



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE FARMACOLÓGICA DE UM COMPLEXO
DE INCLUSÃO A PARTIR DE *Citrus sinensis* (L.) OSBECK DIRECIONADO
PARA DOENÇA DE ALZHEIMER**

KATRÍCIA MARIA FEITOSA CARDOSO

TERESINA – PIAUÍ
2015

KATRÍCIA MARIA FEITOSA CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE FARMACOLÓGICA DE UM COMPLEXO
DE INCLUSÃO A PARTIR DE *Citrus sinensis* (L.) OSBECK DIRECIONADO
PARA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa

Co-orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

TERESINA – PIAUÍ
2015

KATRÍCIA MARIA FEITOSA CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE FARMACOLÓGICA DE UM COMPLEXO
DE INCLUSÃO A PARTIR DE *Citrus sinensis* (L.) OSBECK DIRECIONADO
PARA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Presidente e Orientador (a): **Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa**

(Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí)

Examinador Externo: **Profa. Dr. Emmanoel Vilaça Costa**

(Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe)

Examinador Interno: **Prof Dr. Lívio Cesar Cunha Nunes**

(Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dra. Regina Ferraz Mendes

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dra. Lina Gomes Santos

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

LABORATÓRIOS E INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Laboratório de Análise de Combustíveis (LAPETRO) – UFPI

Responsável: Profa. Dra. Nilza Campos de Andrade

Campus Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

64.049-550 - Teresina - Piauí, Brasil.

Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX) – UFPI

Responsáveis: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Campus Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

64.049-550 - Teresina - Piauí, Brasil.

Laboratório de Produtos Naturais (LPN) – UFPI

Campus Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

64.049-550 - Teresina - Piauí, Brasil.

Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental (LPNNEX) – UFPI

Responsável: Prof. Dra. Chistiane Mendes Feitosa

Campus Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

64.049-550 - Teresina - Piauí, Brasil.

Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) – UFPI

Responsável: Edson Cavalcanti da Silva Filho

Campus Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

64.049-550 - Teresina - Piauí, Brasil.



Dedicatória

Dedico esta vitória:

A Deus e aos espíritos de luz, que seguraram minha mão e trouxeram-me até aqui.

Aos meus pais, pelo incentivo e sinceridade.

Ao meu amado esposo, por ser meu apoio, meu chão e meu impulso para continuar cada vez mais adiante.

Aos meus amigos que estiveram sempre a meu lado em todos os momentos.

À minha querida orientadora, que desde sempre depositou em mim confiança, que sempre me apoiou, aconselhou e deu ânimo para continuar.



Agradecimentos

“Só é verdadeiramente grande aquele que, considerando a vida como uma viagem que deve conduzi-lo a um objetivo, faz pouco caso das asperezas do caminho e não se deixa jamais desviar um instante do caminho reto”

Cap. XII, Ítem 11, Evangelho Segundo o Espiritismo

*Agradeço primeiramente a **Deus** e a todos os **espíritos bons** pela saúde, paz e força para superar as adversidades e escrever esta qualificação.*

Aos amigos espirituais por todo apoio, luz e amor a mim dedicados.

*Aos meus pais **Maria da Luz Feitosa da Silva Cardoso, Edimundo Félix Cardoso** e à minha irmã **Katrine Cardoso**, por conviverem ao meu lado, por ajudarem sempre, mesmo que às vezes de maneira silenciosa e pelo conforto que propiciaram a mim para que pudesse concluir este trabalho.*

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa**, pelo carinho, dedicação, paciência e tempo a mim dedicados. Agradeço também por estar sempre disponível e disposta a ajudar, não poderia ter continuado neste trabalho sem sua orientação. Ao coorientador **Rivelilson Mendes de Freitas** por sempre receber de maneira gentil. Ao Colaborador do projeto **Márcio dos Santos Rocha** que ajudou de maneira ímpar na execução e discussão do trabalho.*

*Aos avaliadores **Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó, Prof. Dr. Lívio Cesar Cunha Nunes, Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa** por gentilmente aceitarem o convite para participar desta defesa.*

*Aos Professores do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)**, que colaboraram em meu crescimento profissional e científico, tornando o mestrado mais claro e proveitoso..*

*Aos amigos e amigas pelo apoio e pelos momentos de felicidade que tornaram essa caminhada menos árdua e mais suave, que sempre me ouviram e dividiram comigo as aflições, dúvidas e alegrias, agradeço em especial, **Karen, Jéssica, Denise, Karol, Monnielle, Oskar (Sempre presente e especial), Ana Carolina, Luanne, Tamyres, Tatiana, Romara, Ingrid, Rayllane e Beatriz.***

*Ao meu amado esposo, **Cassio Herbert**, que sempre confiou em mim, mesmo quando pensei em desistir, que me segurou quando mais precisei e que divide comigo todos os momentos da minha vida, sejam eles alegres ou tristes. Agradeço a Deus por ter*

me dado a honra de ser amada por alguém tão especial e honesto. Agradeço também à sua família pelo carinho e gentileza de sempre.

*Aos colegas de turma, pelo incentivo e companheirismo **Jefferson, George, Kátia, Ana Cristina, Cristina, Iluska, Hellen, Jurandy, Allyson, Marcela, Angélica.***

*Aos colegas de laboratório do LAPNEX e do LPNNEX, **Lays, Angélica, Alisson, Guilherme, Johanssy, Ana Karine, Rusbene e Amanda** por estarem sempre presentes nesta jornada.*

*Aos funcionários do NTF, por deixarem o ambiente sempre agradável e propício à pesquisa, em especial aos Senhores **Francisco e Ari.***

*Ao **CNPq, FAPPEPI e CAPES**, pelo apoio financeiro, onde as pesquisas foram financiadas através de recursos conseguidos por aprovação de projeto e bolsas de estudo.*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	13
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	16
Referências	18
OBJETIVOS	20
CAPÍTULO I: Atividades farmacológicas relevantes para o Alzheimer de óleos essenciais de plantas do gênero <i>Citrus</i> e perspectivas de usos em complexos de inclusão	
Resumo	22
Abstract	23
1 Introdução	24
2 Considerações sobre a doença de Alzheimer	26
3 Complexos de Inclusão com Ciclodextrinas	28
4 Aplicações biológicas relevantes para substâncias que inibem a AChE	31
Atividade inseticida	31
Atividades antioxidante e antiinflamatória	32
Atividade anticolinesterásica dos <i>Citrus</i>	33
6 Conclusão	34
Referências	35
CAPÍTULO II: Elaboração de um complexo de inclusão a partir do óleo essencial das folhas de <i>Citrus sinensis</i> e a β-ciclodextrina	
Resumo	42
Abstract.....	43
1 Introdução.....	44
2 Materiais e Métodos	45

2.1 Extração do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i>	45
2.2 Identificação dos constituintes do óleo	46
2.3 Elaboração do complexo de inclusão com β -ciclodextrina e o óleo essencial.....	46
2.4 Caracterização do complexo de inclusão	47
2.4.1 Ultravioleta	48
2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	48
2.4.3 Espectrofotometria na região do infravermelho com transformada de Fourier e acessório de reflectância total atenuada.....	48
2.4.4 Difração de raios X.....	48
3 Resultados e discussão.....	49
3.1 Extração e cálculo do rendimento do óleo.....	49
3.2 Caracterização dos Constituintes.....	49
3.3 Caracterização do Complexo (CIOECS- β CD).....	51
3.3.1 Ultravioleta (UV).....	51
3.3.2 Análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	51
3.3.3 Análise por Infravermelho (FTIR-ATR).....	52
3.3.4 Difração de raios X (DRX).....	53
4 Conclusão	55
Referências.....	56

CAPÍTULO III: Análise toxicológica e anticolinesterásica de um complexo de inclusão entre o óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* (L) Osbeck e a β -ciclodextrina

Resumo	61
Abstract	62
1 Introdução	63
2 Materiais e métodos	64
2.1 Estudo da citotoxicidade em 3 linhagens de células tumorais (Método do mtt)	64
2.2 Avaliação da toxicidade em <i>Artemia salina</i>	65
2.3 Avaliação da atividade hemolítica	65
2.4 Teste qualitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase	66

2.5 Teste quantitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase	66
3 Resultados e discussão	67
3.1 Estudo da citotoxicidade em 3 linhagens de células tumorais (Método do mtt)	67
3.2 Avaliação da toxicidade em <i>Artemia salina</i>	68
3.3 Teste de hemólise	69
3.4 Teste qualitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase	70
3.5 Teste quantitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase	70
4 Conclusão	71
Referências	72

CAPÍTULO IV PEDIDO DE PATENTE: Preparação e caracterização de complexo de inclusão do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com β -ciclodextrina e suas aplicações em formulações farmacêuticas na terapia da Doença de Alzheimer

Reivindicações	76
Resumo	78
Justificativa	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCI	Iodeto de acetiltiocolina
ATR	Acessório para Reflectância Atenuada
BAMP	Banco Americano de Marcas e Patentes
BEP	Banco Europeu de Patentes
β -CD	β -ciclodextrina
°C	Graus Celsius
°C/min	Graus Celsius por minuto
CIOECS- β CD	Complexo de Inclusão entre o óleo essencial das folhas de <i>Citrus Sinensis</i> e β -ciclodextrina
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
DA	Doença de Alzheimer
DRX	Difratometria de Raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]
FT-IR	Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier
H	Hora
H ₂ O	Água
IK	Índice de Kovats
MF	Mistura Física
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
m/z	Massa molecular nominal
OE	Óleo essencial
OECS	Óleo Essencial das Folhas de <i>Citrus Sinensis</i>
Ppt	Precipitado
Ppm	Partes por Milhão
PBS	Tampão fosfato salino
UV	Espectrometria de Ultravioleta
UV/VIS	Espectrometria de Ultravioleta e no Visível
μ L	Micro litro
μ m	Micrômetro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Ilustração 1. Atividades biológicas relevantes para os <i>Citrus</i>	24
Ilustração 2. Esquema de demonstração da Hipótese Colinérgica	27
Ilustração 3. Estruturas Químicas das ciclodextrinas α , β e γ	29

CAPÍTULO II

Ilustração 1. Esquema da extração do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i>	46
Ilustração 2. Esquemática da elaboração do complexo de inclusão	47
Ilustração 3a. Cromatograma do óleo com tempo de retenção	50
Ilustração 3b. Espectro de massa do limoneno	50
Ilustração 4. Análise Ultravioleta do CIOECS- β CD	51
Ilustração 5. Calorimetria Exploratória Diferencial do CIOECS- β CD (6:94, 12:88)	52
Ilustração 6. Espectrometria na Região do Infravermelho com acessório de reflectância atenuada nas proporções 6:94, 9:91, 12:88, β CD, MF e OECS	53
Ilustração 7. Difrátograma das proporções 6:94, 9:91, 12:88, β CD e MF	54

CAPÍTULO III

Ilustração 1. Índice de mortalidade da avaliação da toxicidade em <i>Artemia salina</i> .	69
Ilustração 2. Atividade hemolítica do complexo de inclusão	69
Ilustração 3. Placa de CCD/Ensaio de CCD/AChE; Círculo verde: CIOECS- β CD/ Círculo Azul: Padrão Caféina	70
Ilustração 4. Análise de Probitos da CI_{50} do complexo de inclusão	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1. Percentual de inibição em concentração única do crescimento celular das amostras.	68
Tabela 2. Avaliação da toxicidade em <i>Artemia salina</i> .	68

RESUMO

CARDOSO, K. M. F. Desenvolvimento e análise farmacológica de um complexo de inclusão a partir de *Citrus sinensis* (L) Osbeck direcionado para Doença de Alzheimer. Orientadora: Chistiane Mendes Feitosa. Teresina-PI: UFPI, 2014. (Defesa – Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

Com o crescente número de idosos na população mundial, há necessidade de novos medicamentos para tratar doenças que causam distúrbios de cognição, como por exemplo a doença de Alzheimer (DA). O tratamento mais promissor para a DA consiste em aumentar o nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). Este trabalho teve como objetivos analisar um complexo de inclusão elaborado entre o óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* (laranjeira) e β -ciclodextrina (CIOECS- β CD). Posteriormente avaliou-se o efeito inibitório do CIOECS- β CD sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) No primeiro capítulo, foi realizada uma prospecção discutindo as atividades farmacológicas das plantas do gênero *Citrus* e complexos de inclusão com ciclodextrina. O segundo capítulo trata da elaboração e caracterização da amostra, o óleo usado para este estudo foi extraído por hidrodestilação utilizando extrator tipo Clevenger e analisado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, no qual apresentou os seguintes constituintes químicos: β -felandreno (11,76 %), β -careno (11,76 %), limoneno (15,89 %), β -ocimeno (5,41 %), α -linalol (7,43 %), (R)-(+)-citronelal (4,32 %), p-ment-1-en-4-ol (3,96 %), 2-octen-1-ol-3,7-dimetil (4,06 %), neral (3,27 %), geranial (1,35 %) e citral (3,81 %). O complexo foi elaborado a partir do método de co-precipitação e caracterizado utilizando as técnicas espectroscópicas: ultravioleta, calorimetria exploratória diferencial, espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier e difratometria de raios X. Os resultados sugerem que houve a formação do complexo, o termograma demonstrou que houve um deslocamento do pico endotérmico máximo da ciclodextrina em 118, 2 °C, indicando uma possível complexação. A análise de Infravermelho teve como deslocamento expressivo o da banda da β -ciclodextrina, possivelmente devido à formação do complexo, já que o óleo essencial ocupa a cavidade e a banda não aparece no complexo. Na análise por difração de Raios X foi obtido um difratograma com características de um material amorfo, sem picos definidos que pode ser um indicativo da ocorrência de complexação. O terceiro capítulo trata das análises toxicológicas (Testes do MTT, Toxicidade em *Artemia salina* e Teste de hemólise) e anticolinesterásica (Testes qualitativo e quantitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase) do complexo, onde nas análises toxicológicas o complexo não apresentou sinais de toxicidade e nos teste de acetilcolinesterase obteve resultados positivos na inibição da enzima. No quarto capítulo consta o pedido de depósito de patente do complexo, para que possa proteger a produção deste e de futuras formulações farmacêuticas sólidas a partir do complexo de inclusão para o tratamento de pacientes com Alzheimer.

Palavras-chave: *Citrus sinenses*, Acetilcolinesterase, β -ciclodextrina, Complexo de inclusão.

