

## PURIFICAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE *CITRUS LIMONUM* PARA TESTE DE ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Luana Nayara Alves Ferreira<sup>1</sup>; Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Farmácia- CCS – UFPE; E-mail: luanna\_nayara15@hotmail.com,

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Ciências Farmacêuticas – CCS – UFPE. E-mail: elba@ufpe.br.

**Sumário:** Com o aumento no número de idosos na população mundial, aumentou também o número de casos de patologias que acometem essa classe, as quais são bem representadas pelas doenças crônicas degenerativas, merecendo destaque e atenção a prevalência da Doença de Alzheimer (DA). A DA é uma patologia neurodegenerativa, frequentemente associada à idade, cujas implicações cognitivas e neuropsiquiátricas culminam em uma deficiência progressiva, com eventual incapacitação do paciente. Esses pacientes possuem quantidade reduzida do neurotransmissor acetilcolina, responsável pela transmissão sináptica, gerando o principal sintoma da doença, o esquecimento/demência. Dentre as plantas em estudo temos a espécie *Citrus limonum*, apontada pela literatura como possuidora de atividades como antioxidante, antidepressiva, anti-inflamatória, que podem ter utilidade no tratamento da DA. Esse estudo teve como objetivo a purificação do extrato metanólico das folhas da espécie *Citrus limonum* com posterior identificação da atividade anticolinesterásica. Nos extratos das folhas da referida planta foi observada a atividade anticolinesterásica, em seguida foi isolado um composto cumarínico dimetoxilado na fração de média polaridade (diclometano), sendo este composto indicado pela literatura como possuidor de atividade anticolinesterásica.

**Palavras-chave:** alzheimer; atividade anticolinesterásica; *Citrus limonum*; cumarina.

### INTRODUÇÃO

Com o aumento no número de idosos na população mundial, observa-se um proporcional aumento no número de casos de patologias que acometem essa faixa da população, as quais são bem representadas pelas doenças crônicas degenerativas, merecendo destaque e atenção a prevalência da Doença de Alzheimer, citada por alguns estudos onde se observou que a partir dos 65 anos, mais de 5% da população é acometida com esta doença e que acima dos 80 anos de idade, esse número pode chegar a 20% (CAMPS et al., 2000). A Doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa (Figura 1), frequentemente associada à idade, cujas implicações cognitivas e neuropsiquiátricas culminam em uma deficiência progressiva, com eventual incapacitação do paciente (SERENIKI & VITAL, 2008). O tratamento para a Doença de Alzheimer (DA) é sintomático, na tentativa de restaurar a função colinérgica. A promoção da elevação dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica se mostrou útil na melhora da deficiência da aprendizagem, que é também um dos sinais da doença (MINETT & BERTOLUCCI, 2000). Contudo temos algumas desvantagens relacionadas aos efeitos dessas drogas aprovadas para o tratamento da DA, por se limitar a promoção do retardamento na evolução natural da doença, implicando apenas numa melhora temporária do estado funcional do paciente, além de possuírem grande potencial de desenvolvimento de reações adversas, dificultando assim a adesão e continuidade do tratamento (FORLENZA, 2005). A espécie *Citrus limonum* (Rutaceae), conhecida popularmente como “Limoeiro” tem suas folhas e frutos aproveitados pela medicina popular para diversos fins terapêuticos, por apresentarem

propriedades adstringente, antioxidante, antianêmico, antibiótico, antisséptico, antiemético, antidepressivo, anti-inflamatório, antiespasmódico, bactericida, antirreumático e antidisentérico, usando os extratos e/ou compostos isolados dessa espécie. Muitas destas atividades podem ser relevantes para o tratamento da DA, justificando a seleção de *C. limonum* para essa possível aplicação terapêutica (CARVALHO; ALMEIDA; FREITAS, 2013). Em adição, estudos previamente realizados pelo nosso grupo de pesquisa, mostraram que o extrato metanólico de *C. limonum*, o qual apresenta indicação de uso popular para esquecimento na comunidade em estudo, apresentou resultados promissores em relação a atividade anticolinesterásica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas da espécie *Citrus limonum* coletadas foram identificadas e todo material foi submetido ao processo de secagem à temperatura ambiente e em seguida na estufa a 37°C durante 7 dias. As folhas secas foram trituradas em moinho de facas com padronização de partículas em 20 mesh, sendo pesados 10g do pó vegetal e adicionados 100 mL de solvente extrator, submetendo a amostra a três macerações (hexano, acetato de etila e metanol) gerando três extratos de *C. limonum* com polaridades diferentes, sendo esses avaliados através de cromatografia em camada delgada (CCD), segundo Wagner e Bladt (1995), procurando-se evidenciar os principais grupos de metabólitos secundários presentes.

