% (grupo Tween 80) ou solução salina 0,9% (grupo controle).

Durante o tratamento, a massa corporal dos animais foi registrada a cada 2 dias e os animais avaliados quanto a sinais clínicos de toxicidade, consumo de água e ração. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a um jejum de 12 h e anestesiados com penobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.).

Em seguida, foi feita à coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (WAYNFORTH, 1980). O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante HB (Laborlab[®]) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALP), bilirrubinas total e direta, proteínas totais e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST[®].

ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta através do analisador automático de células hematológicas Advia 120/hematology (Siemens). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com *May-Grünwald-Giemsa*. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste *t* - *Student-Newman-Keuls*. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre \geq a 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rendimentos, a composição química e as percentagens relativas dos picos dos constituintes encontrados no óleo volátil da amostra obtida a partir das folhas de *C. sinensis* estão apresentados na Tabela 1. O rendimento calculado com base no peso das folhas frescas foi determinado como sendo 0,17%.

A identificação de derivados voláteis foi realizada por interpretação automatizada de espectros de massa dos constituintes na amostra de óleo e ainda pelo índice de retenção. Um total de nove derivados, exclusivamente monoterpenos, foi caracterizado, correspondendo a 93,38% dos derivados identificados. O constituinte mais abundante encontrado nas folhas de *C. sinensis* foi o limoneno, teve uma porcentagem de área de (20%) assim como descrito na literatura para outras espécies de *Citrus* (TU *et al.*, 2002).

Durante o tratamento, não foram observados sinais clínicos de toxicidade e nenhuma morte foi registrada. O tratamento agudo com doses repetidas do óleo essencial de *C. sinensis* não alterou de forma significativa o peso corpóreo dos animais. Esses resultados são contrários aos efeitos do extrato do fruto de uma espécie de *Citrus*, a *Citrus aurantium* em ratos produziu uma redução do consumo de alimento e do ganho de peso corporal e um índice significativo de mortalidade dos animais (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005).

Os resultados mostram que a administração oral por 30 dias com óleo essencial extraído de *C. sinensis* de forma geral, não produziu efeitos tóxicos em camundongos *Swiss* adultos, uma vez que durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado. Em adição, a atividade geral dos camundongos não foi alterada, assim como seu consumo de ração e água.

O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (IATSYNO *et al.*, 1978). O óleo essencial extraído de *C. sinensis* não alterou o ganho de massa corporal dos camundongos. Os resultados obtidos foram semelhante a estudos feitos com animais tratados com outros compostos extraídos

também de plantas medicinais (SPINELLA, *et al* , 2001; CAVALINI, *et al* 2005, HARKNESS; WAGNER, 1993), não evidenciando dessa forma mostrarem sinais de toxicidade.

TABELA 1: Análise morfológica macroscópica de camundongos *Swiss*, tratados com óleo essencial de *C. sinensis* por via oral durante 30 dias

Órgãos (g)	Controle (n=10)	OECS 50 (n=9)	OECS 100 (n=9)	OECS 150 (n=9)
Coração	0,090 ± 0,003	0,090 ± 0,005	0,098 ± 0,007	0,093 ± 0,003
Fígado	0,812 ± 0,045	0,819 ± 0,100	0,817 ± 0,035	0,835 ± 0,050
Baço	0,058 ± 0,010	0,067 ± 0,015	0,063 ± 0,015	0,065 ± 0,008
Rim	0,096 ± 0,016	0,088 ± 0,011	0,096 ± 0,018	0,091 ± 0,014
Cérebro	0,145 ± 0,013	0,145 ± 0,027	0,148 ± 0,017	0,158 ± 0,019
Pulmão	0,141 ± 0,012	0,152 ± 0,022	0,140 ± 0,012	0,145 ± 0,017
Adrenal	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001

Legenda: Análise morfológica macroscópica de camundongos machos *Swiss*, tratados por via oral com solução salina 0,9% (Controle) e com óleo essencial de *C. sinensis* nas doses 50 mg/kg (OECS 50), 100 mg/kg (OECS 100) e 200 mg/kg (OECS 200) durante 30 dias. Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores expressos em termos de massa relativa g/100g do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo. As vísceras foram cuidadosamente removidas após a eutanásia por aprofundamento de anestesia etérea. Em seguida, dissecadas e determinada suas massas úmidas em balança analítica.

O tratamento agudo com doses repetidas com óleo essencial extraído de *C. sinensis* em camundongos nas doses de 50 e 100 mg/kg, de forma geral, não induziu modificações com significado clínico importante no perfil bioquímico (Tabela 2). Entretanto, os camundongos tratados com a dose de 200 mg/kg do óleo essencial extraído de *C. sinensis* apresentaram a maioria dos parâmetros dentro da faixa de referência (VIJAYALAKSHMI, 2000), exceto para o valor da uréia e triglicérides, no grupo tratado com a maior dose, os quais diminuíram de forma significativa em 63,4 e 70% quando comparados ao grupo controle, respectivamente

($p < 0,05$), assim, como a AST que aumentou em 34% ($p < 0,05$), no grupo tratado com 200 mg/kg de óleo essencial extraído de *C. sinensis* em relação ao grupo controle (Tabela 2).

TABELA 2. Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos Swiss, tratados com óleo essencial de *C. sinensis* por via oral durante 30 dias.

Parâmetros	Controle (n=10)	OECS 50 (n=9)	OECS 100 (n=9)	OECS 200 (n=9)
Glicose (mg/dL)	88,74 ± 0,10	91,22 ± 1,82	93,67 ± 1,70 ^a	98,56 ± 0,58 ^a
Uréia (mg/dL)	54,67 ± 0,22	49,78 ± 1,37 ^a	50,89 ± 1,45 ^a	20,00 ± 1,67 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,36 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,01	1,00 ± 0,01 ^a
Triglicerídeos (mg/dL)	106,7 ± 0,05	92,56 ± 3,98 ^a	100,6 ± 3,12	31,11 ± 4,39 ^a
Albumina (g/dL)	6,64 ± 0,03	3,78 ± 0,28	4,00 ± 0,41	1,09 ± 0,19
AST (U/mL)	91,40 ± 1,81	90,78 ± 2,07	91,67 ± 1,92	122,89 ± 12,75 ^a
ALT (U/mL)	57,83 ± 0,81	53,22 ± 2,03	52,00 ± 1,89	71,89 ± 4,12 ^a
Fosfatase alcalina (U/L)	157,6 ± 0,97	138,89 ± 1,97 ^a	140,56 ± 2,28 ^a	126,33 ± 5,07 ^a
Bilirrubina total (mg/dL)	0,16 ± 0,02	0,25 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,02 ^a
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,12 ± 0,002	0,25 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,02 ^a
Amilase Pancreática (U/dL)	648,9 ± 10,27	627,9 ± 8,99	628,9 ± 12,82	704,4 ± 176,9

Legenda: Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos machos Swiss, tratados por via oral com solução salina 0,9% (Controle, $n = 10$) e com óleo essencial de *C. sinensis* (OECS) nas doses 50 mg/kg (OECS 50, $n = 9$), 100 mg/kg (OECS 100, $n = 9$) e 200 mg/kg (OECS 200, $n = 9$) durante 30 dias. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo. $a = p < 0,05$, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t - Student–Newman–Keuls como *post hoc test*);

De fato, o óleo essencial extraído de *C. sinensis* nas doses de até 200 mg/kg por via oral não produziram morte em camundongos de ambos os sexos, por um período de observação de até 30 dias. Embora de um modo geral o perfil bioquímico dos animais estivesse dentro dos valores de referência (VIJAYALAKSHMI, 2000), a maioria dos valores apresentaram variação significativa em relação ao grupo controle.

Os níveis séricos de triglicerídeos teve uma diminuição significativa nos camundongos tratados com a dose de 200 mg/kg do óleo essencial extraído de *C. sinensis*. Os dados da literatura para os valores de triglicerídeos (Tabela 2) são inferiores aos encontrados para o grupo controle, mais superiores para o encontrado para o grupo OECS 200 mg/kg (DOYAMA *et al.*, 2005; DANTAS *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 1981). Com esse resultado, é sugerido mais estudos para uma possível comprovação da ação do óleo essencial extraído de *C. sinensis* na redução dos níveis séricos de triglicerídeos e um possível tratamento de dislipidemias.

TABELA 3. Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss, tratados com óleo essencial de *C. sinensis* por via oral durante 30 dias.