ABSTRACT

CARDOSO, K. M. F. Development of a solid pharmaceutical composition of essential oil from the leaves of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck directed to Alzheimer's diseases. Advisor: Chistiane Mendes Feitosa. Teresina-PI.: UFPI, 2014 (Qualification – Master's in Pharmaceutical Sciences)

With the increasing number of elderly in the world population, there is need for new drugs to treat diseases that cause disorders of cognition, for example Alzheimer's disease (AD). The most promising treatment for AD is to increase the level of acetylcholine in the brain using inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). This work aims to prepare and characterize an inclusion complex between the essential oil (EO) from leaves of *Citrus sinensis* (laranjeira) and β -cyclodextrin (β CD-CIOECS). Further evaluate its inhibitory effect on the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE., targeting future treatment of Alzheimer's patients. In the first chapter, we created a survey touting the pharmacological activities of plants of the genus Citrus and inclusion complexes with cyclodextrin. The second chapter covers the preparation and characterization of the inclusion complex one, the EO used for this study were extracted by hydrodistillation using Clevenger type extractor and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The EO *C. sinensis* showed the chemical constituents: β -phellandrene (20.26%), 3-carene (11.76%), limonene (15.86%), α -linalool (7.43%) (R) - (+)-citronellal (4.32%) , β -ocimene (5.41%), neral (3.27%), geraniol (1.35%) and citral (3.81%). The complex was prepared from co-precipitation method and characterized using spectroscopic techniques: UV, differential scanning calorimetry, spectrophotometry transform infrared spectroscopy and X ray diffraction results suggest that the move was the formation of the complex the thermogram showed that there was a displacement of the maximum endothermic peak of the cyclodextrin 118, 2 °C, indicating a possible complexation. Infrared analysis was as significant displacement of the band of β -cyclodextrin, possibly due to complex formation, since the essential oil occupying the cavity and the band does not appear in the complex. The analysis by X-ray diffraction XRD was reached with characteristics of an amorphous material with no defined peaks that can be indicative of the occurrence of complexation. The third chapter is in the patent application of the complex and technological prospecting performed to search for identical or similar to the proposed product, so you can give the basis for the production of a natural medicine from the inclusion complex for the treatment of Alzheimer's patients.

Keywords: *Citrus sinenses*, Acetylcholinesterase, β -cyclodextrin, Inclusion complex.

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é a terceira causa de morte nos países desenvolvidos, perdendo apenas para doenças cardiovasculares e o câncer, já nos países subdesenvolvidos representa 70% do conjunto das doenças que afetam a população geriátrica, sendo que este número tende a crescer com o aumento da expectativa de vida (FEITOSA et al., 2011). A DA está relacionada ao déficit cognitivo e a retenção de memória, devido a disfunções da neurotransmissão colinérgica, um tratamento eficaz da doença baseia-se no aumento dos níveis de acetilcolina a partir da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (SÁ et al., 2012).

A rivastigmina (Exelon®), um dos medicamentos mais utilizados no tratamento da DA, é capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE) apresentando, assim, maior eficácia quanto ao aumento dos níveis cerebrais de acetilcolina. Entretanto, esse medicamento apresenta efeitos gastrointestinais adversos, associados ao aumento de peso dos pacientes (GROSSBERG, 2003). A tacrina (Cognex®) foi o primeiro inibidor reversível da AChE utilizado no tratamento da DA, entretanto, este medicamento apresentou sinais de toxicidade no fígado, hepatotoxicidade, levando ao aumento das transaminases hepáticas, resultando em hepatite medicamentosa e provocando a retirada da medicação em muitos pacientes (SHAO et al., 2004). Nesta perspectiva o complexo surge como uma nova proposta no tratamento do Alzheimer, e estudos posteriores trarão dados de sua toxicidade.

Elaborar complexos de inclusão entre óleos essenciais e β -ciclodextrina é um método bastante efetivo para proteção do complexante contra a oxidação, degradação térmica e evaporação (BHANDARI et al., 1998). A formação destes complexos é de suma importância, pois, o processo de inclusão modula as propriedades físico-químicas tanto do complexante quanto do complexado, propriedades estas que envolvem aumento da solubilidade, melhora da estabilidade química, biodisponibilidade, toxicidade reduzida dentre outras (Li et al., 2012). O agente complexante, β -ciclodextrina (β -CD), faz parte da classe das ciclodextrinas, é formada por sete unidades de D-(+)-glicopiranoose unidas por ligações α -1,4 (FRACETO et al., 2007), possui em sua estrutura grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior, assim seu exterior é hidrofílico e sua cavidade interna é hidrofóbica. A presença desta cavidade permite que as ciclodextrinas complexem outras moléculas, de dimensões compatíveis, alterem suas propriedades

físico-químicas, tais como, solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade (FRACETO et al., 2007).

Óleos essenciais (OES) são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Os OES podem ser obtidos por diversas técnicas, a saber: arraste por vapor d'água, extração por CO₂ supercrítico, hidrodestilação, dentre outras. Os OES são bastante utilizados na indústria farmacêutica ou cosmética e possuem várias atividades comprovadas: antibacteriano, antisséptico, antiinflamatório, dentre outras (SIMÕES et al., 2000). Os OES podem ser encontrados em muitas plantas aromáticas, e também nas plantas cítricas.

O óleo essencial (OE) da espécie *Citrus sinensis*, conhecida popularmente como laranja, apresentou em estudos atividade sedativa / hipnótica, contrastando com o extrato etanólico das folhas, que não apresentou esta atividade (CARVALHO et al., 2002). Os frutos se mostraram, *in vitro*, potentes inibidores da atividade do rotavírus, que causa diarreias (HYUN et al., 2000). A laranja é amplamente divulgada como digestiva, expectorante, diurética e hipotensora na medicina tradicional, embora sua eficácia não tenha sido comprovada cientificamente. Ao chá das folhas atribui-se propriedades sudorífera, antigripal, carminativa, calmante e antiespasmódica. O chá da casca e dos frutos é indicado contra má digestão (LORENZI et al., 2002; MATOS et al., 1999).

Um estudo preliminar com o OE de outra espécime de *Citrus sinensis*, voltado para memória de ratos sugeriu que o óleo inibe consideravelmente a enzima acetilcolinesterase melhorando a memória (SÁ et al., 2012), dando assim base para o desenvolvimento do complexo de inclusão.

O presente estudo teve como principal objetivo analisar um complexo de inclusão elaborado entre o óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* e β -ciclodextrina (CIOECS- β CD). Complementando este estudo, testes de toxicidade e de atividade anticolinesterásica *in vitro* foram realizados com o CIOECS- β CD.

REFERÊNCIAS

BHANDARI, B. R.; D'ARCY, B. R.; BICH, L. L. T. Lemon Oil to β -Cyclodextrin Ratio Effect on the Inclusion Efficiency of β -Cyclodextrin and the Retention of Oil Volatiles in the Complex. **Food Chemistry**, n. 46, p. 1494-1499, 1998.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R., COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1629-1633, 2002.

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. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 108-110, 2011.

FRACETO, L. F.; GONÇALVES, M. M.; MORAIS, C. M.; ARAÚJO, D. R.; ZANELLA, L.; PAULA, E.; PERTINHEZ, T. A. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. **Química Nova**, n. 30, p. 1203-1207, 2007.

GROSSBERG, G. T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. **Current Therapeutic Research**, v. 4, n. 64, p. 216-35, 2003.

HYUN, K. D.; JEONG, S. M.; AH, B. E.; JOO, H. M. Inhibitory effect of herbal medicines on rotavirus infectivity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 356-358, 2000.

LI, N.; HAN, L.; CHAO, J. Preparation and characterization of the inclusion complex of baicalein with γ -cyclodextrin: an antioxidant ability study. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, n. 73, p. 247-254, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; BARBOSA, J. M.; CUNHA, E. V. L.; HIRUMA, C. A. Essential oil of *Mentha x villosa*

Huds. from Northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 41-44, 1999.

SÁ, C. G.; CARDOSO, K. M. F.; FREITAS, R. M.; FEITOSA, C. M. Efeito do tratamento agudo do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck na aquisição da memória espacial de ratos avaliada no labirinto aquático de Morris. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 2, n. 33, p. 211-215, 2012.

SHAO, D.; ZOU, C.; LUO, C.; TAN, X.; LI, Y. Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, n. 14, p. 4639-42, 2004.

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

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- ✚ Analisar um complexo de inclusão elaborado entre o óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* com a β -ciclodextrina (CIOECS- β CD), visando a formulação futura de um fitomedicamento para o tratamento da doença de Alzheimer.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✚ Realizar uma revisão sobre as atividade farmacológicas de plantas do gênero *Citrus* e complexos de inclusão envolvendo óleos essenciais;
- ✚ Preparar um complexo de inclusão a partir do método de co-precipitação entre o óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* e β -ciclodextrina;
- ✚ Caracterizar o CIOECS- β CD, a partir de métodos espectroscópicos: Calorimetria exploratória diferencial, Ultravioleta, Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e Difratomia de Raios X;
- ✚ Avaliar a toxicidade do complexo formado a partir dos teste do MTT, Toxicidade em *Artemia salina* e Hemólise;
- ✚ Analisar a inibição qualitativa e quantitativa da enzima acetilcolinesterase pelo complexo de inclusão;
- ✚ Submeter um pedido de registro de depósito de patente para proteção da produção do complexo de inclusão.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA : Atividades farmacológicas relevantes para o Alzheimer de óleos essenciais de plantas do gênero *Citrus* e perspectivas de usos em complexos de inclusão.

**Katrícia Maria Feitosa Cardoso, Ciro Gonçalves e Sá, Rivelilson Mendes Freitas,
Chistiane Mendes Feitosa**

Atividades farmacológicas relevantes para o Alzheimer de óleos essenciais de plantas do gênero *Citrus* e perspectivas de usos em complexos de inclusão.

RESUMO

As plantas do gênero *Citrus*, além de sua importância na área alimentícia, também são conhecidas por apresentarem relevantes atividades biológicas. Os óleos essenciais (OE) destas espécies são compostos por uma grande variedade de substâncias tais como terpenos. Esta revisão reuniu informações sobre a constituição e ações biológicas exercidas por OE extraídos de variadas partes de espécies do gênero *Citrus*. O *d*-limoneno é o composto que está presente na maioria das espécies de *Citrus*, exercendo tanto ações inseticidas quanto inibidora da enzima acetilcolinesterase. Os flavonóides também estão presentes e relatados como responsáveis pela capacidade seqüestrante de radicais livres. Aos flavonóides dos *Citrus* atribuem-se também papéis importantes na inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórios, comprovando sua capacidade antiinflamatória. Diante da pluralidade de atividades do gênero *Citrus* realizamos um levantamento sobre atividades farmacológicas e a perspectiva de elaboração de complexos de inclusão com ciclodextrinas com os OE ou compostos isolados destas espécies. As ciclodextrinas utilizadas para a formulação de complexos de inclusão constituem uma nova classe de excipientes farmacêuticos com capacidade para formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares como por exemplo os OE o que torna o gênero *Citrus* como uma promissora fonte de princípios ativos para elaborações de futuras formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: *Citrus*, Óleos essenciais, Antioxidantes, Acetilcolinesterase, β -ciclodextrina

ABSTRACT

The plants of the genus *Citrus*, and their importance in the food industry, are also known to have significant biological activities. The essential oils (EO) these species are composed of a variety of substances such as terpenes. This review gathered information about the formation and biological actions exerted by essential oils extracted from various species of genus *Citrus*. The *d*-limonene is the compound that is present in most species of *Citrus*, acting both as insecticides inhibitory action of acetylcholinesterase enzyme. Flavonoids are also present and are responsible for sequestering ability of free radicals. At the *Citrus* flavonoids also attribute it important in inhibiting the synthesis of proinflammatory mediators roles, proving anti-inflammatory capacity. Given the plurality of activities of the genus *Citrus* conducted a survey of pharmacological activities and the prospect of preparing inclusion complexes with cyclodextrins with essential oils or compounds isolated from these species. Cyclodextrins used for the formulation of inclusion complexes represent a novel class of pharmaceutical excipients having the ability to form inclusion complexes with reversible apolar molecules such as essential oils which makes the genus *Citrus* as a promising source of active compounds for elaborations future pharmaceutical formulations.

Keywords: *Citrus*, Essential Oils, Antioxidants, Acetylcholinesterase, β -cyclodextrin

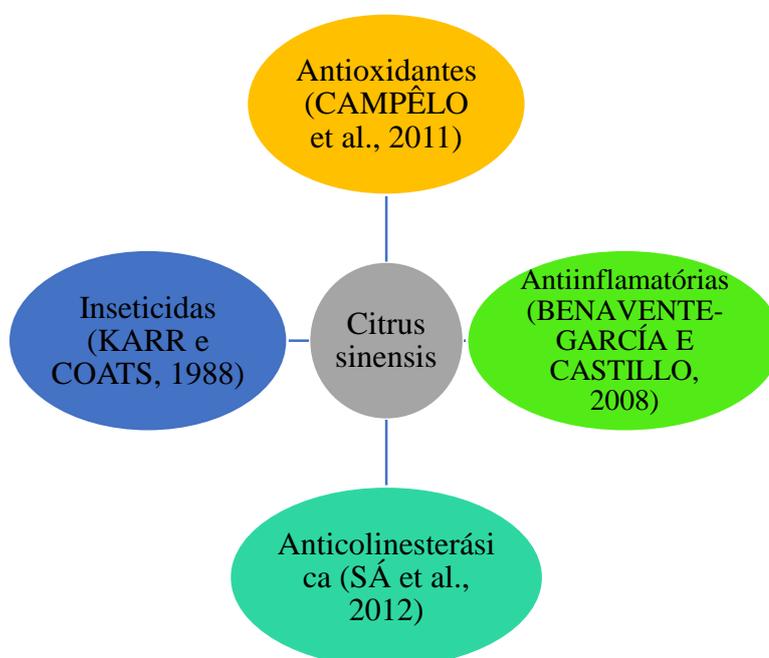
1 INTRODUÇÃO

Plantas do gênero *Citrus* constituem uma excelente fonte de muitos nutrientes e fitoconstituintes e são capazes de fornecer uma dieta saudável, nos sucos de Citrinos os ácidos fenólicos e as flavanonas são os principais grupos de compostos fenólicos, esses sucos geralmente são uma rica fonte de compostos antioxidantes, dentre eles fenóis, flavonóides e ácido ascórbico (ABIRAMI et al., 2014)

Os óleos essenciais, são importantes ingredientes aromatizantes nos produtos alimentares e bebidas, são misturas complexas de compostos químicos e classificam-se em três grupos principais: monoterpenos, sesquiterpenos e oxigenados. Pigmentos naturais (principalmente carotenóides e clorofilas) também estão presentes nos óleos essenciais das plantas do gênero *Citrus*. O componente majoritário de 80% dos óleos dos Citrinos é o d-limoneno (MUÑOZ-LÓPEZ et al., 2014)

Os óleos essenciais dos *Citrus* também são conhecidos por apresentarem importantes atividades biológicas (Ilustração 1):

Ilustração 1. Atividades biológicas relevantes para os *Citrus* que inibem a enzima acetilcolinesterase



Na tradicional medicina chinesa as cascas secas de *Citrus reticulata* tem sido amplamente usadas por séculos como um remédio para tratar indigestão e no combate às

síndromes inflamatórias do trato respiratório como asma e bronquite (HO e 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 e COSTA, 2002).