O extrato metanólico foi submetido a um processo de pré-purificação em coluna filtrante com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e metanol). As frações obtidas foram submetidas a cromatografia em coluna (CC). A escolha dos sistemas eluentes foi feita a partir de testes realizados previamente pela cromatografia em camada delgada em placa de sílica (CCD).

A amostra foi submetida a cromatografia preparativa com gel de sílica, sendo submetida posteriormente a cromatografia gasosa com o uso de um cromatógrafo Agilent Technologies 7890A (Palo Alto, CA, USA) acoplado a detector seletivo de massas modelo 5975C, utilizou uma coluna capilar Agilent J&W HP-5MS (5%-fenyl)-metilpolisiloxano (30 m, diâmetro interno 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm). O hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,2 ml/min. 1 µl da amostra foi injetado em modo Split (20:1), a temperatura do injetor foi de 300 °C. A temperatura do forno foi inicialmente mantida a 70 °C (6 min), e chegou à temperatura final de 320 °C, a uma taxa de 5 °C/min, permanecendo por 2 min. O espectro de massas foi registrado a 70 eV e o intervalo de massas utilizado foi de 10 a 500 u.m.a.

A avaliação da atividade inibitória da AchE foi baseado no método de Ellman (1961) modificado por Rhee (2001) que utiliza uma leitora automática de microplacas 96 poços ThermoPlate (Mod. TP-Reader), absorvância a 412 nm. Neste teste nas 96 cavidades da placa, adicionaram-se 25 µL de ATCI 15 mM em água; 125 µL de DTNB ou reagente de Ellman 3 mM em Tampão C; 50 µL de Tampão B; 25 µL da amostra (10mg/mL) a ser analisada, dissolvida em MeOH, diluída 10 vezes em Tampão A; mediu-se a absorvância a cada um minuto por cinco vezes. Adicionou-se 25 µL da enzima AchE (0,22 U/mL) e mediu-se novamente a absorvância a cada um minuto por cinco vezes. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para as análises em microplaca os extratos a 10 mg/mL foram diluídos para 2 mg/mL, 1mg/mL e 0,5 mg/mL em Tampão A. Para o controle negativo (branco), utilizou-se metanol 10% em Tampão A. O padrão positivo, fisostigmina (eserina), foi utilizado nas seguintes concentrações: 0,100 mg/mL; 0,150 mg/mL; 0,300 mg/mL; 0,450 mg/mL; 0,675 mg/mL; 1,35 mg/mL em metanol.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial anticolinesterásico dos extratos hexano, acetato de etila e metanol, estão apresentados na tabela 1, através das análises estatísticas das porcentagens de inibição da AChE obtidas em cada extrato.

Tabela 1. Análise estatística das porcentagens de Inibição da AChE no tempo t=5 minutos dos extratos hexano, acetato de etila e metanol a 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL da espécie *C. limonum*.

Concentração	% de Inibição (Média ± DP)		
	0,5mg/mL	1mg/mL	2mg/mL
Solvente extrator			
Hexano	50.70±0.77 a	56.08±0.19 b	58.21±3.10 b
Acetato de etila	58.52±2.62 a	61.65±2.20 a	68.57±2.30 b
Metanol	65.40±1.67 a	66.38±1.18 a	68.06±1.44 a

Valor das linhas seguido pela mesma letra em negrito e minúsculo significa que não houve diferença significativa considerando  $\alpha=0,05$

Com base nesses resultados, o extrato metanólico seria o de melhor escolha para avaliação da presença de compostos com atuação anticolinesterásica, visto que apresentou melhor porcentagem de inibição da AchE, utilizando a menor concentração para minimizar possíveis efeitos tóxicos que as substâncias presentes no extrato possam vir a desempenhar.