Parâmetros	Controle (n=10)	OECS 50 (n=9)	OECS 100 (n=9)	OECS 200 (n=9)
Hemácias (mm³)	8,64 ± 0,03	7,78 ± 0,22 ^a	8,00 ± 0,24 ^a	8,63 ± 0,04
Hemoglobina (g/dL)	14,37 ± 0,15	14,02 ± 0,10	14,00 ± 0,17	14,97 ± 0,02 ^a
Hematócrito (%)	44,15 ± 0,30	43,78 ± 0,15	43,33 ± 0,29	41,93 ± 0,34 ^a
VCM (fL)	49,67 ± 0,04	49,00 ± 0,24	48,89 ± 0,26	52,22 ± 1,10 ^a
HCM (pg)	16,64 ± 0,03	15,33 ± 0,37 ^a	15,56 ± 0,34 ^a	17,89 ± 0,42 ^a
CHCM (g/dL)	36,50 ± 0,14	33,89 ± 0,72 ^a	34,22 ± 0,62 ^a	33,89 ± 0,42 ^a
RDW (%)	13,67 ± 0,04	14,11 ± 0,26	14,11 ± 0,26	15,56 ± 0,60 ^a
Plaquetas (mm³)	292,40 ± 0,83	310,56 ± 5,26	310,56 ± 5,18	563,22 ± 4,12 ^a
Leucócitos totais (mm³)	8,63 ± 0,03	7,48 ± 0,78	7,16 ± 0,39	6,83 ± 0,74
Neutrófilos (%)	18,66 ± 0,04	16,11 ± 1,21	17,44 ± 1,41	17,89 ± 0,82
Linfócitos (%)	78,12 ± 0,31	81,22 ± 0,68	81,22 ± 2,68	86,56 ± 2,80 ^a
Monócitos (%)	2,34 ± 0,02	2,89 ± 0,26	3,00 ± 0,37	3,44 ± 0,37 ^a

Legenda: Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos machos Swiss, tratados por via oral com solução salina 0,9% (Controle) e com óleo essencial de *C. sinensis* nas doses 50 mg/kg (OECS 50), 100 mg/kg (OECS 100) e 200 mg/kg (OECS 200) durante 30 dias. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo. a = p < 0,05, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t* - Student–Newman–Keuls como *post hoc test*);

De maneira semelhante, observou-se que o tratamento oral dos animais com o óleo essencial extraído de *C. sinensis* não alterou significativamente o perfil hematológico (Tabela 3), embora tenham sido observadas mudanças nos leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos. A contagem diferencial de neutrófilos, linfócitos, e monócitos revelou, embora dentro dos limites de referência (DOYAMA *et al.*, 2005), pequenas flutuações, porém sem indicativo de importância clínica. Quando comparados os grupos controle e tratados com o óleo essencial extraído de *C. sinensis* com grupo tratado com *Tween* 80 0,05% não foram observadas mudanças significativas em nenhum dos parâmetros hematológicos. A contagem do número de eosinófilos não foi possível devido à pequena quantidade dessas células nas amostras analisadas.

CONCLUSÕES

A extração do óleo essencial de *C. sinensis* resultou na identificação de uma maioria de monoterpenos. Baseados nos resultados obtidos a partir dos estudos hematológicos e bioquímicos do sangue dos camundongos adultos, conclui-se que a administração aguda com doses repetidas do óleo essencial de *C. sinensis* não produz efeitos tóxicos sobre a maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos estudados de camundongos *Swiss* adultos. Uma redução dos níveis de triglicerídeos observada sugerem mais estudos do óleo essencial de *C. sinensis* para um possível uso no tratamento das dislipidemias.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada financeiramente pela FAPEPI e CNPq

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing corporation, p. 468. 1995.
- CAVALIN, M.; FOLIS, G. P.; RESENER, M. C.; ALEXANDRE, R. F.; ZANNIN, M.; SIMÕES, C. M. O.; **Revista Eletrônica de Extensão**, v. 2: p. 1, 2005.
- DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C. A.; Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health Sci.** v. 28: p. 165, 2006.
- DOYAMA, J. T.; RODRIGUES, H. G.; NOVELLI, E. L.; CEREDA, E.; VILEGAS, W.; Chemical investigation and effects of tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **J. Ethnopharmacol.** v. 96: p. 371, 2005.
- FUSELLI, S. R.; DE LA ROSA, S. B. G.; EGUARAS, M. J.; FRITZ, R.; Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. **World. J Microbiol Biotechnol.**, v. 24: p. 2067-2072. 2008.
- HARKNESS, S. E.; WAGNER, J. E.; **Biologia e clínica de coelhos roedores**. São Paulo: Livraria Roca, 1993.
- IATSYNO, A. I.; BELOVA, L. F.; LIPKINA, G. S.; SOKOLOV, S. Y. A.; TRUTNEVA, E. A.; Pharmacology of Calendulose B – A new terpene glycoside obtained from the roots of *Calendula officinalis*. **Farmakologija i toksikologija.** v. 41: p. 550-560, 1978.
- MARTIN, D. W.; MAYES, P. A.; RODWELL, Y. W.; In: HARPER'S **Review of Biochemistry**. California: Lange Medical, 1981.

- MONAJEMI, R.; ORYANB, S.; HAERI-ROOHANI, A.; GHANNADI, A.; JAFARIAN, A.; Cytotoxic Effects of Essential Oils of Some Iranian Citrus Peels. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research** v. 4: p. 183-187, 2005.
- SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L. A. Análise Técnica, Econômica e de Tendências da Indústria Brasileira de Óleos Essenciais, **Rev. Bras. Pl. Med. Papel Virtual**, v. 8, 14, 2006.
- SINGH, S; RAJAM, M .V.; 2009. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. **Physiol. Mol. Biol. Plants** v. 15: p. 3-22, 2009.
- SPINELLA, M.; **Psychopharmacology of herbal medicine: plants that alter mind, brain, and behavior**, Massachussets: The MIT, 2001.
- TU N, T.; THANH L, X.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M.; Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. **Flavour Fragrance Journal**. v. 17: p. 169-174, 2002.
- VENDRUSCOLO G. S. ¹; RATES S. M. K. I. ; MENTZ L. A.; Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Rev. bras. farmacogn.** v.15: n. 4, 2005.
- VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P.; Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **J Ethnopharmacol.** v. 9: p. 69, 2000.
- WAYNFORTH, B. H. Injection techniques. **In: experimental and Surgical Techniques in the Rat**. London: Academic Press, 1980.

Capítulo 3

Constituintes químicos, atividade anticolinesterásica e ensaios antioxidantes do óleo essencial de folhas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Constituintes químicos, atividade anticolinesterásica e ensaios antioxidantes do óleo essencial de folhas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Ciro Gonçalves e Sá¹, Fabrício Custódio de Moura Gonçalves², José Machado Moita Neto³, Joaquim Soares da Costa Júnior⁴ Rivelilson Mendes Freitas¹ e Chistiane Mendes Feitosa^{1,3*}

¹Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Universidade Federal do Piauí, Campus do Junco, 64.600-000, Picos - Piauí, Brasil.

³Universidade Federal do Piauí, Departamento de Química, Campus Petrônio Portela, Ininga, Teresina-Piauí, 64.049-550, Brasil.

⁴Departamento de Química, Instituto Federal do Piauí, 64000-040, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO - *Citrus sinensis* (L.) Osbeck uma planta medicinal usada no Nordeste do Brasil. A análise do óleo essencial (OE) de *C. sinensis* revelou a mistura dos compostos: limoneno (20,14%), mircenol (0,64%), trans- beta-ocimeno (0,73%), linalol (2,58%), citronelal (1,23%), citronelol (30,42%), neral (1,71%), geranial (31,42%) e beta-cariofileno (2,04%). Neste artigo realizou-se análise *in vitro* e *in vivo* sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e o potencial antioxidante no hipocampo de camundongos *Swiss*, com o óleo essencial (OE) das folhas de *C. sinensis* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. O valor da concentração de inibição da OE foi $CI_{50} = 63 \mu\text{g/mL}$ enquanto que foi obtida o valor de $CI_{50} = 1,87 \mu\text{g/mL}$ para o padrão (neostigmina). Os resultados analisados, demonstram que com a utilização do tratamento OE em camundongos, houve uma diminuição significativa na atividade da AChE no hipocampo, o que justifica a busca de compostos inibitórios na espécie *C. sinensis*. Para a atividade antioxidante foi observada uma significativa redução de 20% sobre a peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos tratados com dose de 150 mg/kg, reduzindo assim o estresse oxidativo e a formação de nível de nitrito que tiveram uma redução significativa em todos os grupos, sugerindo um efeito neuroprotetor contra lesões cerebrais.

Palavras-chaves: *Citrus sinensis*, Acetilcolinesterase, Antioxidantes.