Citrus limon Osbeck 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 e JORGE, 2009), demonstrando ser uma espécie 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 *Citrus limon*, também exerça atividade no sistema nervoso central, o que é reforçada pelo uso popular em situações de ansiedade e depressão (VENDRUSCOLO et al., 2005).

Outros achados sugerem que o suco fresco de *Citrus Hystris* e *Citrus maxima* apresentam as seguintes atividades: antioxidante *in vitro* na redução de radicais tais como DPPH•, ABTS• e OH•, capacidade de eliminação de radicais, inibição da peroxidação e antihemolítica. Inibindo ainda consideravelmente as enzimas tirosinase, acetilcolinesterase e β -glucuronidase (ABIRAMI et al., 2014)

Diante da pluraridade de atividades de plantas do gênero *Citrus* realizamos um levantamento sobre atividades farmacológicas e a perspectiva de elaboração de complexos de inclusão com ciclodextrinas (CDs) e óleos essenciais ou compostos isolados destas espécies, onde estas constituem uma nova classe de excipientes farmacêuticos com capacidade para formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares.

A habilidade das CDs em encapsular fármacos tem conseguido melhoras na biodisponibilidade, estabilidade e segurança de inúmeras fórmulas farmacêuticas atualmente comercializadas. A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidrofílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas (CUNHA-FILHO et al., 2007). Mais de 30 medicamentos comercializados no mercado mundial contam com a presença deste excipiente em suas fórmulas (DAVIS e BREWSTER, 2004; LOFTSSON e DUCHENE, 2007).

O presente artigo registra informações sobre atividades relevantes para o Tratamento do Alzheimer dos compostos biologicamente ativos presentes em espécies do gênero *Citrus*, atividades estas que incluem ações inseticida, antioxidante, antiinflamatória, anticolinesterásica, assim como perspectivas de usos de complexos de inclusão para possível tratamento da doença.

2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A DOENÇA DE ALZHEIMER

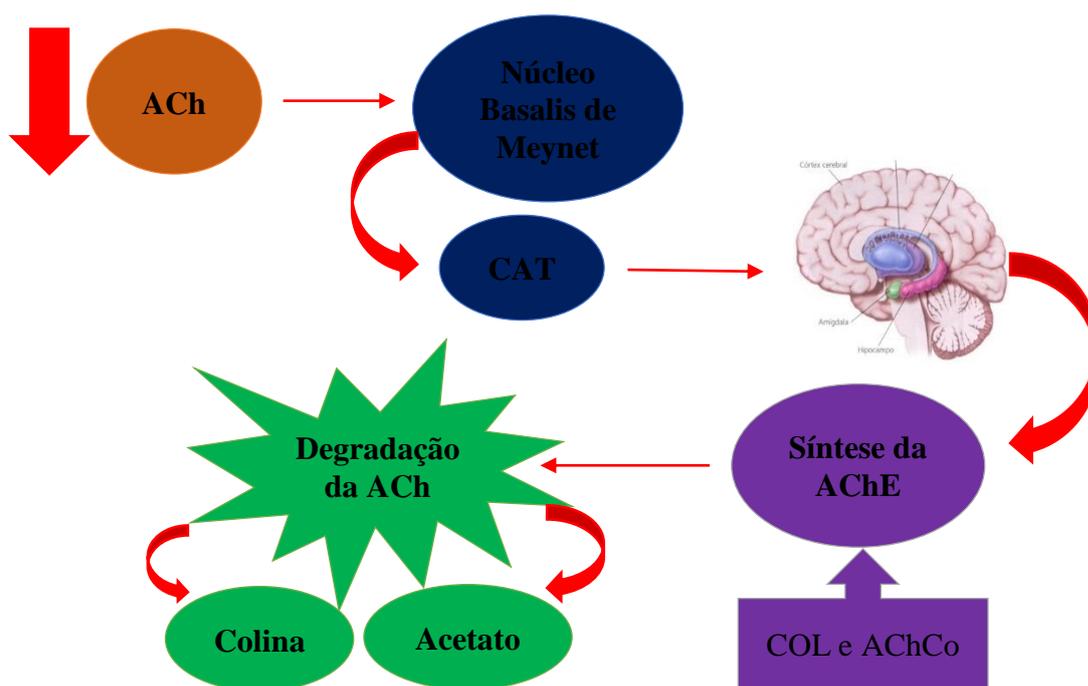
A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada patologicamente pela deposição da proteína β -amilóide na placa senil no cérebro humano, formando placas amilóides nos neurônios, que consiste de um núcleo central circundada por neurites distróficas, microglia e astrócitos reativos. O constituinte majoritário do núcleo da placa é o peptídeo amilóide β -A4, contendo 3943 aminoácidos (CAMILLERI, 1994). A inibição da formação destas placas tóxicas surge como uma abordagem para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para a DA (QIN, 2002).

A DA é a terceira causa de morte nos países desenvolvidos, perdendo apenas para doenças cardiovasculares e o câncer, já nos países subdesenvolvidos representa 70% do conjunto das doenças que afetam a população geriátrica, sendo que este número tende a crescer com o aumento da expectativa de vida (FEITOSA et al., 2011). Está relacionada ao déficit cognitivo e a retenção de memória, devido a disfunções da neurotransmissão colinérgica, um outro tratamento eficaz para a doença baseia-se no aumento dos níveis de acetilcolina a partir da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), ou seja a hipótese colinérgica. Nesta hipótese a deficiência de acetilcolina ocorre devido a uma atrofia do núcleo basalis de Meynert que é fonte da enzima colina transferase, esta por sua vez é transportada para áreas cerebrais tais como, hipocampo, córtex cerebral e amígdala, onde catalisa a reação de síntese da acetilcolina a partir da colina e da acetilcoenzima, por fim a acetilcolina restante é degradada pela acetilcolinesterase na fenda sináptica em colina e acetato (Ilustração 2) (SÁ et al., 2012; MINETT e BERTOLUCCI, 2000). Entender a hipótese colinérgica é importante para entender o desencadear da doença e sugerir possíveis tratamentos.

Inibidores da AChE tais como: tacrina e fisostigmina, possuem potencial inibição desta enzima, no entanto possuem como efeito colateral a hepatotoxicidade, essa característica faz com que essas substâncias não sejam adequadas para o tratamento da

doença, já que o Alzheimer possui como sintoma os distúrbios no fígado, que podem ser causados pela aglomeração de proteínas (FEITOSA et al., 2011; LAWLESS et al., 2008). Outro medicamento utilizado é a rivastigmina (Exelon®) que encontra-se disponível em mais de 50 países. O Exelon® possui eficácia semelhante à do donepezil e da tacrina, porém apresenta como vantagem o fato de não ser hepatotóxica e seus efeitos colaterais são dose-dependentes (MINETT e BERTOLUCCI, 2000). A tacrina (Cognex®) foi a primeira droga aprovada para o tratamento do Alzheimer, pelo FDA no ano de 1993 (MINETT & BERTOLUCCI, 2000). Entretanto, o Cognex® apresentou sinais de toxicidade no fígado, levando ao aumento das transaminases hepáticas, resultando em hepatite medicamentosa e provocando a retirada da medicação em muitos pacientes (SHAO et al., 2004).

Ilustração 2. Esquema de demonstração da hipótese colinérgica (MINETT & BEROLUCCI, 2000)



Legenda: ACh: acetilcolina; AChE: acetilcolinesterase; CAT: enzima colina transferase; COL: Colina; AChCO: acetilcoenzima

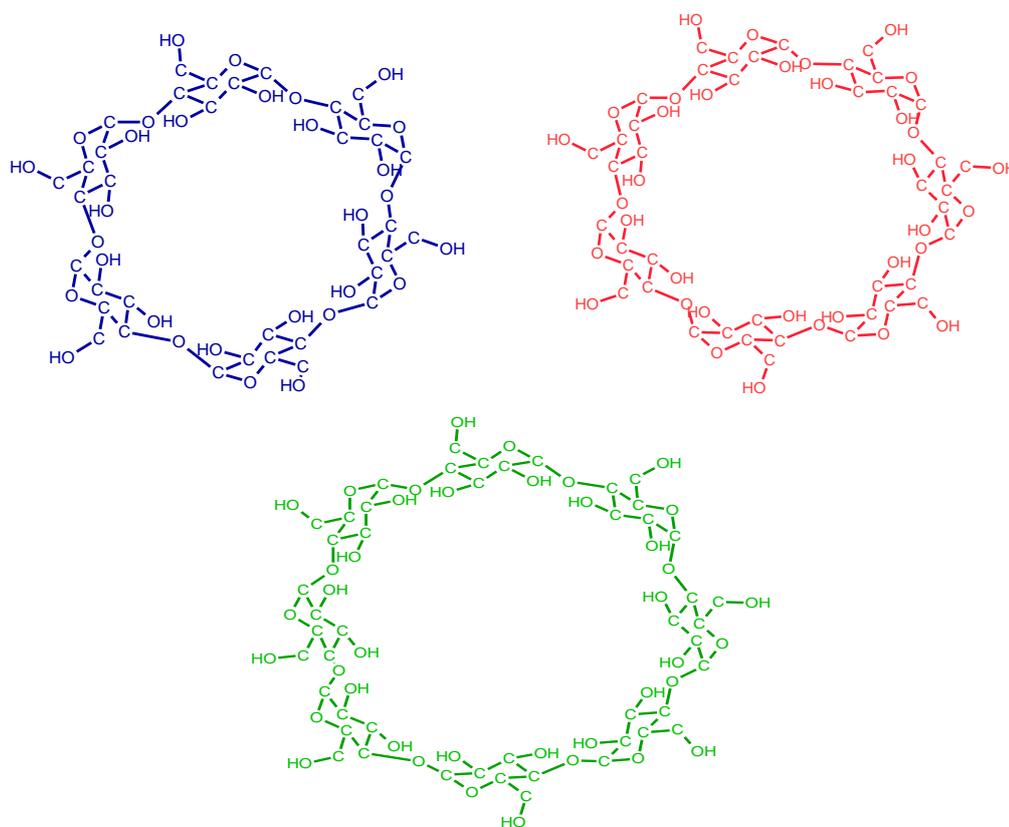
3 COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos que possuem superfície externa hidrofílica e uma cavidade hidrofóbica (MURA, 2014). A presença desta cavidade permite que as CDs complexem outras moléculas, de dimensões compatíveis, onde, o processo de inclusão modula as propriedades físico-químicas tanto do complexante quanto do complexo, propriedades estas que envolvem aumento da solubilidade, melhora da estabilidade química, biodisponibilidade, toxicidade reduzida, dentre outras (Li, 2012).

A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas (CUNHA-FILHO et al., 2007). Elaborar complexos de inclusão entre óleos essenciais e β -ciclodextrina é um método bastante efetivo para proteção do complexante contra a oxidação, degradação térmica e evaporação (BHANDARI, 1998).

Ciclodextrinas são formadas por unidades de D-(+)-glicopiranoose unidas por ligações α -1,4, unidas por subunidades de d-glucopiranoose, as formas mais comuns são α , β e γ -ciclodextrinas (Ilustração 3), compostas respectivamente por 6, 7 e 8 moléculas de d-glucose, como mostra a figura 2 (FRACETO et al., 2007; LI et al., 2014). Dentre estas a β -CD é a mais utilizada, pois possui a capacidade de se complexar com moléculas de massa molecular entre 100 e 400 g/mol, faixa de massa molecular da maioria das moléculas de interesse, além disso, possui baixo preço em relação as outras ciclodextrinas (AGUIAR et al., 2013). Há também ciclodextrinas com até 19 unidades de glicopiranoose, no entanto devido ao alto custo e baixo rendimento, sua produção é bastante limitada, além do que sua capacidade de complexação é reduzida (MURA, 2014).

Ilustração 3. Estruturas químicas das ciclodextrinas α , β e γ



As CDs são obtidas a partir da degradação do amido pela enzima ciclodextrina-glucosil-transferase (CGTase), que é uma enzima microbiana capaz de converter o amido em ciclodextrinas por reações de ciclização, acoplamento e desproporcionamento (BENDER, 1986; TONKOVA, 1998).

Os complexos de inclusão possuem aplicabilidade em vários ramos. Na indústria farmacêutica são utilizados principalmente para aumentar a solubilidade em água, a velocidade de dissolução de drogas com baixa solubilidade, a biodisponibilidade e a estabilidade de fármacos (MURA, 2014). Na indústria alimentícia os complexos de inclusão podem ser utilizados como aditivos para proteger constituintes lipofílicos presentes nos alimentos, agindo com estabilizante de sabores (LI, 2014).

As CDs podem ter relação direta no tratamento da DA, onde estudos sugerem que a β -ciclodextrina é capaz de interagir com peptídeo β amiloide e esta interação provoca uma considerável redução dos efeitos neurotóxicos do peptídeo, colaborando para o tratamento da Doença (CAMILLERI, 1994).

Os achados desta pesquisa revelaram que há poucos artigos que relatam a complexação de óleos essenciais de espécies do gênero *Citrus* e ciclodextrinas. Bhandari

e colaboradores (1998) elaboraram um complexo com óleo de *Citrus limon* (limão)-ciclodextrina com o objetivo de determinar o efeito da proporção, do complexo entre óleo de limão e a β -ciclodextrina, sobre o rendimento para a encapsulação de materiais voláteis. O complexo *Citrus limon*-ciclodextrina foi bem caracterizado e comprovou-se a complexação. A microencapsulação de compostos voláteis com ciclodextrinas é um dos mais efetivos métodos para proteger os compostos voláteis contra oxidação, degradação por calor e evaporação.

Estudos recentes mostram que os terpenos podem ter suas atividades potencializadas através de complexos com ciclodextrinas tornando-os uma promissora fonte para possíveis formulações farmacêuticas, um exemplo desta estratégia foram os estudos realizados por Quintans-Junior e colaboradores (2013) que foi possível comprovar que o complexo de inclusão entre a β -ciclodextrina e o *p*-cimeno, terpeno bastante presente em óleos essenciais de plantas e na maioria dos *Citrus*, teve as ações analgésica e anti-inflamatória potencializadas em relação ao *p*-cimeno isolado.