O extrato metanólico foi avaliado através CCD usando revelador específico para cada classe de metabólitos secundários, sendo observados no UV à 254nm e 365nm. Para os compostos fenólicos usou-se o revelador NEU, indicando a presença de fenilpropanoglicosídeos e flavonoides, porém não foi possível observar a presença de derivados cinâmicos e taninos condensados; em relação as cumarinas, foi indicada presença sem o uso do revelador, no entanto ao usar KOH a 10%, não foi possível confirmar essa presença. O mesmo ocorreu para os alcalóides, sendo observado na CCD sem o revelador, porém com o uso do revelador Dragendorff, Meyer, Bertrand e Bouchardat não foi possível evidenciar a presença dos alcalóides. Além desses metabólitos secundários também foram analisados outros metabólitos como mono, sesqui e diterpenos com revelador vanilina sulfúrica (10 min a 110°C) onde não foi evidenciado a presença dos mesmos; com relação aos triterpenos e esteroides foram bem evidenciados com o uso de revelador Liebermann-Burchard (5-10 min a 110°C); já os derivados antracênicos foram melhor observados sem o uso de revelador, no UV 254nm, além do 365nm. As naftoquinonas e xantinas não se mostraram presentes na amostra.

O extrato metanólico foi submetido a uma pré-purificação em coluna filtrante com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano e metanol), não sendo possível mensurar a quantidade da fração hexânica; a fração diclorometano apresentou rendimento de 6% e a fração metanólica de 80%. Posteriormente, a fração de diclorometano (DCM) foi submetida à separação em cromatografia preparativa e a fração metanólica em coluna flash (acoplada a pressão), utilizando-se como eluentes proporções crescentes de mistura DCM/MeOH, iniciando em 9:1 e finalizando a coluna com Metanol P.A. Neste processo foram obtidas a princípio 203 frações, as quais foram cromatografadas individualmente por CCD e reagrupadas em 15 frações.

Na fração de diclorometano de *C. limonum* foi possível isolar um composto de coloração azul intensa através de cromatografia preparativa, que se apresentou na forma de cristais de cor amarela a olho nu e aparentemente puro ao ser observado em CCD. Ao ser submetido a análise através de CG-MS, apresentou apenas um pico, caracterizado como 2H-1-Benzopirran-2-ona,5,7-dimetoxi, corroborando com o estudo realizado por Carvalho e colaboradores no ano de 2013, utilizando o extrato acetato de etila das folhas da espécie *C.*

*limon* (L.) Burm. Os autores isolaram uma mistura de dois compostos cumarínicos, sendo um deles o 2H-1-Benzopiran-2-ona,5,7-dimetoxi e essa mistura apresentou resultado positivo frente à inibição qualitativa da enzima acetilcolinesterase. Os nossos dados corroboram com a hipótese de que a espécie *C. limonum* possui potencial anticolinesterásico, sendo esta produtora compostos cumarínicos, podendo ser futuramente estudada no intuito de desenvolver um medicamento adicional no tratamento da DA.

### CONCLUSÕES

Como conclusão o nosso estudo sugere que o extrato metanólico das folhas de *Citrus limonum* demonstrou ação anticolinesterásica, podendo ser utilizada, após estudos mais aprofundados, como um possível paliativo no tratamento de doenças neurodegenerativas que possuem a enzima acetilcolinesterase como fator modulador da mesma, como, por exemplo, na doença de Alzheimer, já sabido que a inibição dessa enzima proporciona aumento do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica, facilitando assim a transmissão sináptica entre os neurônios, melhorando a função cognitiva dos pacientes. Nesse estudo foi possível evidenciar a presença de um isolado cumarínico, indicado por outros estudos como possuidor de atividade anticolinesterásica.

### AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro oferecido para o desenvolvimento desta Iniciação Científica. A UFPE, a Prof. Dra. Elba Lucia C. de Amorim e ao doutorando Valérium Castro por terem me ajudado durante todo o período de elaboração e execução desse trabalho.

### REFERÊNCIAS

- Camps P, El-Achab R, Morral J, Torrero Dm, Badia A, Banos Je, Vivas Nm, Barril X, Orozco M, Luque FJ. 2000. New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *J MedChem* 43: 4657-4666.
- Carvalho, R.B.F.; Almeida, A.A.C.; Freitas, R.M. 2013. Composição química e atividade anticolinesterásica de uma fração ativa do extrato de folhas de *Citrus limon* (L.) Burm. *Quim. Nova* 36: 1375-1379.
- Forlenza, O. V. 2005. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Rev. Psiq. Clín.* 32: 137-148.
- Sereniki, A. & Vital, M.A.B.F. 2008. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *RevPsiquiatr* 30.
- Minett, T.S.C. & Bertolucci, P.H.F. 2000. Terapia Colinérgica na Doença de Alzheimer. *Rev. Neurociências* 8: 11-14.
- Wagner, H. & Bladt, S.1995. *Plant drug analysis*. 2ed. Berlim: Springer.