ABSTRACT – Chemical constituents, antioxidant activity anticholinesterase and testing of essential oil of leaves of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. - *Citrus sinensis* (L.) Osbeck medicinal plant widely used in Northeastern Brazil. The analysis revealed that the essential oil (OE). *C.sinensis* mixture is constituted of the compounds: limonene (20.14%), myrcene (0.64%), trans-beta-ocimene (0.73%), linalool (2.58%), citronellal (1.23%), citronellol (30.42%), neral (1.71%), geranial (31.42%) and beta-caryophyllene (2.04%). This paper we intend to evaluate *in vitro* and *in vivo* antiacetylcholinesterase (AChE) activity and antioxidant potential in the hippocampus of *Swiss* mice with at doses 50,100 and 200 mg/kg essential oil (EO) of the leaves from *C. sinensis*. The value of the inhibition concentration of EO was $IC_{50} = 0.07 \mu\text{g/mL}$ was obtained while the value of $IC_{50} = 1.87 \mu\text{g/mL}$ for the standard (neostigmine). The results analyzed, demonstrate that using the EO treatment in mice, there was a significant decrease in AChE activity in hippocampus, which justifies the search of compounds inhibitory in *C. sinensis*. For the antioxidant activity was observed a significant at reduction of 20% in hippocampus of mice treated with dose 150 mg/kg on lipid peroxidation, thereby reducing oxidative stress and the formation of nitrite level that had a significant reduction in all groups, suggesting a neuroprotective effect against brain injuries.

Key-words: *Citrus sinensis*, Acetylcholinesterase, Antioxidants.

INTRODUÇÃO

As plantas da família Rutaceae compreendem 140 gêneros com aproximadamente 1.300 espécies, a maioria das quais são *Citrus* (cerca de 70 espécies) e *Terminalia* (cerca de 200 espécies). São espécies cultivadas em mais de 100 países ao redor do mundo em áreas tropicais e subtropical, onde as temperaturas são sempre quentes (SINGH; RAJAM, 2009). Algumas espécies de *Citrus* tem um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antioxidante, antiviral, antifúngico, analgésico e antiinflamatórios (EZZAT, 2001; GUTTKIND, *et al* 1981, LUZIA; JORGE, 2009).

Espécies do gênero *Citrus* são ricas em flavonóides, óleo essencial, pectinas e cumarinas (KUSTER *et al*, 2003). *Citrus limon* (L.) Osbeck (Rutaceae), popularmente conhecida como "limão", tem um composto importante em seu óleo essencial, o limoneno. O óleo essencial de *C. limonia* (L.) Osbeck tem atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* L. (FURTADO *et al.*, 2005). As frutas cítricas são conhecidas por conter antioxidantes naturais em óleo, polpa de semente e casca. De acordo com estudos (PEREIRA, 1996) o extrato metanólico de sementes de limões de *C. aurantifolia* (Christm.), apresentou atividade antioxidante. Além disso, testes para inibição AChE "*in vivo*" desta espécie, apresentou resultado positivo (GUPTA; GUPTA, 1997).

C. sinensis (L.) Osbeck é uma espécie conhecida popularmente conhecida como "laranja". Estudos do óleo volátil das cascas das frutas desta espécie mostraram atividade ansiolítica e hipnótica (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002). O extrato alcoólico da casca de frutos mostrou efeitos antiespasmódico (FOSTER *et al.*, 1980). Os frutos apresentaram atividade inibidora *in vitro* potente sobre rotavírus (HYUN *et al.*, 2000) e ainda atividade antimicrobiana (CACERES *et al.*, 1987). Estudos têm demonstrado que óleo essencial de *C. sinensis*, assim como extratos de sementes, tem uma eficaz ação de repelir insetos (FERNANDES *et al.*, 2002).

Estudos mostraram que o hipocampo é essencial para a estrutura da memória curta que é dramaticamente afetada em indivíduos com a doença de Alzheimer (DA). Um promissor tratamento para a DA é o aumento do nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores da AChE (ENZ *et al.*, 1993, SERENIKI *et al.*, 2008). Neste artigo pretendeu-se avaliar *in vitro* e *in vivo* a atividade anticolinesterase e o potencial antioxidante em hipocampo de ratos adultos com óleos essenciais extraídos das folhas de *C. sinensis* (L.) Osbeck.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS

O material vegetal (folhas, flores e frutos) foi coletado por Chistiane Mendes Feitosa, em fevereiro de 2010, na cidade de Picos, Estado do Piauí, Brasil; sua exsicata foi depositada no Herbário Graziella Barroso, da Universidade Federal do Piauí sob o número 27.163. Folhas frescas (2,0 kg) foram submetidas à hidrodestilação por um período de 3h utilizando um aparelho tipo Clevenger. O óleo essencial obtido foi retirado da presença de água usando-se sulfato de sódio anidro e armazenados em recipiente de vidro escuro sob refrigeração a 5 ± 1 °C até o uso.

ATIVIDADE ANTICOLINESTERASE "IN VITRO"

O efeito inibitório da enzima acetilcolinesterase (AChE) em óleos foi avaliada pela adaptação do método de Ellman e colaboradores (ELLMAN *et al.*, 1961) em espectrofotométrico. 100 µL do óleo essencial (0,1%, 0,075%, 0,05%, 0,025% e 0,01%) em 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8, metanol 10%) foi misturado 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 por 5 min a 30° C em uma cubeta 1 mL. 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 acetiotocolina (ATCI) (4 mmol/L em água) foram adicionados. Um branco também foi preparado substituindo a enzima AChE com 100 µL de tampão (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8, 0,1% BSA). A reação foi monitorada por 5 min em 412 nm e velocidade inicial (V₀) gravada. Tampão (0,1% de metanol em 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8, 10%) foi utilizado como controle negativo. A atividade anticolinesterásica (% I) foi calculada da seguinte forma: $I (\%) = (1 - V_o \text{ amostra} / V_o \text{ do branco}) \times 100$, V_o amostra e V_o branco representam as velocidades iniciais de controle positivo, amostras e do branco. Os valores CI₅₀ foram obtidos usando plotagem Log Probit, e o medicamento neostigmina (Atrovent[®]) foi usado como padrão (ELLMAN *et al.*, 1961).

ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ACETILCOLINESTERASE "IN VIVO"

O projeto envolvendo animais foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética Animal, da Universidade Federal do Piauí (número 007/11).

Os resultados das determinações da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo de camundongos *Swiss* com 2 meses de idade pesando entre 20 a 30 g tratados por via oral durante 30 dias consecutivos com doses de 50, 100 e 200 mg/kg (grupos OE 50, OE 100 e OE 200, respectivamente), e sacrificados 1h após o último dia do tratamento com óleo essencial, foram expressos em nmol/mg proteína/min. Efeitos da administração aguda do óleo essencial de *C. sinensis*, em doses de 50, 100 e 200 mg/kg na atividade da AChE em hipocampo de ratos adultos.

Tecidos (hipocampo de camundongos machos *Swiss* aos 2 meses de idade) foram homogeneizados em tampão fosfato (pH 8,0, 0,1 mol/L) e homogeneizado de 10% (5µL) foi adicionado em um recipiente contendo 500 mL de tampão, 895 mL de água destilada e 50 uL ditiobisnitrobenzóico ácido (DTNB) 0,01 M e então a absorbância zerada em espectrofotômetro. Após a absorção ser zerada foi adicionado o iodeto de acetioticolina 0,075 mol/L e a absorbância foi registrada durante 3 min a 412 nm. A atividade enzimática foi calculada como variação de absorvância de 3 min sobre o conteúdo de proteína contida nos homogeneizados (LOWRY *et al.*, 1951).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 1 - Rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de *C. sinensis*.

Constituintes	Área (%)	* IK Calc.	*IK Literatura
Mirceno	0,64	989,3	991
Limoneno	20,14	1030,3	1031
Trans-beta-ocimeno	0,73	1046,0	1050
Linalol	2,58	1113,8	1104
Citronelal	1,23	1151,3	1153
Citronelol	30,42	1242,9	1233
Neral	1,71	1245,9	1240
Geranial	31,42	1277,8	1270
Beta-cariofileno	2,04	1413,3	1418
Total	90,91	-	

* IK= Índice de Kovat (padrão de identificação de substância em cromatografia)

A análise do OE das folhas de *C. sinensis* por meio da cromatografia gasosa revelou a presença de uma mistura de compostos: limoneno (20,14%), mirceno (0,64%), trans-beta-ocimeno (0,73%), linalol (2,58%), citronelal (1,23%), citronelol (30,42%), neral (1,71%), geranial (31,42%) e beta-cariofileno (2,04%) (Tabela 1) que tem sua fórmula estrutural apresentada (Figura 1) pelos tempos de retenção (ADAMS, 2001).

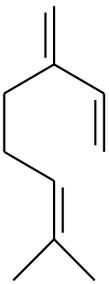
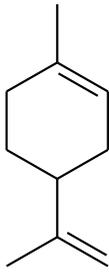
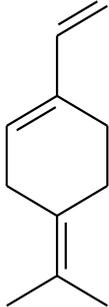
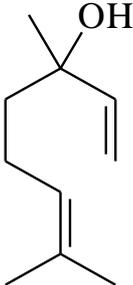
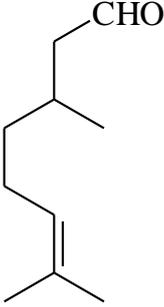
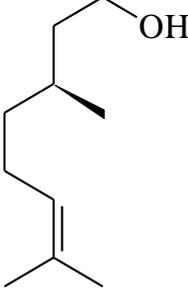
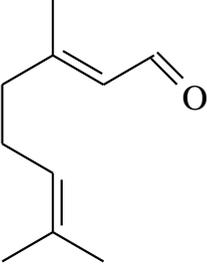
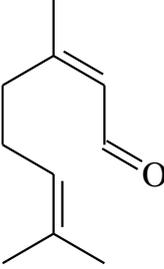
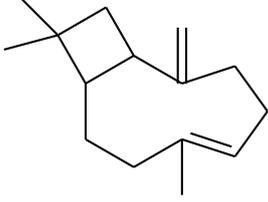
		
Mirceno (1)	Limoneno (2)	Trans Beta ocimeno (3)
		
Linalol (4)	Citronelal (5)	Citronelol (6)
		
Neral (7)	Geranial (8)	Beta Cariofileno (9)

FIGURA 1 – Estrutura química dos constituintes identificados no óleo essencial de folhas de *C. sinensis*.