Em experimentos realizados por Qin et al. (2010) foi elaborado um complexo de inclusão com o peptídeo β -amiloide (AB) e a ciclodextrina, que fora analisado através de análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Dicroísmo Celular (DC). Esses estudos apontam uma importante região de formação de placas fibrilares amilóides, e revelaram que a inibição de formação desse polímero constitui uma nova abordagem para desenvolvimento de agentes terapêuticos para a DA, visto que a polimerização do peptídeo β -amiloide (12-28) é uma das maiores características na patologia do Mal de Alzheimer. Nesta perspectiva esta inibição após otimização das propriedades farmacológicas desse complexo e potencial terapêutico, poderá ser usado no controle de progressão da doença, no entanto outros estudos também sugerem esta hipótese da ciclodextrina no tratamento do Alzheimer.

Outros estudos sugerem que o peptídeo β -amilóide é neurotóxico nos neurônios envelhecidos de ratos, esse processo de agregação se dá principalmente pela interação do peptídeo com os resíduos hidrofóbicos, assim a redução na interação dos resíduos pode ser uma forma de controle da progressão da doença de Alzheimer. Os peptídeos que contêm ácidos aromáticos, em especial triptofano e fenilalanina, interagem com a β -ciclodextrina, o resultado desta interação resulta numa diminuição dos efeitos neurotóxicos do peptídeo (CAMILLERI et al., 1994).

Portanto, estes achados são importantes para demonstrar que a ciclodextrina isolada já possui atividade contra o Alzheimer, então ela complexada pode vir a

potencializar desta atividade, já que as ciclodextrinas constituem uma importante classe de excipientes farmacêuticos, como mostra o item a seguir.

4 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS RELEVANTES PARA SUBSTÂNCIAS QUE INIBEM A AChE

ATIVIDADE INSETICIDA

A atividade inseticida está diretamente relacionada com a doença de Alzheimer (DA), alguns compostos com atividade inibitória da AChE são utilizados terapêuticamente para tratar miastenia grave e glaucoma. Esses compostos são extensivamente utilizados como inseticidas e já foram usados, inclusive, como armas químicas em guerras (FOYE et al., 1995). Outros estudos demonstrados por Finkelstein e colaboradores (2002) revelaram importantes achados com cianoguanidinas inseticidas sintetizadas e inibidoras da AChE, surgindo nesta pesquisa uma nova classe de inibidores reversíveis da AChE.

As propriedades inseticidas têm sido reconhecidas nos óleos essenciais de muitas espécies do gênero *Citrus* e recentemente, vários produtos contendo (+)-limoneno, linalol, ou extrato bruto vem ganhando espaço no mercado. Essas substâncias podem ser tóxicas via penetração pela cutícula, pelo sistema respiratório e/ou pelo trato digestório (IBRAHIM et al., 2001).

Levantamento bibliográfico demonstrou que a 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* (KARR e COATS, 1988).

A atividade inseticida por meio da pulverização de extratos voláteis das cascas de duas espécies de laranja – *Citrus sinensis* e *Citrus aurantifolia*, 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. O extrato hexânico das folhas de *C. Cinensis* demonstrou bons resultados

no combate a larva do mosquito *Aedes Aegypti* L. (WARIKOO et al., 2012). Os extratos voláteis de *C. sinensis* 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 (EZEONU et al., 2000).

O óleo extraído de *Citrus limon* (limão) apresentou atividade sobre as larvas do inseto *Culex pipiens* onde foi observada relação positiva entre o tempo de exposição e a porcentagem de mortalidade das larvas desse inseto (ZAYED et al., 2009).

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

ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIA DE ESPÉCIES DE CITRUS

Vários estudos têm demonstrado que o uso de compostos antiinflamatórios diminui a progressão da DA e a degeneração neuronal, ou reduz o risco do seu desenvolvimento desta doença (HOUGHTON et al., 2003). Estudos em animais têm mostrado que o acúmulo de radicais livres está relacionado com déficits de memória, cognição e aprendizado, durante o processo de envelhecimento, esses sinais assemelham-se àqueles observados na DA.

Pesquisas demonstram que o tratamento à base de antioxidantes -- como tocoferol, β -caroteno e ácido ascórbico -- corrige problemas relativos à memória, ao aprendizado e à cognição, provocados por envelhecimento ou moléstias (SOCCI et al., 1995; PEERING et al., 1997). A peroxidação lipídica contribui para a progressão da doença e o uso de antioxidantes, que impedem essa peroxidação, pode ser uma terapia alternativa para o tratamento da doença (MONTINE et al., 2002). Dentre os Citrus com atividade antioxidante, destaca-se *Citrus Sinensis*, com inibição dos radicais DPPH \bullet , OH \bullet e ABTS \bullet^+ , pelos flavonóides identificados em destaque tem-se a quercetina que possui uma ligação dupla que confere a ela atividade antioxidante, dado que a presença de uma porção catecol confere maior estabilidade para os radicais aroxil formados por reação com o compostos radicais (BARRECA et al., 2014)

Em estudos *in vivo* realizados por Sá (2012) foi comprovada a ação antioxidante do óleo essencial das folhas de uma espécime de *C. sinensis*. Foi observada uma significativa redução de 20% no hipocampo de camundongos tratados com dose de 150 mg/kg sobre a peroxidação lipídica, reduzindo o estresse oxidativo e o conteúdo de nitrito com uma redução significativa em todos os grupos, sugerindo um efeito neuroprotetor contra lesões cerebrais. Ainda nestes estudos, testes com animais em labirinto aquático de Morris, que avalia a memória espacial, indicaram que os animais tratados com este óleo essencial tiveram uma capacidade de memória melhorada em relação a um grupo controle.

ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DOS CITRUS

Alguns inibidores da AChE têm sido encontrados em plantas medicinais, inibidores reversíveis da colinesterase são atualmente usados em ensaios clínicos no tratamento da doença de Alzheimer (DA), onde este tratamento baseia-se na inibição da AChE. A enzima AChE hidrolisa a acetilcolina, que logo após é desnaturada em colina e acetato. As colinesterases presentes no Reino animal são classificadas de acordo com a especificidade do substrato, como acetil (AChE), propionil (PChE) ou butyrylcholinesterases (BuChE) (MIYAZAWA e YAMAFUJI, 2005; RYAN e KEANE, 1999).

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 da 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 μ g/mL, uma inibição de 27% e 37%, respectivamente. Chaiyana e colaboradores (2010) constatou essa mesma atividade ao estudar *Citrus hystrix* (que provocou inibição de 10% da enzima AChE), e essa ação foi relacionada a presença dos monoterpenos acíclicos e monocíclicos (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 pode estar associadas

a uma maior efetividade na inibição, já que o sítio ativo da AChE é conhecido por ser susceptível às 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 e 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*, que demonstrou ser um potente inibidor da AChE (CONFORTI et al., 2007).

6 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de plantas do gênero *Citrus* apresentam compostos biologicamente ativos que podem atuar de várias formas na promoção à saúde. 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 monoterpenos, como o *d*-limoneno.

As (CDs) utilizadas para a formulação de complexos de inclusão constituem uma classe de excipientes farmacêuticos com capacidade para formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares como por exemplo os óleos essenciais o que torna o gênero *Citrus* como uma promissora fonte de princípios ativos para elaboração de novas formulações farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABIRAMI, A.; NAGARANI, G.; SIDDHURAJU, P. *In vitro* antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, p. 16–25, 2014.
- AGUIAR, U. N.; LIMA, S. G.; ROCHA, M. S.; FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, R. M.; MOURA, L. C. B.; ALMEIDA, L. T. G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, n. 1, 2014.
- BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; LEUZZI, U.; GATTUSO, G. First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 149, p. 244–252, 2014.
- BENDER, H. Production, Characterization, and application of cyclodextrins. **Advances in Biotechnological Processes**, v. 6, p. 31-71, 1986.
- CAMILLERI, P.; HASKINSA, N. J.; HOWLETT, D. R. β -Cyclodextrin interacts with the Alzheimer amyloid β -A4 peptide. **FEBS Letters**, v. 341, p. 256-258, 1994.
- CAMPÊLO, L. M. L.; GONÇALVES, F. C. M.; FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M. Antioxidant activity of *Citrus limon* essential oil in mice hippocampus. **Pharmaceutical Biology** - in press, 2011.
- CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1629-1633, 2002.
- CHAIYANA, W., SAEIO, K.; HENNINK, W.E.; OKONOGET, S. Characterization of potent anticholinesterase plant oil based microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 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. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 427-433, 2007.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; DACUNHA-MARINHO, B.; TORRES-LABANDEIRA, J. J.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Characterization of β -Lapachone and Methylated β -Cyclodextrin Solid-state Systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 3, p. 1-10, 2007.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 12, n. 3, p. 1023-35, 2004.

EZEONU, F. C.; CHIDUME, G. I.; UDEDI, S. C. Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 273-274, 2001.

EZZAT, S. M. In vitro inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 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. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 108-110, 2011.

FINKELSTEIN, L. B.; BENNER, E. A.; HENDRIXSON, M. C. *et al.*, Tricyclic Cyanoguanidinas: Synthesis, Site of Action and Insecticidal Activity of a Novel Class of Reversible Acetylcholinesterase Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, 599, p 613, 2002.

FOYE, W. O.; LEMKE, T.L; WILLIAN, D.A. Cholinergic agonists, acetylcholinesterase inhibitors, and cholinergic antagonists. Principles of Medicinal Chemistry, 4^a ed., Ed. Willians & Wilkins, cap. 17, p 321, USA, 1995.

GUTKIND, G.O., MARTINO, V., GRANÃ, N., COUSSIO, J.D., TORRES, R.A. 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7976-7982, 2008.

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

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. **Agricultural and Food Science**, v. 10, p. 243-259, 2001.

KARR, L. L.; COATS, J. R. Insecticidal Properties of *d*-limonene. **Journal of Pest Science**, v. 13, p. 287-290, 1988.

KAVIYAA, S.; SANTHANALAKSHMIA, J.; VISWANATHANB, B.; MUTHUMARYC, J.; K. SRINIVASAN. Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A**. v. 79, p. 594–598, 2011.

LAWLESS, M. W.; MANKAN, A. K.; GRAY, S. G.; NORRIS, S. Endoplasmic reticulum stress—A double edged sword for Z alpha-1 antitrypsin deficiency hepatotoxicity. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 40, p. 1403–1414, 2008.

LI, N.; HAN, L.; CHAO, J. **Journal of Inclusion Phenoma and Macrocyclic Chemistry**, n. 73, p. 247-254, 2012.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmacy**, v. 329, p. 1-11, 2007.

LÓPEZ-MUÑOZ, G. A.; BALDERAS-LÓPEZ, J. A. Photothermal characterization of citrus essential oils and their derivatives. *Thermochimica Acta*. v. 579, p. 40–44, 2014.

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. **Química Nova.**, v. 32, p. 946-949, 2009.

MINETT, T. S. C.; BERTOLUCCI, P. H. F. Terapia Colinérgica na Doença de Alzheimer. **Revista Neurociências**, v. 1, n. 8, p. 11-14, 2000.

MIYAZAWA, M.; YAMAFUJI, C. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1765-1765, 2005.

MONTINE, T. J.; NEELY, M. D.; QUINN, J. F. BEAL, M. F.; *et al.* Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 55, p. 620-626, 2002.

PEERING, W., PERING, P., STAHELIN, H. *The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old.* **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 45, n. 6, p. 718-724, 1997.

QUINTAS-JUNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S. S.; MENEZES, P. P.; SANTOS, M. R. V.; BONJARDIM, L. R.; ALMEIDA, J. R. G. S.; GELAIN, D. P.; ARAÚJO, A. A. S. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. **Phytomedicine**, v. 20, p. 436–440, 2013.

QIN, X.; ABE, H.; NAKANISHI, H. NMR and CD studies on the interaction of Alzheimer β -amyloid peptide (12–28) with β -cyclodextrin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 297, p. 1011–1015, 2002.

RYAN, M.F.; KEANE, S. Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 1097–1104, 1999.

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, (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas), UFPI, 2012.

SÁ, C. G.; CARDOSO, K. M. F.; FREITAS, R. M.; FEITOSA, C. M. Efeito do tratamento agudo do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck na aquisição da memória espacial de ratos avaliada no labirinto aquático de Morris. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 2, n. 33, p. 211-215, 2012.

SANGPHEAK, W.; KHUNTAWEE, W.; WOLSCHANN, P.; PONGSAWASDI, P.; RUNGROTMONGKOL, T. Enhanced stability of a naringenin/2,6-dimethyl β -cyclodextrin inclusion complex: Molecular dynamics and free energy calculations based on MM- and QM-PBSA/GBSA. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 50, p. 10-15, 2014.

SHAO, D.; ZOU, C.; LUO, C.; TAN, X.; LI, Y. Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. n. 14, v.18, p. 4639-42, 2004.

SINGH, P.; SHUKLA, R.; PRAKASHA, B.; KUMAR, A., SINGH, S.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, p. 1734–1740, 2010.

SISKOS, E. P.; KONSTANTOPOULOU, M. A.; MAZOMENOS, B.E. Insecticidal activity of *Citrus aurantium* peel extract against *Bactrocera oleae* and *Ceratitidis capitata* adults (Diptera: Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 133, p. 108-116, 2009.

SOCCI, D., CRANDALL, B., ARENDASH, G. Chronic antioxidant treatment improves the cognitive performance of aged rats. **Brain Research**, 20, 1-2, p 88-94, 1995.

TAKAHASHI, Y.; INABA, N.; KUWAHARA, S.; KUKI, W. Antioxidative effect of Citrus essential oil components on human low-density lipoprotein *in vitro*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, p. 195-197, 2003.

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 678-686, 1998.

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. **Revista Brasileira de farmacognosia**, 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. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 13, p. 269-272, 2009.

WANG, A. Y.; ZHOU, M. Y.; LIN, W. C. Antioxidative and anti-inflammatory properties of *Citrus sulcata* extracts. **Food Chemistry**, 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* limonóides, Flavonoids, and coumarins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 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). **World Journal of Zoology**, v. 4, p. 109-121, 2009.

CAPÍTULO II

Elaboração de um complexo de inclusão a partir do óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* e a β -ciclodextrina.

Katrícia Maria Feitosa Cardoso, Cassio Herbert Santos de Melo, Márcio dos Santos Rocha, Chistiane Mendes Feitosa

Elaboração de um complexo de inclusão a partir do óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* e a β -ciclodextrina.