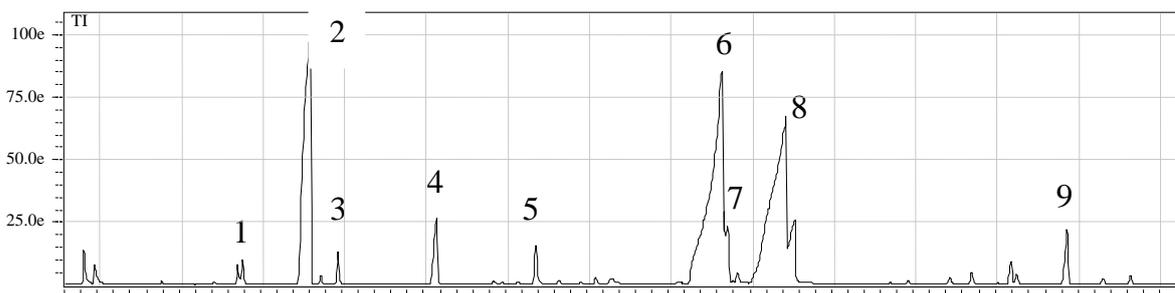


FIGURA 2. Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* obtido em equipamento CG/EM Shimadzu (Modelo GC 17A).

ATIVIDADE ANTICOLINESTERASE “*IN VITRO*”

Os resultados do efeito inibitório da enzima acetilcolinesterase (AChE) pelo método de Ellman o óleo essencial de *C. sinensis* tem uma concentração inibitória de 50% $CI_{50} = 0,069\%$, obtida usando plotagem Log Probit. Esses valores foram obtidos a partir da velocidade inicial das amostras com as cinco concentrações diferentes e comparadas com a velocidade do branco, no caso, a solução tampão. A concentração correspondente é igual a $621 \mu\text{g/mL}$, para uma inibição de 50%. Esses resultados estão de acordo com estudos realizados em 17 tipos de monoterpenóides com esqueleto *p*-metano. Os terpenos como o limoneno e o linalol, exercem em $164 \mu\text{g/mL}$, uma inibição de 27% e 37%, respectivamente. a mesma atividade é apresentada ao se estudar a espécie *Citrus hystrix* DC., que provocou inibição de 10% da enzima AChE sendo que essa ação foi relacionada a presença dos monoterpenos acíclicos e monocíclicos como o citronelal e β -felandreno, respectivamente, presentes no óleo essencial extraído da folha dessa planta. (CHAIYANA *et al.*, 2010)

ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE “*IN VIVO*”

A Doença de Alzheimer é caracterizada histopatologicamente pela perda sináptica maciça e morte neuronal observada em regiões do cérebro responsáveis por funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral, hipocampo, córtex entorrinal e striatum ventral (SELKOE, 2001). A estrutura essencial para a memória através do hipocampo diminui drasticamente em indivíduos afetados pela doença de Alzheimer (DA), doença degenerativa que afeta a memória. O tratamento clínico mais efetivo para o tratamento da DA é o de aumentar o nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores da AChE (ENZ *et al.*, 1993, SERENIKI *et al.*, 2008).

No hipocampo de camundongos *Swiss* tratados com óleos essenciais de folhas de *Citrus sinensis* uma diminuição significativa de 73, 83 e 76% na atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) foi detectada no hipocampo dos animais tratados durante 30 dias consecutivos, com doses de 50 mg/kg (veículo = $9,89 \pm 0,19$, OE 50 = $2,63 \pm 0,21$) [$p < 0,001$], 100 mg/kg (veículo = $9,89 \pm 0,19$, OE 100 = $1,65 \pm 0,15$) [$p < 0,001$] e 200 mg/kg (veículo = $9,89 \pm 0,19$, OE 200 = $2,38 \pm 0,12$) [$p < 0,001$], respectivamente, quando comparado ao grupo veículo (0,05% *Tween* 80 dissolvido em solução salina 0,9% grupo controle). Por sua vez, os animais tratados com uma dose de 100 mg/kg mostrou uma redução de 38% na atividade da AChE quando comparado com o grupo OE 50 (OE 50 = $2,63 \pm 0,21$ $1,65 \pm 0,15$ OE 100 =) [$p < 0,001$].

A porcentagem de inibição do padrão (neostigmina) foi de 95,9% e $IC_{50} = 1,87$ $\mu\text{g/mL}$ enquanto que o valor de concentração de inibição do OE de *C.sinensis* foi de $IC_{50} = 63$ $\mu\text{g/mL}$. Estudos com outros óleos essenciais já foram divulgados na literatura, como a atividade anticolinesterásica do óleo essencial *in vitro* das espécies *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh e *Ocimum canum* Sims são muito interessantes em comparação a espécie *Salvia lavandulaefolia* vahl. e *Rosmarinus officinalis* (L.) que demonstrou alguns efeitos terapêuticos valiosos. Na ação, os óleos essenciais de *S. lavandulaefolia* vahl., sugeriu que, para ser relevante no tratamento da demência do tipo Alzheimer (PERRY *et al.*, 2003) apresentaram um CI_{50} de 50 $\mu\text{g/mL}$ (SAVELEV *et al.*, 2003), enquanto que o *R. officinalis* com um valor CI_{50} de 70 $\mu\text{g/mL}$ (MATA *et al.*, 2007) melhorando o desempenho e qualidade global da memória em adultos saudáveis (MOSS *et al.*, 2003). O óleo essencial de *Salvia lavandulaefolia* vahl demonstrou também efeitos significativos sobre cognição (PERRY *et al.*, 2003).

Os principais compostos identificados nos óleos essenciais de algumas espécies inibidoras da AChE foram 1,8-cineol (33,9%), α -pineno (12,5%), *p*-cimeno (12,3%), limoneno (11,5%) para *E. camaldulensis* Dehnh; 1,8-cineol (59,9%), cânfora (8,1%) para *O. canum* Sims. e linalol (48,7%), eugenol (27,5%) para *O. basilicum* L.. Exceto o composto eugenol, todos esses compostos têm sido encontrados previamente para inibir a AChE individualmente; 1,8-cineol sendo o mais potente seguido por α -pineno, cânfora e linalol (SAVELEV *et al.*, 2003, MIYAZAWA *et al.*, 1997). As misturas dos compostos; 1,8-cineol e α -pineno, demonstram um efeito sinérgico, enquanto que os compostos 1,8-cineol e cânfora antagonizaram a atividade anticolinesterásica (SAVELEV *et al.*, 2003).

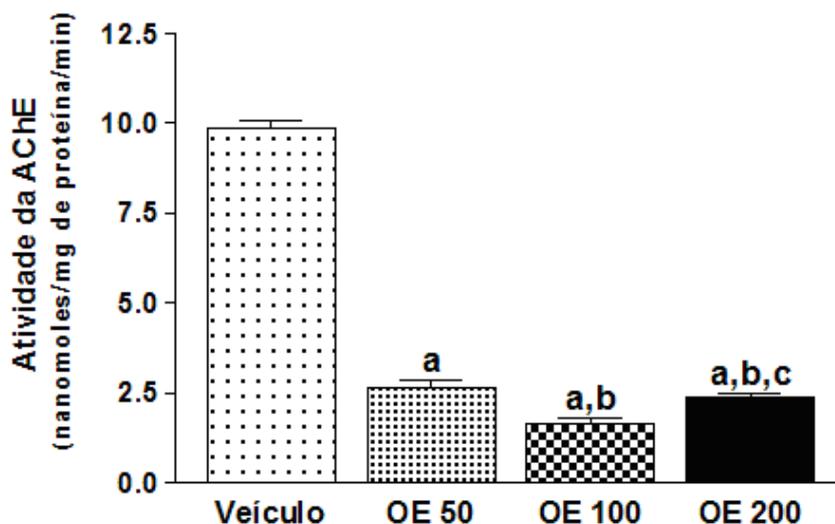


FIGURA 3 - Efeitos na atividade de inibição da acetilcolinesterase (AChE) em hipocampus de camundongos com 2 meses de idade. Utilizou-se tratamento agudo com o óleo essencial de *C.sinensis* nas doses de 50, 100 e 200mg/kg.

Legenda: Camundongos machos *Swiss* com 2 meses de idade que foram tratados oralmente com óleo essencial de *C. sinensis* por 30 dias consecutivos com doses de 50, 100 and 200 mg/kg (grupo OE 50, OE 100 e OE 200, respectivamente, n = 8 por grupo) e sacrificados 1 h após o último dia de tratamento e controles com 0.05% *Tween* 80 dissolvido em salina 0.9% (n = 9). Valores representando a média \pm E.P.M. A atividade de AChE foi determinado em 5 μ L de homogenato. A análise estatística usada foi ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc*. **a**, quando comparado ao veiculo ($p < 0.05$) **b**, quando comparado ao OE 50 ($p < 0.05$) **c**, quando comparado ao OE 100 ($p < 0.05$).

Com base na hipótese de IChE colinérgicos serem amplamente utilizados no tratamento da DA (FRANCIS *et al.*, 1999), a galantamina, um alcalóide de plantas da família Amaryllidaceae, é um IChE reversível seletivo de ação longa e competitiva. Este composto é considerado mais eficaz no tratamento da doença de Alzheimer (DA) e têm menos limitações que a fisostigmina e tacrina (GORDON *et al.*, 2000). Muitas plantas têm sido relatadas como fontes interessantes de IChE (GUPTA; GUPTA, 1997; MUKHERJEE; 2007; FEITOSA *et al* 2011) A droga sintética tacrina (Cognex) foi o primeiro IChE a ser licenciado, mas seu uso rotineiro tem sido amplamente restrito, devido à hepatotoxicidade (WATKINS *et al.*, 1994). Assim, plantas que têm demonstrado atividade hepatoprotetora são relevantes para a procura de novas formulações ou compostos que tenham ação para o

tratamento da DA, colaborando assim no tratamento. O tratamento e os inibidores da colinesterase, como fisistigmina, neostigmina, galantamina, entre outros, inibem a colinesterase, impedindo a destruição da acetilcolina, facilitando a transmissão de impulsos nervosos no bordo do neurônio motor.

ANÁLISES ANTIOXIDANTES

Estudos têm apontado que a β -amilóides encontrados em cérebros com a doença de Alzheimer podem induzir ao processo inflamatório com liberação posterior de espécies de radicais derivados do oxigênio (VINA *et al.*, 2004, STUCHBURY; MUNCH, 2005). Antioxidantes podem contribuir para esta quimioterapia diminuindo a formação de inflamação (GIBSON; HUANG, 2005) por meio da sua capacidade de remover os radicais livres. Para a atividade antioxidante é observado na Tabela 2, houve uma redução significativa de 20% no nível de peroxidação lipídica, para o tratamento com a dosagem mais alta de 150 mg/kg nos testes da ação antioxidante, reduzindo assim o estresse oxidativo e formação de nitrito, essa dosagem apresentou uma redução significativa em todos os grupos, fornecendo uma proteção contra lesões cerebrais nas alterações neuroquímicas permanentes.

Estudos farmacológicos com OE de *C. sinensis* revelou os seus efeitos sobre o nível de peroxidação lipídica, teor de nitrito, redução na concentração da glutathiona (GSH), e atividades das enzimas antioxidantes [superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPx)]. Uma vez que esses efeitos são estabelecidos, podem justificar o uso deste OE em estudos pré-clínicos e clínicos no tratamento de doenças neurodegenerativas. Óleo essencial de espécies de *C. sinensis*, outra espécie do gênero *Citrus*, apresentou nível de tratamento de peroxidação lipídica e reduziu significativamente o conteúdo de nitrito, mas aumentou os níveis de GSH e SOD, catalase, GPx e atividades no hipocampo camundongos. Estes resultados suportam fortemente a hipótese de que o estresse oxidativo no hipocampo pode ocorrer durante as doenças neurodegenerativas, provando que o dano hipocampal induzida por processo oxidativo desempenha um papel crucial em distúrbios cerebrais, e também implica que um forte efeito protetor pode ser conseguido usando OE de *C. sinensis* como um antioxidante (CAMPELO *et al.*, 2011).

A análise de CG-EM para o óleo essencial das folhas de *C. sinensis* revelou uma mistura de monoterpenos, entre os quais os compostos: limoneno (20,14%), e citral [neral (1,71%) e geranial (31,42%)].

TABELA 2-Efeitos do OE de *C. sinensis* na peroxidação lipídica (PL), a concentração de nitrito e redução da glutathiona (GSH) em hipocampo de camundongos.

Parametros	PL (nmol de MDA /g de tecido)	Formação de nitrito (nmol)	GSH (µg/g peso de tecido)
Veiculo (n = 10)	1,09 ± 0,07	80,29 ± 2,56	887,1 ± 7,58
OE 50 (n = 10)	1,040 ± 0,04	65,00 ± 3,42 ^a	869,0 ± 35,36
OE 100 (n = 10)	0,99 ± 0,04	62,86 ± 2,27 ^a	831,0 ± 26,3 ^{a, b}
OE 150 (n = 10)	0,876 ± 0,13 ^{a,b,c}	56,43 ± 3,6 ^{a,b,c}	771,9 ± 18,3 ^{a,b,c}

* Os valores representam as médias ± EPM (n = 10). Diferenças são determinadas pela Análise de Variância (ANOVA) a = p <0,05 comparado ao tratamento com veiculo (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls*), b = p <0,05 comparado aos grupos OE 50 (ANOVA and *t-Student-Neuman-Keuls*); c = p <0,05 (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls test*).

Plantas que têm mostrado efeitos favoráveis em relação aos transtornos cognitivos, incluindo anticolinesterase, atividades antiinflamatória e antioxidante ou outras atividades farmacológicas são potencialmente de interesse para uso clínico no tratamento da DA. Plantas que afetam a função colinérgica no sistema nervoso central (SNC) são particularmente relevantes no tratamento da DA (CAMPELO *et al.*, 2011, HOUGHTON; HOWES, 2003). Além de ser usado como um medicamento, IACHÉ é uma classe de inseticidas amplamente utilizados (FINKELSTEIN *et al.*, 2002).

CONCLUSÃO

Os resultados analisados, demonstram que após o tratamento em camundongos com o OE de *C. sinensis*, houve uma diminuição significativa na atividade da AChE no hipocampo, o que justifica a busca de seus inibidores desta espécie. Estudos neste trabalho mostraram que houve portanto, redução no estresse oxidativo e formação de nitrito, havendo uma redução significativa em todos os grupos, proporcionando uma proteção contra lesões cerebrais com mudanças neuroquímicas permanentes.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada financeiramente pela FAPEPI e CNPq

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P: **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. AlluredPublishing Corporation: Illinois, USA, 2001.

CACERES, A.; GIRON, L. M.; ALVARADO, S. R.; TORRES, M. F: Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal disiasas. **J Ethnopharmacol**; v. 20: p. 223-237, 1987.

CAMPELO, L. M. L.; GONÇALVES, F. B. M.; FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M: Antioxidant activity of *Citrus limon* essential oil in mouse Hippocampus, **Pharm Biol**; v. 49: p. 709–715, 2011.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; COSTA, M: Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biol Pharm Bull**; v. p. 25:1629-1633, 2002.

CHAIYANA, W.; SAEIO, K.; HENNINK, W.E.; Okonogiet, S. Characterization of potent anticholinesterase plant oil based microemulsion. **Int. J. Pharmac.**, v. 40: p. 32-40, 2010.

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

ENZ, A.; AMSTUTZ, R.; BODDEKE, H.; GMELIN, G.; MALONOWSKI, J: Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. **Prog Brain Res**; v. 98: p. 431-445, 1993.

- EZZAT, S. M: In vitro inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v.17: 757–759, 2001.
- FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M.; LUZ, N. N. N.; BEZERRA, M. Z. B.; TREVISAN, M. T. S: Acetylcholinesterase Inhibition by some promising. **Brazilian Medicinal Plants. Braz J Biol**; v. 71: p. 108-110, 2011.
- FERNANDES, J. B.; DAVID, V.; FACCHINI, P. H.; SILVA, M. F. G. F.; FILHO, E.R.; VIEIRA, P. C.; GALHIANE, M. S.; PAGNOCCA, F. C, BUENO, O. C.; M. Hebling J, Victor SR, SANTOS, A. M. R: Citrus seed oils extracts and their activity against leaf cutting ant *Atta sexdens* symbiotic fungus. **Quim Nova**; v. 25: p. 1091-1095, 2002.
- FINKELSTEIN, B. L.; BENNER, E. A.; HENDRIXSON, M. C.; KRANIS, K.T.; RAUH, J. J.; SETHURAMAN, M. R.; MCCANN, S. F: Tricyclic Cyanoguanidinas: Synthesis, Site of Action and Inseticidal Activity of Novel Class of Reversible Acetylcholinesterase Inhibitors. **Biorg Med Chem**; v. 10: p. 599-613, 2002.
- FOSTER, H. B.; NIKLAS, S.; LUTZ, S: Antispasmodic effects of some medicinal plants. **Planta Med**; v. 40: p. 309-319, 1980.
- FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K: The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**; v. 66: p. 137-147, 1999.
- FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; NETO, M. A.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V: Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotrop Entomol.** v.34:843-847. 2005.
- GIBSON, G. E.; HUANG, H. M: Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**; v. 26: p. 575-578, 2005.
- GORDON, K. W.; LILIENFELD, S.; GAENS, E: Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. **Br Med J**; v. 321: p. 1445-1478, 2000.