RESUMO

Elaborar complexos de inclusão entre óleos essenciais e β -ciclodextrina é um método bastante efetivo para proteção do complexante contra a oxidação, degradação térmica e evaporação. A formação destes complexos é de suma importância, uma vez que o processo de inclusão modula as propriedades físico-químicas tanto do complexante quanto do complexado, propriedades estas que envolvem aumento da solubilidade, melhora da estabilidade química, biodisponibilidade, toxicidade reduzida, dentre outras. O objetivo deste trabalho foi elaborar um complexo de inclusão entre o óleo essencial extraído das folhas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (OECS) (laranjeira) e β -ciclodextrina. O complexo de inclusão do OECS e β -ciclodextrina (CIOECS- β CD) foi elaborado a partir do método de co-precipitação. O CIOECS- β CD foi preparado em três diferentes proporções (6:94, 9:91 e 12:88). Para a proporção 6:94, 20mg do OECS, foi solubilizado em 200 mL etanol PA (10% w/v) e adicionado lentamente à solução de β -ciclodextrina em banho maria (uma mistura de 313 mg de β -CD solubilizada em 12mL etanol para água (1:2) mantida a 55 °C (\pm 2 °C) sob aquecimento e agitação). O aquecimento foi interrompido após a adição do OECS e a mistura resultante vedada permanecendo sobre agitação durante 4 horas. A solução final permaneceu em refrigeração durante 24 horas a 4 °C. O precipitado foi recolhido e liofilizado e identificado como CIOECS- β CD 6:94, repetiu-se o procedimento para as outras proporções. Para a caracterização do CIOECS- β CD utilizou-se os métodos espectroscópicos a saber: ultravioleta, calorimetria exploratória diferencial, espectrofotometria na região do infravermelho com transformada de Fourier e difratometria de raios X. Nesta perspectiva nossos achados sugerem que após otimização das propriedades farmacológicas desse complexo e potencial terapêutico, poderá ser obtido comprimidos na forma de compressão direta para tratamento de pacientes com Alzheimer.

Palavras-chave: *Citrus sinenses*, β -ciclodextrina, Complexo de inclusão

ABSTRACT

Develop inclusion complexes between essential oils and β -cyclodextrin is a very effective method for complexing protection against oxidation, thermal degradation and evaporation. The formation of these complexes is of paramount importance, since the inclusion process modulates the physicochemical properties of both the complexing and the complexed, these properties involving increased solubility, improved chemical stability, bioavailability, reduced toxicity, among others. The objective of this study was to develop an inclusion complex between the essential oil extracted from the leaves of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (OECS) (orange) and β -cyclodextrin. The inclusion complex of β -cyclodextrin and OECS (CIOECS- β CD) was prepared by the method of coprecipitation. The CIOECS- β CD was prepared at three different ratios (6:94, 9:91 and 12:88). For the 6:94 ratio, the DECS 20 mg, was solubilized in 200 mL ethanol BP (10% w / v) and added slowly to the β -cyclodextrin solution in a water bath (a mixture of 313 mg of β -CD solubilized in 12mL ethanol to water (1: 2) maintained at 55 ° C (\pm 2 ° C) under heating and stirring). The heating was stopped after the addition of DECS and the resulting mixture remains sealed under stirring for 4 hours. The final solution remained at refrigerated for 24 hours at 4 ° C. The precipitate was collected and dried and identified as CIOECS- β CD 6:94, the procedure was repeated for other ratios. For the characterization of CIOECS- β CD was used spectroscopic methods such as: ultraviolet, differential scanning calorimetry, spectroscopy in the infrared Fourier transform spectroscopy and X-ray diffraction this perspective our findings suggest that, after optimization of the pharmacological properties of this complex and therapeutic potential can be obtained in the form of tablet a direct compression for the treatment of Alzheimer's patients.

Keywords: *Citrus sinenses*, β -cyclodextrin, Inclusion complex

1 INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OES) são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Os OES podem ser obtidos por diversas técnicas, a saber: arraste por vapor d'água, extração por CO₂ supercrítico, hidrodestilação, dentre outras. OES são bastante utilizados na indústria farmacêutica ou cosmética e possuem várias atividades comprovadas: antibacteriano, antisséptico, antiinflamatório, dentre outras (SIMÕES, 2000). Os OES podem ser encontrados em muitas plantas aromáticas, e também nas plantas cítricas.

Os OES da espécie *Citrus sinensis*, espécie conhecida popularmente como laranja, apresentaram em estudos atividade sedativa / hipnótica, contrastando com o extrato etanólico das folhas, que não apresentou esta atividade (CARVALHO et al., 2002). O extrato hexânico possui atividade larvicida contra a larva do mosquito *Aedes aegypti* L. (WARIKOO et al., 2012). Os frutos se mostraram, *in vitro*, potentes inibidores da atividade do rotavírus, que causa diarreias (HYUN et al., 2000). O suco da fruta apresenta propriedades antioxidantes (BARRECA et al., 2014). As nanopartículas preparadas a partir do extrato da casca apresentam atividade antibacteriana (KAVIYA et al., 2011) É também amplamente divulgada como digestiva, expectorante, diurética e hipotensora na medicina tradicional, embora sua eficácia não tenha sido comprovada cientificamente. Ao chá das folhas atribui-se propriedades sudorífera, antigripal, carminativa, calmante e antiespasmódica e os aos chás da casca e dos frutos é indicado contra má digestão (LORENZI e MATOS, 2002; MATOS et al., 1999).

Elaborar complexos de inclusão entre óleos essenciais e β -ciclodextrina é um método bastante efetivo para proteção do complexado contra a oxidação, degradação térmica e evaporação (BHANDARI et al., 1998). A formação destes complexos é de suma importância, pois, o processo de inclusão modula as propriedades físico-químicas tanto do complexante quanto do complexado, propriedades estas que envolvem aumento da solubilidade, melhora da estabilidade química, biodisponibilidade, toxicidade reduzida dentre outras (LI et al., 2012). O agente complexante utilizado neste estudo é a β -ciclodextrina (β -CD), faz parte da classe das ciclodextrinas, é formada por sete unidades de D-(+)-glicopiranosose unidas por ligações α -1,4 (HU et al., 2012), possui em sua estrutura grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior, assim seu exterior é hidrofílico e sua cavidade interna é hidrofóbica. A presença desta cavidade permite que as ciclodextrinas complexem outras moléculas, de dimensões compatíveis,

alterem suas propriedades físico-químicas, tais como, solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade (FRACETO, 2007). A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas (CUNHA-FILHO et al., 2007).

As Ciclodextrinas podem ser consideradas como um dos melhores carreadores para aplicações farmacêuticas, devido à sua eficiência em complexar drogas, mas a aplicação no campo farmacêutico é limitada devido a sua baixa solubilidade em água e alguns efeitos colaterais indesejados depois da administração parentérica (HU et al., 2012). No entanto, mais de 30 medicamentos comercializados no mercado mundial contam com a presença deste excipiente em suas fórmulas (DAVIS e BREWSTER, 2004)

Estudos preliminares realizados no nosso grupo de pesquisa com o OE das folhas de uma espécie de *Citrus sinensis* administrado em ratos sugeriu que este OE inibe potencialmente a enzima acetilcolinesterase melhorando a memória destes animais (SÁ, 2012).

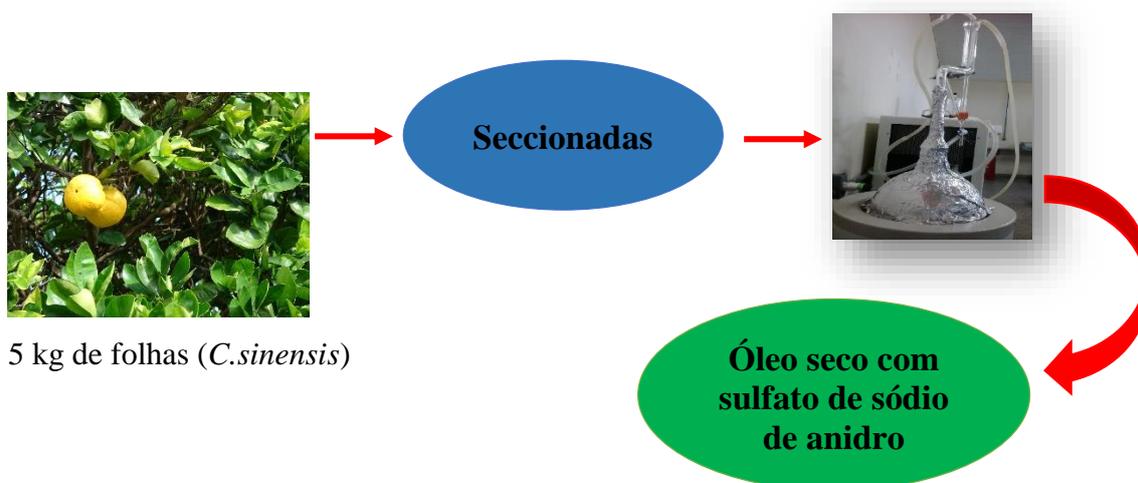
Neste contexto, os resultados apresentados por Sá (2012) nos motivaram a elaborar e caracterizar um complexo de inclusão entre o OE das folhas de *C. sinensis* e β -ciclodextrina. Esta nova abordagem de pesquisa sugere que novos estudos envolvendo tanto o óleo essencial como formulações farmacêuticas sólidas a partir do OE, podem vir a fornecer um novo medicamento para o tratamento do Mal de Alzheimer.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Extração do óleo essencial de *Citrus sinensis*

Foram coletadas no Bairro São Pedro, município de Teresina-PI cerca de 5,0 kg de folhas de *C. sinensis*. As folhas foram seccionadas e submetidas ao processo de hidrodestilação-Clevenger por um período de 4h (Ilustrações 1). Após a hidrodestilação calculou-se o rendimento do óleo essencial. O OECS obtido foi seco com sulfato de sódio anidro e reservado para elaboração do complexo de inclusão com a β -ciclodextrina.

Ilustração 1. Esquema da extração do óleo essencial de *Citrus sinensis*



2.2 Identificação dos constituintes do óleo essencial de *Citrus sinensis*

A análise da amostra de óleo essencial de *Citrus sinensis* OECS foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) utilizando cromatógrafo TRACE GC Ultra, acoplado ao espectrômetro de massas TSQ Quantum, ambos da Thermo Scientific. Foi utilizando coluna capilar apolar Equity 1, de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., película de 0,25 μm); carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 1 mL/min e modo de divisão 1/10. A temperatura do injetor e do detector foi programada em 250 °C. A temperatura da coluna foi programada de 50 °C a 180 °C a uma taxa de 5 °C/min, seguida de uma rampa de 180 °C a 260 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min., permanecendo 10 minutos a 260 °C. Os espectros de massas foram gravados na faixa de 50 a 650 m/z, e o volume injetado foi de 1 μL .

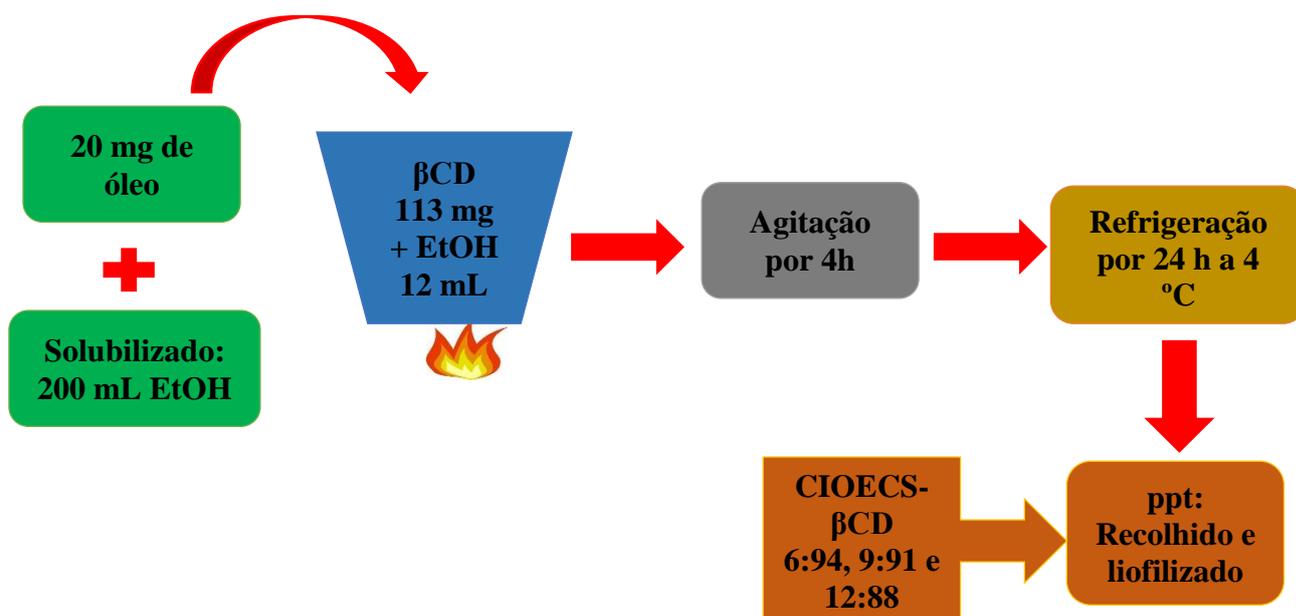
Os componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massas. Uma série de C8-C20 *n*-alcanos foi usada como referência para o cálculo do índice de retenção, bem como por comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura. A composição percentual foi obtida a partir da medida da integração das áreas sobre os picos.

2.3 Elaboração do complexo de inclusão com β -ciclodextrina e o óleo essencial

Para o processo de complexação utilizou-se o método de co-precipitação usado por Reineccius (1989), modificado por Bhandari et al. (1998). Preparou-se o CIOECS-

β CD em três diferentes proporções (6:94, 9:91 e 12:88). Para a proporção 6:94, 20mg de óleo essencial de laranja, foi solubilizado em 200 mL etanol PA (10% w/v) e adicionado lentamente à solução de β -ciclodextrina em banho maria (uma mistura de 313 mg de β -CD solubilizada em 12 mL etanol para água (1:2) mantida a 55 ° C (\pm 2 °C) sob aquecimento e agitação). O aquecimento foi interrompido após a adição do óleo, e a mistura resultante vedada permanecendo sobre agitação durante 4 horas. A solução final permaneceu em refrigeração durante 24 horas a 4 ° C. O precipitado foi recolhido e liofilizado, identificado como CIOECS- β CD 6:94. O procedimento supracitado foi repetido para as outras duas proporções 9:91 e 12:88. Para a mistura física (MF) entre OECS e β -CD fez-se uma simples combinação de 40 mg de OECS e 400 mg de β -CD, maceradas em grau com pistilo. Finalmente, as misturas em pó foram armazenados a 25 °C em um dissecador a vácuo (Ilustração 2).