- GUPTA, A.; GUPTA, R: A survey of plants for presence of cholinesterase activity. **Phytochemistry**; v. 46: p 827-831, 1997.
- GUTKIND, G. O.; MARTINO, V.; GRANA, N: Screening of South American plants for biological activities. I. **Antibacterial and antifungal activity. Fitoterapia.** v.52: 213–218, 1981.
- HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J. R: Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. **Pharmacol Biochem Behav**; v. 75: p. 513-527, 2003.
- HYUN, K. D.; JEONG, S. M.; AH, B. E.; JOO, H. M: Inhibitory effect of herbal medicines on rotavirus infectivity. **Biol Pharm Bull**; v. 23: p 356-358, 2000.
- KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M: Cumarinas, cromonas e xantonas. In: Simões CMO, Shenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org.) **Farmacognosia:da planta ao medicamento.** 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, pp 247-262, 2003.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J: Protein measurement with follin phenol reagent. **J Biol Chem**; v. 193: p. 265-275, 1951.
- 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. **Quim Nova.** v. 32: p. 946–949, 2009;.
- MATA, A. T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A. R.; SERRALHEIRO, M. L. M.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAÚJO, M. E. M: Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chem**; v. 103: p. 778-786, 2007.
- MIYAZAWA, M.; WATANABE, H.; KAMEOKA, H: Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-methane skeleton. **J Agric Food Chem**; v. 45: p. 677-679, 1997.

- MOSS, M.; COOK, J.; DUCKETT, P: Aromas of Rosemary and lavender essential oils differently affect cognition and mood in healthy adults. **Int J Neurosci**; v. 113: p. 15-38, 2003.
- MUKHERJEE, P. K.; VENKATESAN, K.; MAINAK, M.; HOUGHTON, P. J: Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine.**; v. 14: p. 289–300, 2007.
- PEREIRA, R. B: Avaliação da atividade antioxidante de sementes de frutas cítricas. [Mestrado], Universidade de São Paulo, Brasil. 1996.
- PERRY, N. L.; BOLLEN, C.; PERRY, E. K.; BALLARD, C: Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacol Biochem Be**; v. 75: p. 651-659, 2003.
- RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R: Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **J Chromatogr A**; v. 915: p. 217–223, 2001.
- SAVELEV, S.; OKELLO, E.; PERRY, N. S. L.; WILKINS, R. M.; PERRY, E. K: Synergistic and antagonistic interactions of antiacetylcholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacol Biochem Be**; v. 75: p. 661-668, 2003.
- SELKOE, D: Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev**; v. 81: p. 741-766, 2001.
- SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F: A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. Ver psiquiatr Rio Gd Sul [on line]; v. 30, 2008
- SINGH, S.; RAJAM, M. V: Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. **Physiol Mol Biol Plants**. v.15: p. 3-22. 2009;

STUCHBURY, G.; MUNCH, G: Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapies. **J Neural Transm**; v. 112: p. 429-453, 2005.

VINA, J.; LLORET, A.; ORTI, R.; ALONSO, D: Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: Prevention of oxidative stress. **Mol Aspects Med**; v. 25: p. 117-123, 2004.

WATKINS, P. B.; ZIMMERMAN, H. J.; KNAPP, M. J.; GRACON, S. I.; LEWIS, K. W: Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. **JAMA**; v. 271: p. 992–998, 1994.

Capítulo 4

Estudos sobre a memória espacial em ratos tratados com o Óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Efeito do tratamento oral com óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck na retenção da memória espacial de ratos avaliada no labirinto aquático de Morris

Ciro Gonçalves Sá¹, Katrícia Maria Feitosa Cardoso¹, Chistiane Mendes Feitosa^{1,2*}, e

Rivelilson Mendes Freitas¹

¹ Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina - Piauí, Brasil.

² Universidade Federal do Piauí, Departamento de Química, Campus Petrônio Portela, Ininga, Teresina-PI, Brasil.

Autor correspondente: chistiane@ufpi.edu.br; Tel +55-86-94284102.

RESUMO - A Doença de Alzheimer está relacionada a prejuízos na aquisição e retenção da memória que podem ser estudados no laboratório por meio de estudos com animais, dentre eles o labirinto aquático de Morris, que avalia a memória espacial em ratos. O gênero *Citrus* tem diversos estudos sobre atividades biológicas que são importantes para a função da memória, como antioxidantes e anticolinesterásica. O objetivo desse trabalho é avaliar a memória espacial em ratos *Wistar* tratados com o óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Foram 5 grupos, sendo um grupo controle negativo, tratado com solução de *Tween* 80 a 0,5%, um grupo controle positivo tratado com neostigmina 0,5 mg/kg e três grupos tratados previamente com doses do óleo essencial de folhas de *C. sinensis* de 50, 100 e 200 mg/kg. Os animais foram colocados em um tanque circular de fibra de vidro, com água cobrindo uma plataforma colocada a noroeste. A aquisição da memória espacial é avaliada pelo tempo que o animal leva para localizar a plataforma depois dos treinos. De acordo com os resultados, os grupos tratados com o OEF de *C. sinensis* 50, 100 e 200 mg/kg, apresentaram resultados significativamente menores do que o grupo controle [$p < 0,05$] indicando uma capacidade de memória maior nos animais tratados, mas que devem ser reforçados por outros testes de memória preconizado pela literatura. Nossos resultados indicam que os efeitos do óleo essencial de *C. sinensis* podem envolver o sistema colinérgico e produzir uma reversão do prejuízo da memória, causado pelo excesso da atividade da AChE.

Palavras-chaves: *C. sinensis*, Memória, Doença de Alzheimer, Labirinto Aquático de Morris.

ABSTRACT – Effect of oral treatment with essential oil of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck on retention of spatial memory in rats evaluated in the Morris water maze – Alzheimer's disease is related to damage in memory acquisition and retention that can be studied in the laboratory through animal studies, including the Morris water maze, which assesses the spatial memory in rats. The genus *Citrus* has many studies on biological activities that are important for memory function as antioxidants and anticholinesterase. The objective of this study was to assess spatial memory in rats treated with essential oil of leaves of *C. sinensis* (L.) Osbeck. There were 5 groups: with a negative control group treated with a solution of 0.5% *Tween* 80, a positive control group treated with neostigmine 0.5 mg/kg, and three groups previously treated with doses of essential oil of leaves *C. sinensis* 50, 100 and 200 mg/kg. The animals were placed in a circular tank of fiber glass, with water covering a platform placed in the northwest. The acquisition of spatial memory is assessed by the time the animal takes to locate the platform after being trained. According to the results the groups treated with the EOL *C. sinensis* of 50, 100 and 200 mg/kg, showed significantly lower results than the control group [$p < 0.05$] indicating a increased memory capacity in the treated animals, but must be reinforced by other memory tests recommended by the literature. Our results indicate that the effects of essential oil of *C. sinensis* may involve the cholinergic system and produce a reversal of memory impairment caused by excess activity of AChE

Keywords: *Citrus sinensis*, Memory, Alzheimer's disease. Morris Water Maze.

INTRODUÇÃO

As doenças relacionadas a déficits cognitivos como a Doença de Alzheimer e prejuízos relacionados à aquisição e retenção da memória acometem cada vez mais pessoas, prejudicando suas atividades de vida diária e conseqüentemente interferindo na qualidade de vida de indivíduos portadores das doenças neurodegenerativas. Muitos aspectos da memória humana e de outros animais assemelham-se. Dessa forma, no laboratório, os estudos sobre memória e aprendizagem podem ter o número de variáveis reduzido, conhecido e melhor controlado (Oliveira & Bizarro, 2007).

Para estudar os mecanismos envolvidos sobre a memória de roedores, diversos métodos têm sido propostos. Dentre eles, a tarefa do labirinto aquático de Morris, que é um teste comportamental para a avaliação da memória espacial amplamente utilizado na literatura (Bavaresco, 2008). Alguns estudos feitos com ratos indicam que as atividades físicas, e o tratamento com extrato da espécie *Ginko biloba* facilitam a percepção para encontrar a plataforma submersa no labirinto aquático (Wang *et al.*, 2006; Alaei *et al.*, 2008).

Há relatos na literatura de trabalhos com espécies do gênero *Citrus* com atividades biológicas que são importantes para a função da memória, a saber: antioxidantes (Campêlo *et al.*, 2011) e anticolinesterásica (Conforti *et al.*, 2007). Diante disso, é importante, a realização de estudos dos compostos relatados deste gênero na avaliação da memória de ratos.