Ilustração 2. Esquemática da elaboração do complexo de inclusão



2.4 Caracterização do complexo de inclusão

Para a caracterização das misturas foram utilizados os métodos espectroscópicos: ultravioleta (UV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), Espectrofotometria na

região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) com acessório para reflectância total atenuada (ATR) e difratometria de Raios X (DRX).

2.4.1 Ultravioleta/Visível

Analisou-se as soluções de 40 ppm de (OECS/Etanol) e a solução padrão proporção de 1:24 (H₂O/Etanol) na faixa de absorção de 190 cm⁻¹ e 800 cm⁻¹ a cada 15 minutos até completar 300 minutos, verificando a absorbância versus o comprimento de onda na faixa do ultravioleta., repetiu-se o procedimento para o CIOECS-βCD.

2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

Na análise por DSC (TA Instrumento 2920) colocou amostras de 5 mg (6:94, 12:88, βCD, OECS) em uma porta de alumínio, analisadas por uma taxa de 10°C/min entre 30-300 °C, sob atmosfera de nitrogênio (fluxo de 40mL/min). As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Combustíveis da Universidade Federal do Piauí – LAPETRO.

2.4.3 Espectrofotometria na região do infravermelho com transformada de Fourier e acessório de reflectância total atenuada

Na análise por FT-IR utilizou-se Espectômetro com acessório para reflectância total atenuada (ATR) modelo Variam 660- IR acessibilidade 4cm⁻¹, 16 escaneamentos com variação de 400-4000 nas mesmas proporções para a obtenção do resultado final e elucidar a formação do complexo. As amostras analisadas foram (CS 6:94, 9:91, 12:88, βCD, MF e OECS) As análises foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados da Universidade Federal do Piauí – LIMAV.

2.4.4 Difração de raios X

A análise de raios X, das proporções do complexo de inclusão e a mistura física foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da UFPI, em difratômetro (Shimadzu modelo XRD-6000), operando a 40 KV, 30 mA, com varredura angular 2θ de 2°min⁻¹, variando de 2 – 40 °C, utilizando-se radiação de cobre.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração e cálculo do rendimento do óleo

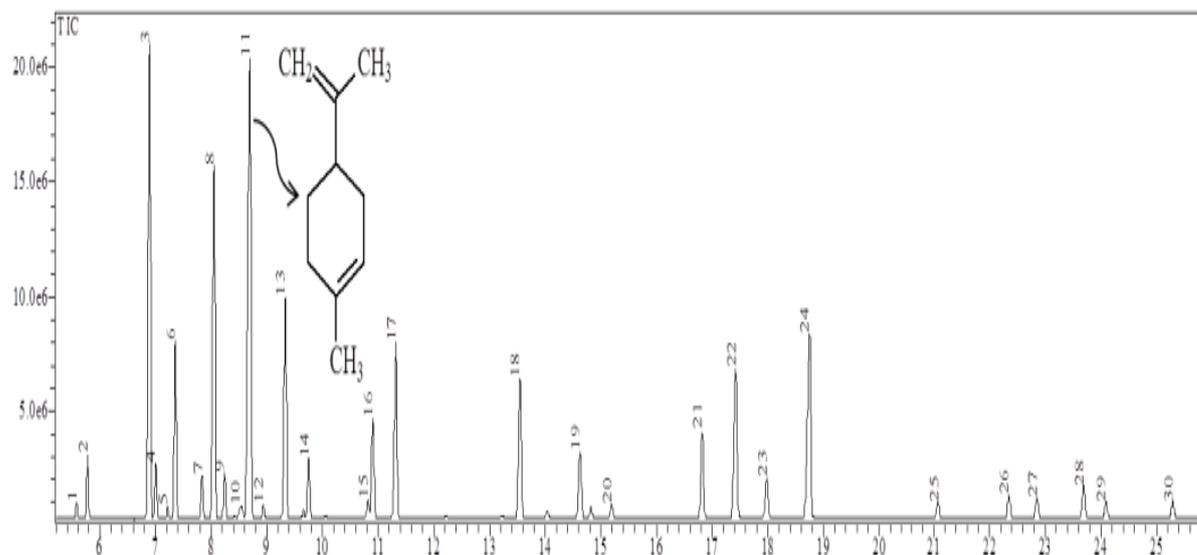
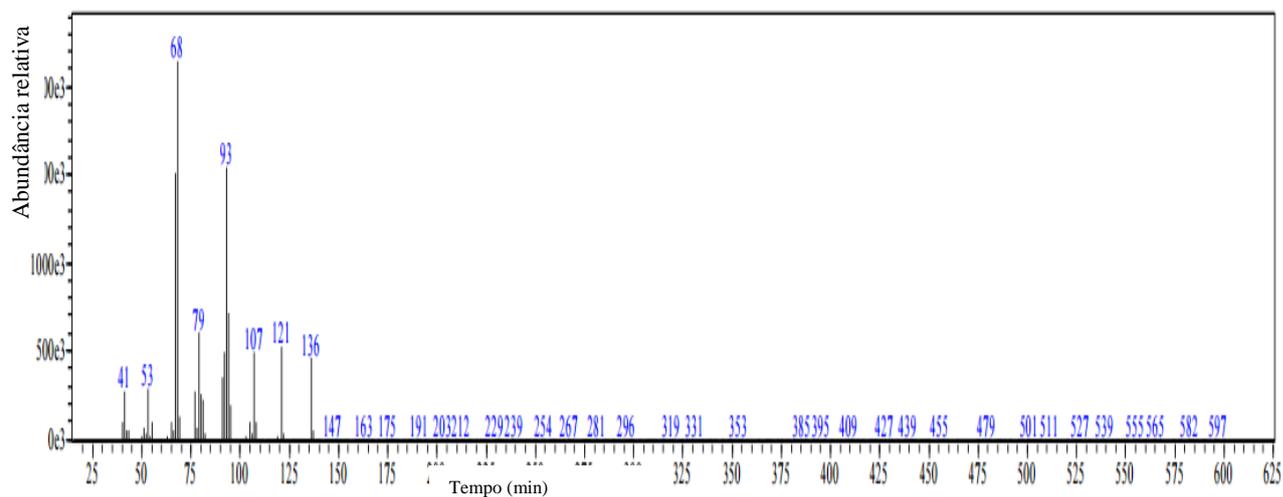
A partir da extração de 5000,0 g folhas de *Citrus sinensis* por hidrodestilação com extrator tipo Clenvenger, obteve-se um volume de 5,0 mL de óleo essencial. O rendimento de 0,1% de óleo essencial foi obtido em relação as folhas frescas.

3.2 Caracterização dos Constituintes

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. A análise identificou uma grande quantidade de constituintes, que a maioria são monoterpenos característicos do óleo de *C. sinensis* (SÁ, 2012). O constituinte mais abundante encontrado nas folhas de *C. sinensis* foi o β -felandreno que teve uma porcentagem de área de (20,26%), em outras espécies de *Citrus* o limoneno é o mais abundante (TU et al., 2002).

Neste presente estudo a análise por CG-EM do óleo essencial das folhas de *C. sinensis* identificou uma mistura dos constituintes sendo, que o maroritário é o limoneno, caracterizando a folha de laranja.

A identificação dos constituintes foi realizada a partir do cromatograma do íon extraído, no caso escolheu-se o composto limoneno. O sinal m/z 136,24 do limoneno foi isolado e fragmentado (Ilustração 3B). A fragmentação resultou na formação dos íons m/z 93 (pico base), 68 e 67. O pico base do limoneno é resultante da movimentação de elétrons no ciclohexano (LIMA, 2006).

Ilustração 3A. Cromatograma do óleo de *Citrus sinensis* com tempo de retenção**Ilustração 3B.** Espectro de massas do limoneno

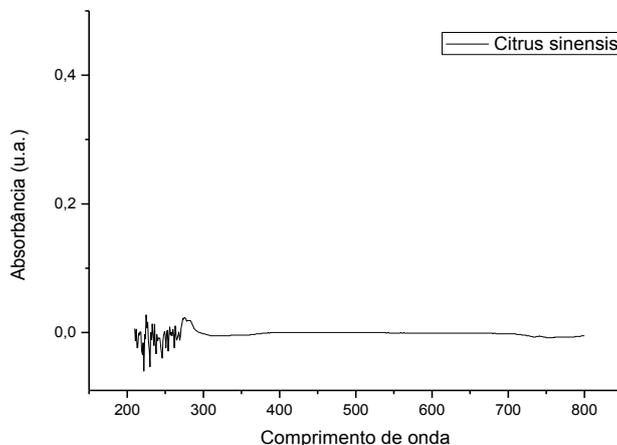
3.3 Caracterização do Complexo (CIOECS- β CD)

3.3.1 Ultravioleta (UV)

A espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta/visível (UV/VIS) é um método analítico baseado na propriedade das espécies iônicas ou moleculares de determinados comprimentos de onda da radiação UV/VIS (LIMA et al., 2008; LYRA et al., 2010).

Na amostra de OE (Ilustração 4) obtivemos uma pequena variação no gráfico de absorbância versus o comprimento de onda na faixa do ultravioleta, verificou-se uma baixa absorção sugerindo uma ineficácia na caracterização por esta técnica, já que o complexo de inclusão não fluoresceu e não obteve o espectro de UV, tornando esta ineficaz para análise da mistura (VENTURINE et al., 2008).

Ilustração 4. Análise Ultravioleta do CIOECS- β CD

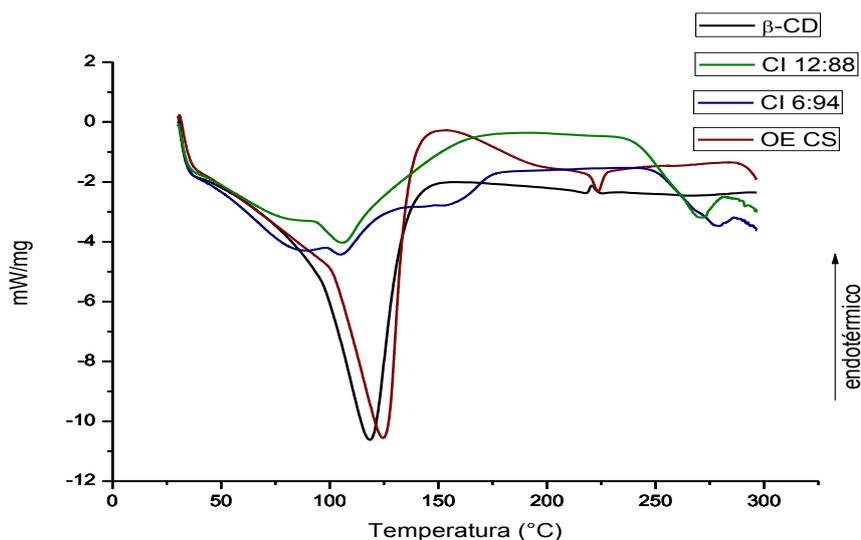


3.3.2 Análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na análise por DSC (Ilustração 5) o termograma da β -CD demonstra um acentuado pico endotérmico a 118,2 °C provocado pela perda de água presente no interior da sua cavidade, pico que teve sua intensidade reduzida quando comparado ao termograma dos complexos o evento característico da desidratação da CD na curva DSC do complexo pode apresentar um deslocamento devido à substituição de moléculas de

água na cavidade por moléculas hóspedes, o que resulta em alteração do estado energético (LI et al., 2005; FICARRA et al., 2000), deslocou a banda do OE, a diminuição no pico endotérmico é associada com a amorfização da amostra ou uma formação de complexo entre as moléculas (AIGNER et al., 2012).

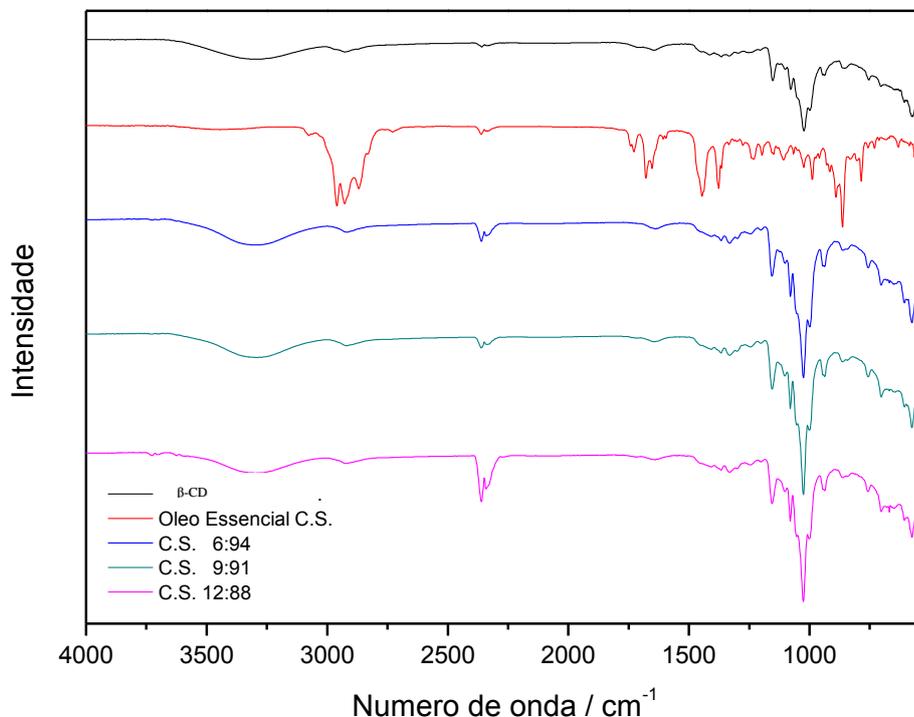
Ilustração 5. Calorimetria Exploratória Diferencial do CIOECS- β CD 6:94 - 12:88



3.3.3 Análise por Infravermelho (FTIR-ATR)

A caracterização por FTIR-ATR foi baseada nos deslocamentos que ocorrem nas bandas de absorção da ciclodextrina, devido a sua interação entre grupos de átomos da molécula hóspede (KUBOTA et al., 2010). Na Ilustração 6, observa-se principalmente mudanças no desaparecimento de bandas do óleo, em 2770 cm^{-1} há os picos correspondentes a deformações de aldeído, que desaparecem no complexo. Em 1670 cm^{-1} há os picos correspondentes as ligações C=O de aldeído e em 1613 cm^{-1} os picos correspondentes as ligações C=C, ambos os picos desapareceram no espectro das proporções. A partir destas análises sugere-se que houve a formação do complexo, pois quando o óleo ocupa a cavidade da ciclodextrina suas bandas não aparecem no complexo, já que nas análises de infravermelho ocorre a complexação, quando as bandas mudam de posição, diminuem ou até mesmo desaparecerem (CORTI et al., 2007)

Ilustração 6. Espectrometria na região do infravermelho com acessório de reflectância total atenuada nas proporções 6:94, 9:91, β -CD, MF e OECS.



3.3.4 Difração de raios X (DRX)

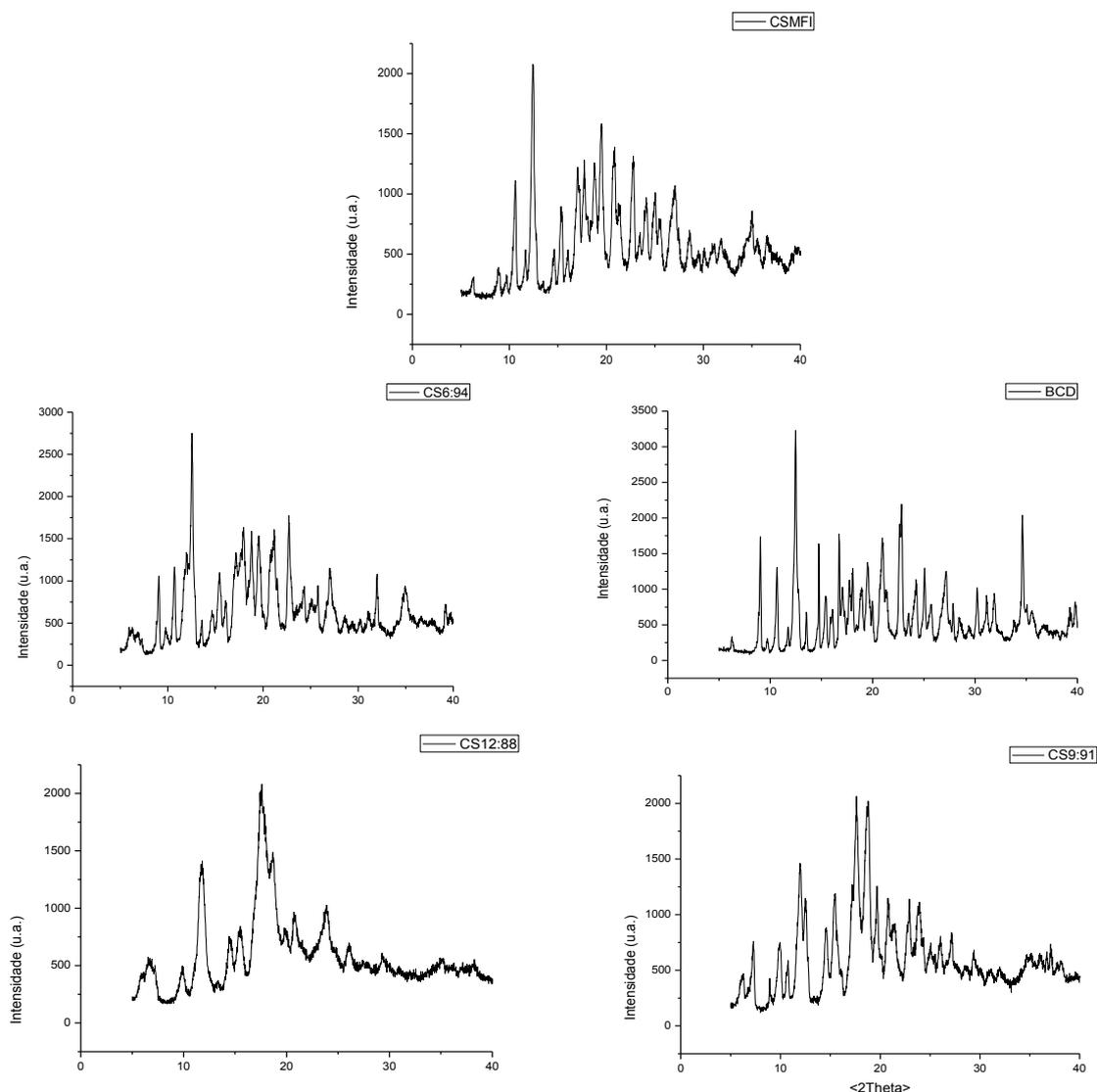
A difração de raios X determina a natureza cristalina de materiais sólidos, apresentando-se como uma técnica simples e rápida para a caracterização de complexos de inclusão é baseada no espalhamento coerente da radiação X por estruturas organizadas (cristais), possibilitando um estudo morfológico das substâncias, sua estrutura cristalina e/ou sua fração cristalina. A comparação dos difratogramas das espécies puras com os seus respectivos complexos e dispersão permite inferir a ocorrência de interação entre estes, mediante alterações em seus picos característicos (VEIGA et al. 2006).

Observou-se a formação de novos picos em CIOECS- β CD 6:94 e 9:91 entre $2\theta = 10^{\circ}$ - 30° diferentes da β -CD, que indicam uma nova fase sólida, que corresponde também ao complexo β -CD/OECS o CIOECS- β CD 6:94 e 9:91 apresentou picos característicos da forma cristalina II em $2\theta = 11,82^{\circ}$, $14,44^{\circ}$, $17,62^{\circ}$ e $18,67^{\circ}$. No entanto, a mistura física é apenas a sobreposição dos padrões da molécula hospede e da β -CD com picos de menor intensidade, caracterizando uma não complexação (TAKAHASHI et al., 2009). A β -CD

também teve sua estrutura cristalina bem evidenciada pela grande quantidade de picos (Ilustração 7).

A mistura física apresentou uma sobreposição dos padrões de DRX das espécies isoladas, com redução de alguns picos característicos da β -ciclodextrina, mas mantendo o pico mais intenso do complexo de inclusão em $2\theta = 12,41^\circ$. O complexo de inclusão sofreu uma ligeira amorfização (Ilustração 7), tendo em vista que o número de sinais foi reduzido, bem como sua intensidade, o que caracteriza perda de cristalinidade (TAKAHASHI et al. 2009) da amostra CS 12:88 que representa maior estabilidade por desaparecimento dos picos característicos da β -CD, assim esta proporção fora escolhida para realização dos testes seguintes. A obtenção de um difratograma com características de um material amorfo, ou seja, sem picos finos bem definidos, pode ser um indicativo da ocorrência de complexação (CORTI et al, 2007).

Ilustração 7. Difratograma das proporções 6:94, 9:91, 12:88 β -CD e MF



4 CONCLUSÃO

Neste trabalho obteve-se êxito através da formação do complexo CIOECS- β CD pela técnica de co-precipitação, a amostra na proporção CS 12:88 foi a que apresentou maior estabilidade por desaparecimento dos picos característicos da β -CD, assim esta proporção fora escolhida para realização dos testes farmacológicos. A busca por novas alternativas no tratamento de Doenças Neurodegenerativas é constante, assim propôs-se a elaboração deste complexo de inclusão CIOECS- β CD que para ser usado posteriormente em formulações farmacêuticas para o tratamento desta doença.

REFERÊNCIAS

AIGNERA, Z.; BERKESIB, O.; FARKASA, G.; SZABO-REVESZ, P. DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex produced by co-grinding. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 57, p. 62– 67, 2012.

BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; LEUZZI, U.; GATTUSO, G. First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidante properties. **Food Chemistry**, v. 149, p. 244–252, 2014.

CORTI, G.; CAPASSO, G.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; MURA, P. Physical-chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin. **Jouranl of Pharmaceutical and Biomedical Analyses. Anal.**, v. 45, p.480-486, 2007.

BHANDARI, B. R.; D'ARCY, B. R.; BICH, L. L. T. Lemon Oil to β -Cyclodextrin Ratio Effect on the Inclusion Efficiency of β -Cyclodextrin and the Retention of Oil Volatiles in the Complex. **Food Chemistry**, n. 46, p. 1494-1499, 1998.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R., COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1629-1633, 2002.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; DACUNHA-MARINHO, B.; TORRES-LABANDEIRA, J. J.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Characterization of β -Lapachone and Methylated β -Cyclodextrin Solid-state Systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 3, p. 1-10, 2007.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, p.1023-35, 2004.

FICARRA, R.; FICARRA, P.; DI BELLA, M.R.; RANERI, D.; TOMMASINI, S., CALABRO, M.L.; GAMBERINI, M.C.; RUSTICHELLI, C. Study of b-blockers: β -

cyclodextrins inclusion complex by NMR, DSC, X-ray and SEM investigation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 23, p. 33–40, 2000.

FRACETO, L. F.; GONÇALVES, M. M.; MORAIS, C. M.; ARAÚJO, D. R.; ZANELLA, L.; PAULA, E.; PERTINHEZ, T. A. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. **Quimica Nova**, n. 30, p. 1203-1207, 2007.

HU, L.; ZHANG, H.; SONG, W.; GUA, D.; HU, Q. Investigation of inclusion complex of cilnidipine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**. v. 90, p. 1719– 1724, 2012.

HYUN, K. D.; JEONG, S. M.; AH, B. E.; JOO, H. M: Inhibitory effect of herbal medicines on rotavirus infectivity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 356-358, 2000.

KAVIYAA, S.; SANTHANALAKSHMIA, J.; VISWANATHANB, B.; MUTHUMARYC, J.; K. SRINIVASAN. Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 79, p. 594–598, 2011.

KUBOTA, D. **Estudo físico-químico do complexo de inclusão do fármaco trimetoprim com a β ciclodextrina aleatoriamente metilada**. Aracaju-SE, (Dissertação - Mestrado em Química), UFSE, 2010

LI, N.; HAN, L.; CHAO, J. Preparation and characterization of the inclusion complex of baicalein with γ -cyclodextrin: an antioxidant ability study. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, n. 73, p. 247-254, 2012.

LI, N.; ZHANG, Y.H.; WU, Y.N.; XIONG X.L.; ZHANG, Y.H. Inclusion complex of trimethoprim with β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Anal., v. 39, p. 824-829, 2005.

LIMA, R. K. **Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-do-cartucho do milho.** Minas Gerais, (Dissertação – Mestrado em Agronomia), UFLA, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; BARBOSA, J. M.; CUNHA, E. V. L.; HIRUMA, C. A. Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. from Northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 41-44, 1999.

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, (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas), UFPI, 2012.

SÁ, C. G.; CARDOSO, K. M. F.; FREITAS, R. M.; FEITOSA, C. M. Efeito do tratamento agudo do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck na aquisição da memória espacial de ratos avaliada no labirinto aquático de Morris. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 2, n. 33, p. 211-215, 2012.

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

SINGH, P.; SHUKLA, R.; PRAKASHA, B.; KUMAR, A., SINGH, S.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, p. 1734–1740, 2010.

TAKAHASHI A. I. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas.** São Paulo-SP, (Dissertação - Mestrado em Ciências Farmacêuticas), USP, 2009.

THEOBALD, F.; HUEBSCHMANN, H. **Analysis of Molecular Fossils:Crude Oil Steroid Biomarker Characterization Using Triple Quadrupole GC-MS/MS.** 2009

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.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica.** Coimbra: Minerva Coimbra, 2006.

VENTURINE CG, NICOLINE J, MACHADO C, MACHADO VG. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quim Nova**, v. 31, n. 2, 2008.

WARIKOO, R.; RAY, A.; SANDHU, J. K.; SAMAL, R.; WAHAB, N.; KUMAR, S. Larvicidal and irritant activities of hexane leaf extracts of *Citrus sinensis* against dengue vector *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** p. 152-155, 2012.

CAPÍTULO III

Análise toxicológica e anticolinesterásica de um complexo de inclusão entre o óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* (L) Osbeck e a β -ciclodextrina

Katrícia Maria Feitosa Cardoso, Chistiane Mendes Feitosa, Rivelilson Mendes de Freitas

Análise toxicológica e anticolinesterásica de um complexo de inclusão entre o óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis* (L) Osbeck e a β -ciclodextrina

RESUMO

Doenças relacionadas a déficits cognitivos, aquisição e retenção de memória são cada vez mais diagnosticadas em um número maior de pessoas, dentre essas doenças destaca-se a doença de Alzheimer (DA), caracterizada por um déficit da neurotransmissão colinérgica e pode ser tratada com agentes que restaurem o nível de acetilcolina através da inibição das enzimas a saber: acetilcolinesterase e butirilcolinesterase ou reduzindo a agregação de β -amilóide e a formação das fibrilas neurotóxicas no cérebro, com isso há necessidade da busca de novos medicamentos para o tratamento da DA. Nesta perspectiva esse trabalho trata da análise toxicológica e anticolinesterásica do complexo de inclusão obtido entre e o óleo essencial extraído das folhas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranjeira) e ciclodextrina (CIOECS- β CD). Nas análises toxicológicas foram realizados os testes de MTT, hemólise e *Artemia salina*, o CIOECS- β CD não apresentou sinais de toxicidade em nenhum dos testes. Nos testes de atividade anticolinesterásica, as análises qualitativa (manchas brancas de inibição em cromatografia em camada delgada) e quantitativa (em espectrofotômetro) de inibição da enzima foram realizadas através do ensaio e Ellman, com os resultados a saber: o CIOECS- β CD inibiu a enzima nos dois testes (manchas brancas no teste qualitativo), tendo um resultado significativo ($CI_{50} = 0,310 \times 10^6 \mu\text{g} / \text{mL}$) em relação ao padrão positivo, a neostigmina ($CI_{50} = 1,87 \mu\text{g}/\text{mL}$), um dos medicamentos já usados no tratamento da DA. As referidas análises foram de suma importância, visto que a investigação do uso seguro deste CIOECS- β CD é promissor pois este composto poderá ser usado em futuras formulações farmacêuticas sólidas direcionadas para o tratamento da DA.

Palavras-chave: toxicologia, anticolinesterase, complexo de inclusão

ABSTRACT

Diseases related to cognitive deficits, memory acquisition and retention are increasingly diagnosed in a greater number of people, among these diseases is distinguished Alzheimer's disease (AD), characterized by a deficit in cholinergic neurotransmission and may be treated with agents to restore the acetylcholine level by inhibiting enzymes such as: acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase or reducing the aggregation of β -amyloid neurotoxicity and the formation of fibrils in the brain, it is necessary to search for new drugs for the treatment of AD. In this perspective this work deals with the toxicological and anticholinesterasic analysis of the inclusion complex obtained between the essential oil extracted from the leaves of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (orange) and cyclodextrin (CIOECS- β CD). In toxicological analyzes were performed the MTT test, hemolysis and *Artemia salina*, the CIOECS- β CD showed no signs of toxicity in any of the tests. In anticholinesterase activity tests, qualitative analyzes (white spots inhibition in thin layer chromatography) and quantitative (spectrophotometer) of enzyme inhibition were performed using the test and Ellman, with the results as follows: the CIOECS- β CD inhibited enzyme in both tests (white spots in the qualitative test) and a significant result ($CI_{50} = 0.310 \times 10^6 \mu\text{g} / \text{mL}$) in relation to the positive pattern, neostigmine ($CI_{50} = 1.87 \mu\text{g} / \text{ml}$), one of the drugs now used to treat of AD. These analyzes were extremely important, since the investigation of the safe use of this CIOECS- β CD is promising because this compound can be used in future solid pharmaceutical formulations directed to the treatment of AD.