Estudos com *C. sinensis*, conhecida popularmente como laranja, assim como outros da espécie *Citrus*, apresentou atividades anticolinesterásica *in vitro*, sendo, portanto, uma espécie promissora para futuras formulações para doenças que envolvem a memória incluindo a doença de Alzheimer.

Neste trabalho avaliamos a memória espacial de ratos *Wistar* através de um experimento com o Labirinto Aquático de Morris, tratados previamente com o óleo essencial das folhas de *C. sinensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto para realização deste trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da UFPI sob parecer de número (007/11).

Animais: Neste experimento foram utilizados ratos *Wistar*, machos, oriundos do biotério da Universidade Federal do Piauí, pesando entre 250 – 300 g. Os animais foram mantidos no laboratório do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, com água e ração à vontade,

até o início dos testes. Foi controlado o ciclo de luz (12/12 h) e a temperatura climatizada (22 ± 1 °C).

O óleo essencial de *C. sinensis* foi obtido, partindo-se de 1.080 g de folhas frescas trituradas e utilizando-se o sistema de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger durante o período de quatro horas. O óleo coletado foi subseqüentemente seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e mantido sob refrigeração até a realização da análise. O rendimento do óleo foi de 0,17%, calculados com base nos volumes de óleo obtido e do peso do material vegetal fresco.

Grupos experimentais: Foi realizado um experimento, utilizando-se 5 grupos com 7 animais nos grupos controles e 6 animais nos grupos tratados com o OE. Os grupos foram tratados da seguinte forma: controle negativo (solução de *Tween* 80 a 0,5%), controle positivo (neostigmina 0,5 mg/kg), óleo essencial de *C. sinensis* (50 e 100 e 200 mg/kg). Em todos os experimentos as doses foram aplicadas via oral (v.o.), antes dos treinos/testes realizados no Labirinto aquático de Morris.

Teste do Labirinto aquático de Morris (Morris Water Maze): Este teste avalia a capacidade do animal para a aquisição e retenção de memória espacial, ao se mensurar a latência para que o animal localize uma plataforma submersa em um tanque com água opaca (Morris *et al.*, 1982). Foi utilizado um tanque circular de fibra de vidro, com 134,0 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura, com uma plataforma quadrada de aço inoxidável, com dimensões de 15,0 x 15,0 cm de largura e 28,5 cm de altura. Para a realização do teste o tanque foi cheio com água até que o nível dela ultrapasse 2,0 cm a altura da plataforma. Em seguida a água ficou opaca com acréscimo de amido de milho. O teste consistiu de 2 dias de treinamento e uma sessão de testes realizada 48 horas após o último treino. Na fase de treinamento, os ratos tinham 6 ensaios diários, com um tempo máximo de 54 segundos para cada ensaio e intervalos de 30 segundos, para encontrar a plataforma localizada no quadrante noroeste e para cada teste o animal foi solto de frente para a parede do tanque, saindo de pontos determinados aleatoriamente, que não seja daquele onde estava a plataforma. A aquisição da memória espacial foi avaliada pela retenção da memória após o término dos treinos no teste feito no quarto dia do experimento.

Análise dos resultados: Após a coleta dos dados, os mesmos foram tabulados em planilhas e em seguida analisados estatisticamente, utilizando-se o “Software” GraphPad Prisma 3.01. A comparação entre os grupos experimentais, em relação à variável latência para encontrar a plataforma submersa, no teste do Labirinto aquático de Morris, foi realizada por

meio do teste *one-way* ANOVA, seguida pelo teste *Newman-Keuls* como *post test* e com o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os resultados do teste do Labirinto Aquático de Morris apresentaram uma redução significativa no tempo que o animal leva para encontrar a plataforma submersa quando se compara o grupo tratado apenas com veículo e os grupos tratados com o óleo essencial das folhas de *C. sinensis* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, com uma redução respectiva de 61,2%, 57,6% e 58,1% ($p < 0,01$) e uma redução de 64,1% em comparação ao grupo tratado com neostigmina 0,5mg/kg (Figura 1).

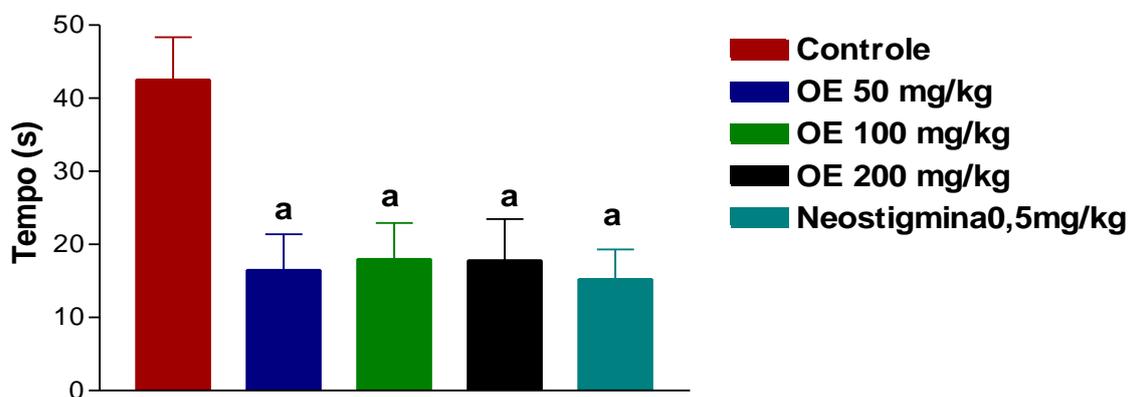


Figura 1 – Ratos machos *Wistar* com 2 meses de idade que foram tratados com doses agudas oralmente do óleo essencial de *C. sinensis* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (grupo OE 50, OE 100 e OE 200, $n = 6$) e com Neostigmina na dose de 0,5 mg/kg ($n = 7$).

a - quando comparado ao grupo controle tratado com veículo ($p < 0,01$). valor - $P \rightarrow 0,0021$ e $F \rightarrow 5,643$. F crítico - 2,742

DISCUSSÃO

A escolha de uma tarefa para avaliar o aprendizado e a memória de um animal, deve levar em consideração a capacidade do animal de aprender a tarefa e sua capacidade de executá-la. Na avaliação da cognição em ratos a tarefa do labirinto aquático de Morris é adequada, uma vez que estes animais se mostram bons nadadores e apresentam uma boa capacidade de localização espacial requerida nesta tarefa e pelo fato da água ser um meio aversivo, a tendência do animal é procurar escapar desse meio (Pettenuzzo, 2001).

Nos estudos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa analisando a atividade *in vitro* da enzima acetilcolinesterase com o óleo essencial (OE) das folhas de *C. sinensis* foram relatados valores de inibição do OE sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE) *in vitro* no valor correspondente de $CI_{50} = 63 \mu\text{g/mL}$ em comparação a um inibidor reversível da AChE, que foi utilizado como padrão (neostigmina) com o valor de $CI_{50} = 1,87 \mu\text{g/mL}$.

Em experimentos com labirinto aquático e ratos *Wistar* jovens, Segal *et al* (1988), foram um dos primeiros pesquisadores a estudar a correlação entre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em cérebro de ratos e o desempenho em uma tarefa espacial. Nesse estudo os autores avaliaram a atividade da enzima AChE em 43 regiões cerebrais diferentes de ratos. A aprendizagem individual e os índices de retenção foram encontrados e correlacionada significativamente com o nível da AChE em regiões específicas como o corpo estriado e hipocampo. Nesse estudo foi verificado que os altos níveis da AChE nessas regiões cerebrais previu um desempenho ruim dos ratos no labirinto aquático. Assim, a atividade colinérgica em regiões selecionadas do cérebro dos ratos deve estar envolvida na execução de tarefas como a memória espacial.

Os inibidores da AChE utilizados como tratamento da Doença de Alzheimer (tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina) alteram a função colinérgica central ao inibir as enzimas que degradam a acetilcolina como a enzima AChE, aumentando, assim, a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (Grossberg *et al.*, 2003). Portanto, analisando nossos resultados podemos sugerir que os efeitos do OE de *C. sinensis*, por ser um inibidor da AChE, melhorou o desempenho dos animais tratados com o OE, quando comparado com o grupo tratado apenas com o *Tween* 80 a 0,5% e um resultado estatisticamente igual, quando comparado ao grupo tratado com um inibidor reversível da AChE, a neostigmina.

Pesquisas indicam que as frutas cítricas tem um grande potencial antioxidante, devido provavelmente, à concentração de fenóis totais e flavonóides (Peter, 2011), sendo uma importante ação para a preservação da memória, e a ação do óleo essencial das folhas de *C. sinensis* nessa avaliação preliminar da memória de ratos (Figura 1) apresentou um resultado promissor. No entanto, com esses resultados podemos sugerir que a realização de novos testes complementares sobre o processo de memória em ratos precisam ser feitos para justificar o desenvolvimento de uma nova formulação para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de financiamento FAPEPI e CNPq.

REFERÊNCIAS

- ALAEI H, MOLOUDI R, SARKAKI AR. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. **J Bodyw Mov Ther.**; (12):72-75. 2008.
- BAVARESCO CS. **Alterações bioquímicas e comportamentais em ratos submetidos à administração intra-estriatal de hipoxantina.** [Tese] Porto Alegre: Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.
- CAMPÊLO LML; ALMEIDA AC; FREITAS RLM, CERQUEIRA GS; SOUSA GF; SALDANHA GB; FEITOSA CM; FREITAS RM. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **J Biomed Biotechnol**, *in press*, 2011.
- CONFORTI F, STATTI GA, TUNDIS R, LOIZZO MR, MENICHINI F. *In vitro* Activities of *Citrus medica* L. vc. Diamante (Diamante citron) relevant to treatment of diabetes and Alzheimer's disease. **Phytother. Res.**; v. 21: p. 427-433, 2007.
- GROSSBERG, G.T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. **Curr The Res.**; v. 4: p. 216-235, 2003.
- MORRIS RGM, GARRUD P, RAWLINS JNP, O'KEEFE J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**; v. 297: p. 681-683, 1982.
- OLIVEIRA A, BIZARRO L. A pesquisa sobre memória através de modelos experimentais, In: Oliveira, A., **Memória: cognição e comportamento.** São Paulo: Casa do Psicólogo.; p. 65-83, 2007.
- PETTENUZZO LF. **Efeito da administração crônica pós-natal dos ácidos propiônicos e metilmalônico sobre o comportamento de ratos no labirinto aquático de Morris (Water Maze) e sobre alguns parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo em hipocampo.** [Dissertação]. Instituto de Ciências Básicas de Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2001.

PETER AR. Phytochemicals and antioxidant capacity of orange *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana juice produced under organic and integrated farming system in Greece. **Sci. Hortic.**; v. 129 n. 2: p- 253-258, 2011.

WANG Y, WANG L, WU J, CAI J. The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats. **Br J Pharmacol.**; v. 148: p. 147-53, 2006.

SEGAL M, GREENBERGER V, ISRAELI M, BIEGON A. A correlation between regional acetylcholinesterase activity in rat brain and performance in a spatial task. **Behav Brain Res.** v. 30: p. 215-219, 1988.

APÊNDICE

Apendice 1 - Resposta de submissão do artigo “Chemicals constituents, acetylcholinesterase and antioxidant activity assays the essential oil leaves from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.”



Online submission / Tracking area

Check manuscript status				
Ref. Nr.	Manuscript title	PDF as submitted	Submission date	Current status
P 1689	Chemicals constituents, acetylcholinesterase and antioxidant activity assays the essential oil leaves from <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.	<u>manuscript05173.pdf</u>	08.09.11 21:37:52	Under review

 Show details
  Show correspondence

Apendice 2 - Resposta de submissão do artigo "Efeito do tratamento oral com óleo essencial de Citrus sinensis Osbeck na retenção da memória espacial de ratos avaliada no labirinto aquático de Morris"

----- Mensagem encaminhada -----

De: **Cleópatra da Silva Planeta** <fcfarseer@gmail.com>

Data: 21 de setembro de 2011 15:09

Assunto: [RCFBA] Agradecimento pela Submissão

Para: Chistiane Mendes Feitosa <chistiane@ufpi.edu.br>

Chistiane Mendes Feitosa,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Efeito do tratamento oral com óleo essencial de Citrus sinensis Osbeck na retenção da memória espacial de ratos avaliada no labirinto aquático de Morris" para {\$Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada}.

URL do Manuscrito:

http://200.145.71.150/seer/index.php/Cien_Farm/author/submission/1991

Login: chistiane

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email:

rcfba@fcfar.unesp.br.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

{Profª. Dra. Eliana Aparecida Varanda}

{Profª. Dra. Cleópatra da Silva Planeta}

{Editores}

Prof. Dr. Cleópatra da Silva Planeta

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/index

rcfba@fcfar.unesp.br

Apêndice 3 – Certificado de apresentação de trabalho no Congresso Brasileiro de Química “Estudo do estresse oxidativo e inibição da enzima acetilcolinesterase pelo óleo essencial de *Citrus sinensis*”



Florianópolis, 23 a 26 de maio de 2011

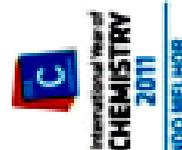
ATESTADO

Atestamos que o trabalho “Estudo do estresse oxidativo e inibição da enzima acetilcolinesterase pelo óleo essencial de *Citrus sinensis*”, autoria de Gonçalves, F. C. M.; Sá, C. G.; Freitas, R. M.; Feltosa, C. M. foi apresentado na forma de pôster durante a 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Florianópolis, 26 de maio de 2011.

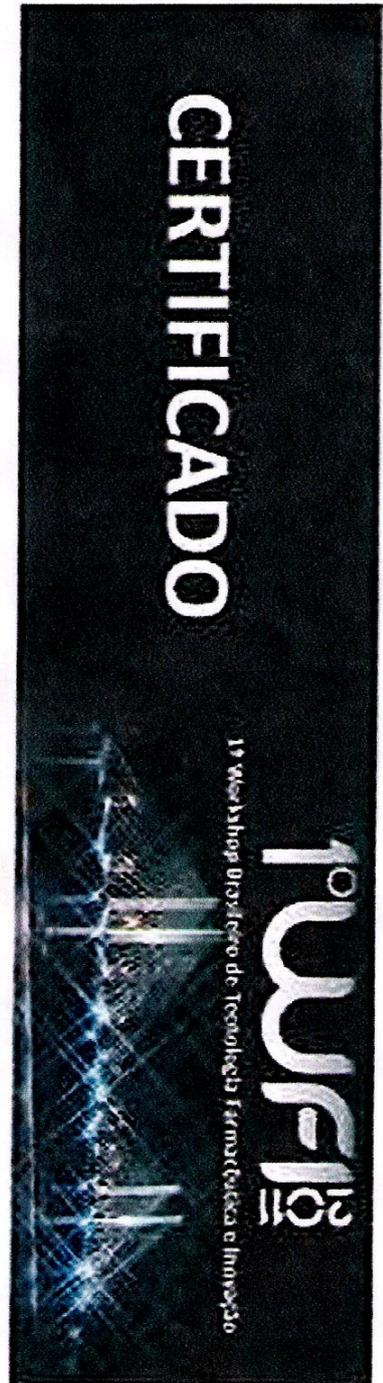
César Zucco
Presidente da SBQ
34ª Reunião Anual SBQ

Adriano D. Andricopulo
Presidente da Comissão Organizadora
34ª Reunião Anual SBQ



QUÍMICA PARA UM MUNDO MELHOR

Apêndice 4 – Certificado de apresentação de trabalho no I Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica e Inovação “O uso de óleo essencial de *Citrus sinensis* em um possível tratamento do mal de Alzheimer”



P 166

Certificamos que o trabalho científico intitulado de O USO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CITRUS SINENSES EM UM POSSÍVEL TRATAMENTO DO MAL DE ALZHEIMER de autoria de Ciro G. Sá, Lidianne M. L. Campêlo, Jéssica P. Costa, Chistiane M. Feitosa, Rivalison M. de Freitas foi apresentado no 1º Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica e Inovação – WF2011, realizado de 23 a 25 de março de 2011, no Mercure Del Mar Hotel, Aracaju, Brasil.

Prof. Dr. Adriano A. S. Araújo
Presidente do WF2011

Prof. Rivalison M. de Freitas
Pró-Reitor de Extensão UFS

Prof. Gilson Kennedy
Pró-Reitor de Extensão UNIT



Apendice 5 – Certificado de apresentação de trabalho no Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil “Parametros hematológicos obtidos de camundongos *Swiss*, tratados com óleo essencial de *Citrus limmonia*”

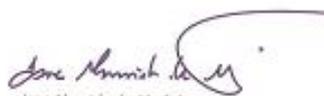


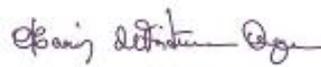
CERTIFICADO

Certificamos que *CIRO GONÇALVES E SÁ, LIDIANNE MAYRA LOPES CAMPELO, FABRÍCIO CUSTÓDIO DE MOURA GONÇALVES, RIVELILSON MENDES DE FREITAS, CHISTIANE MENDES FEITOSA*, participaram do XXI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, realizado no período de 14 a 17 de setembro de 2010, no Centro de Convenções do Tropical Hotel Tambau, na cidade de João Pessoa-PB, na qualidade de: AUTOR (S) DO TRABALHO: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS OBTIDOS DE CAMUNDONGOS SWISS, TRATADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE CITRUS LIMMONIA, na categoria POSTER.

João Pessoa-PB, 17 de setembro de 2010.




Isac Almeida de Medeiros
Presidente do XXI SPMB


Maria de Sílvia Agra
Coord^a. da Comissão Científica