Keywords: toxicology, anticholinesterase , inclusion complex

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer é uma doença neurológica que afeta cerca de 10% da população com idade superior a 65 anos. Tem como características, neurodegeneração progressiva, demência e declínio da função cognitiva, geralmente acompanhada de distúrbios comportamentais. Medicamentos utilizados no tratamento da doença são eficazes no entanto acarretam efeitos colaterais indesejados: anorexia, diarreia, fadiga, náuseas, dores musculares, bem como gastrointestinais, cardiorrespiratórias, geniturinárias e distúrbios do sono (RASHED et al., 2014)

Neste trabalho serão abordados bioensaios para avaliar a toxicidade do complexo de inclusão obtido entre e o óleo essencial extraído das folhas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranjeira) e ciclodextrina (CIOECS- β CD). e seu potencial de inibição frente a enzima acetilcolinesterase.

Dentre os bioensaios amplamente divulgados para avaliar a toxicidade encontra-se o ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] que avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução do MTT. Esta solução é um sal de tetrazólio reduzido a formazan pelas enzimas mitocondriais. Este método é aplicado para avaliar a sobrevivência, proliferação de células e detectar o sinal produzido pela ativação de células vivas é um processo de baixo custo e que produz resultados em um curto intervalo de tempo. (MARTINS et al., 2013; SOARES et al., 2012). A clivagem de MTT tem várias propriedades desejáveis onde este é clivado por todas as células metabolicamente ativas que são testadas, não por células mortas ou eritrócitos, assim a quantidade de formazano gerada é diretamente proporcional ao número de células (MOSMANN, 1983).

Outro ensaio bastante utilizado para avaliar a toxicidade é o de avaliação da toxicidade em *Artemia salina* que caracteriza-se por ser um teste de grau qualitativo, rápido e de baixo custo. A *Artemia* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. A simplicidade deste bioensaio de toxicidade favorece sua utilização rotineira (SIQUEIRA et al., 1998).

Para finalizar os ensaios de toxicidade realizamos a avaliação da atividade hemolítica. A hemólise caracteriza-se pela quebra de eritrócitos no sangue que provoca a liberação de hemoglobina e do conteúdo intracelular das células para o plasma circundante. A hemólise é um fenômeno visível, observada por uma coloração rosa

avermelhada no plasma ou soro sanguíneo, dependendo da concentração de hemoglobina livre (a hemólise torna-se visível a partir de $\sim 0,20$ g / l). (DOLCI e PANTEGHINI, 2014)

Para avaliar a atividade anticolinesterásica do CIOECS- β CD realizou-se os testes de inibição da enzima acetilcolinesterase pelo método de Ellman, que é um método extremamente sensível e aplicável a qualquer pequenas quantidades de tecido ou a baixas concentrações de enzima. O princípio do método é a medição da taxa de produção de tiocolina e hidrólise da acetiltiocolina, pela reação contínua do tiol com o íon 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato, para produzir o ânion de cor amarela ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (ELLMAN et al., 1961)

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estudo da citotoxicidade em 3 linhagens de células tumorais (Método do MTT)

As linhagens tumorais utilizadas, HL60 (leucemia pro-mielocítica), *NCI-H292* (câncer de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

A amostra, CIOECS- β CD 12:88, foi diluída em DMSO puro estéril. As linhagens *NCI-H292* (câncer de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama) foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL e a de HL60 (leucemia pro-mielocítica) foi plaqueada na concentração de $0,3 \times 10^6$. A amostra previamente dissolvida em DMSO foi diluída em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais e adicionada em placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 μ L da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm. Como padrão positivo utilizou-se a doxorubicina, medicamento comumente utilizado para tratamento de câncer.

Para concentração única: Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade, com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (inibição de

crescimento variando de 75 a 100%). As amostras que apresentaram mais de 75% de inibição será calculado a CI50.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

2.2 Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*

A toxicidade do complexo em *Artemia salina* foi realizada de acordo com o método descrito por Meyer e colaboradores (1982) com modificações de Islam e colaboradores (2012). Ovos (60 mg) de *A. salina* foram colocados em um béquer de 250 ml contendo água do mar artificial (NaCl, 36 g/L) para eclodirem por 24 horas na presença de luz fluorescente. Após a eclosão, dez *A. salina* foram transferidas para tubos de ensaios contendo o CIOECS-βCD 12:88, nas concentrações 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL. Um controle positivo (dicromato de potássio) foi realizado simultaneamente, nas mesmas concentrações. O experimento foi realizado em triplicata e repetido 3 vezes. Após 24 horas de tratamento a temperatura ambiente, realizou-se a contagem dos crustáceos que morreram e os dados expressos como percentagem de mortalidade pela seguinte fórmula:

$$\text{Mortalidade (\%)} = N_{mm} - N_c \times 10 / N_0,$$

no qual, N_{mm} é o número médio de *A. salina* que morreram, N_0 é o número inicial de *A. salina* que sobreviveram em cada concentração e N_c representa a mortalidade no controle negativo. A CL_{50} (concentração que mata 50% de *A. salina*) do complexo foi obtida por regressão de Probit a partir do software IBM SPSS STATISTIC 20 e índice de mortalidade a partir do software *GraphPad Prism 6.0*.

2.3 Avaliação da atividade hemolítica

Para avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de rato, foi utilizada a metodologia descrita por Ugartondo e colaboradores (2009) com modificações. A suspensão de eritrócitos a 10% foi preparado de acordo com o procedimento descrito por Girish e colaboradores (2012). Para verificar a capacidade hemolítica baseado na lise da membrana celular, 100 µL do complexo de inclusão diluído em PBS (Tampão fosfato salino: NaCl = 8 g/L, KCl = 0,2 g/L, Na₂HPO₄ = 1,44 g/L, and KH₂PO₄ = 0,24 g/L; pH

7,4) nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 10 nM foram adicionados em tubos de ensaios contendo 300 μ L de suspensão de eritrócitos (10% v/v, PBS). Após agitação suave, os tubos foram incubados a 37 °C por 120 minutos. Depois deste tempo, 2400 μ L de PBS foi adicionado à mistura reacional e subsequentemente os eritrócitos foram precipitados por centrifugação (2500 rpm) durante 5 minutos. A magnitude da hemólise foi determinada pela mensuração da absorbância do sobrenadante usando um espectrofotômetro em 540 nm. Dois controles foram utilizados no presente estudo, sendo o PBS como controlo negativo e o Triton X-100 (200, 100, 50, 25 e 10 nM)

2.4 Teste qualitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase

A amostra CIOECS- β CD 12:88 foi dissolvida em metanol para se obter uma concentração de 10 mg/mL. Então aplicou-se 1,5-2,5 μ l de cada amostra numa placa de sílica gel e seguidamente eluída em clorofórmio: metanol 9:1. Após a placa ser preparada a atividade inibitória será detectada utilizando revelador baseado no método de Ellman. A placa será pulverizada com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico])/ATCI (Iodeto de acetiltiocolina) (1 mM DTNB e 1 mM ATCI em tampão tris) até que haja saturação com o reagente, mas não tanto para escorrer. Depois de seca por 3-5 minutos pulveriza-se com 5 units/mL da enzima (ELLMAN, et al., 1961; INGKANINAN et al., 2000; RHEE et al., 2001). A enzima é adquirida liofilizada e sua manipulação dar-se-à em tampão tris-hidroximetil aminometano a pH 8.

2.5 Teste quantitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase

Pesou-se 1 mg do CIOECS- β CD, adicionou-se 1 mL de solução tampão 50mM Tris-HCl, pH8, 10% de metanol, retirou-se 500 μ L de amostra e completou o volume com 500 μ L de solução tampão 50 mM Tris-HCl, pH8, 10% de metanol e assim sucessivamente para obtenção de 5 soluções de concentrações diferentes (1 mg / mL; 0,5 mg / mL; 0,25 mg / mL; 0,125 mg / mL; 0,0625 mg / mL) em triplicatas e diluídas a partir da primeira. Retirou-se da primeira amostra 100 μ L e transferiu-se para um tubo de ensaio (realizar em triplicata para cada concentração). Adicionou-se 100 μ L da enzima 10U com tampão e albumina, em todos os tubos de ensaio e posteriormente 200 μ L de tampão 50mM Tris-HCl, pH8, 0,1% BSA, em todos os tubos de ensaio.

Preparo do branco: adicionou-se em um tubo de ensaio 100 μ L de 50mM Tris-HCl, pH8, 10 % metanol e 300 μ L de Tris-HCl, 50mM, pH8, 0,1% BSA.

Em seguida as amostras foram aquecidas em banho maria, ao retirar as amostras do banho acrescentou-se 500 μ L de solução tampão com DTNB+NaCl+MgCl₂. Transferiu-se as amostras para a cubeta de quartzo e acrescenta-se 100 μ L de solução tampão com iodeto de acetilcolina. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 425 nm, o teste foi monitorado durante um período de 5 min. A neostigmina foi utilizada como controle positivo, nas mesmas concentrações do CIOECS- β CD.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo da citotoxicidade em 3 linhagens de células tumorais (Método do MTT)

A citotoxicidade é um complexo fenômeno *in vivo* que pode desencadear uma gama de efeitos desde uma simples morte celular a alterações metabólicas com mudanças funcionais (MARTINS et al., 2013).

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

A partir da análise dos resultados (Tabela 1), observa-se que o CIOECS- β CD 12:88, não inibiu os tumores das linhagens em estudo pelo método do MTT, onde mesmo apresentando atividade moderada perante a HL60, mas fora bem abaixo do padrão positivo a doxorubicina, podendo ser caracterizado como atóxico. Este resultador é promissor visto que não há interesse que o complexo seja citotóxico (MOSMANN, 1983).

Tabela 1. Percentual de inibição em concentração única do crescimento celular das amostras em três linhagens tumorais e seu intervalo de confiança.

	Inibição NCI- H292 (%)	Desvio da NCI-H292	Inibição MCF-7	Desvio da MCF-7	Inibiçã o HL60	Desvio da HL60
Dox*	88,4	11,5	62,2	0,7	80,0	0,4
CIOECS- βCD	Sem atividade	Sem atividade	Sem atividade	Sem atividade	55,8	16,3

* Doxorrubicina: controle positivo

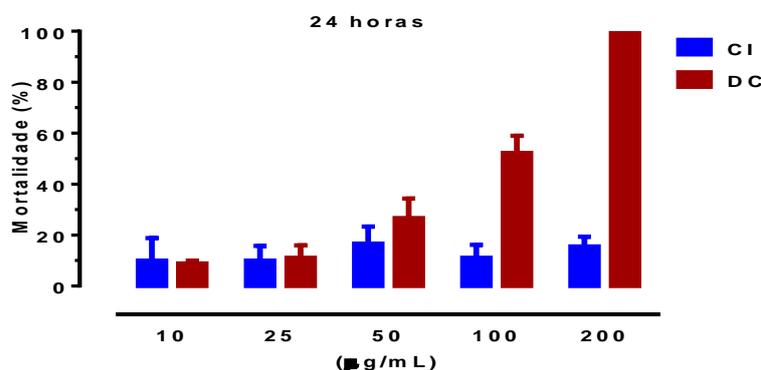
3.2 Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*

O dicromato pode ser usado como padrão nos teste de *Artemia salina*, onde mesmo em baixas concentrações possui alta toxicidade perante o crustáceo (SHAKIR et al., 2012). Segundo Meyer et al. (1982) o grau de toxicidade e a dose letal média, DL50, apresentada por extratos e frações de plantas sobre larvas de *A. salina*, são: $DL50 \geq 1000 \mu\text{g/mL}$ são atóxicos, entre $500 \leq DL50 \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ baixa toxicidade e $DL50 < 500 \mu\text{g/mL}$ altamente tóxico, assim a amostra testada apresenta atoxicidade frente ao teste realizado. Na tabela 2 o índice de mortalidade da amostra é bastante inferior ao controle positivo, assim apresentou nas estatísticas CL_{50} acima de 1000. Este resultado é bastante promissor, visto que o CIOECS-βCD que nos impulsiona para elaboração de um fitomedicamento para o tratamento da Doença de Alzheimer, não pode apresentar sinais de toxicidade.

Tabela 2. Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*.

Amostras	CL_{50} (DPM) ($\mu\text{g/mL}$)
Dicromato	88,88 ($\pm 23,9$)
CI-βCD	>1000

Ilustração 1. Índice de mortalidade da avaliação da toxicidade em *Artemia salina*.

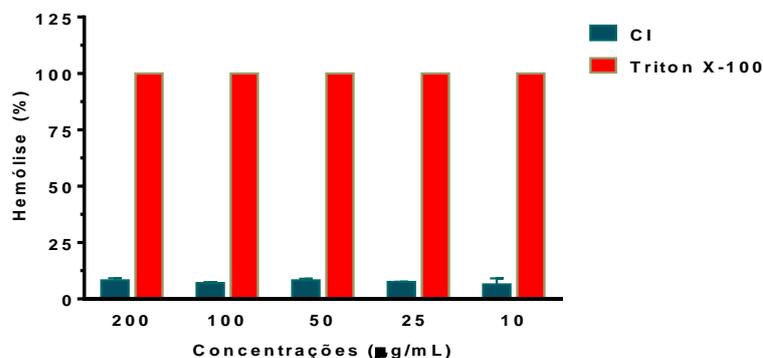


3.3 Teste de hemólise

O Triton X-100 (TX100) é um tensoativo não iônico amplamente utilizado na lise de células para extrair proteína e outras organelas celulares ou para permeabilizar a membrana da célula viva para a transfecção. No entanto, se grandes quantidades são adicionados ou as células são sujeitas a uma exposição prolongada a TX100, as células podem morrer, devido a essa característica o Triton pode ser usado como padrão positivo em testes de hemólise (KOLEY e BARD, 2010).

O resultado da atividade hemolítica (Ilustração 2), mostra que o CIOECS- β CD é atóxico com atividade hemolítica em torno de 10%, em relação ao padrão positivo de Triton-X com atividade de 100%. Devido à baixa atividade hemolítica este composto pode vir a ser utilizado em farmácia para futuras formulações farmacêuticas sólidas (GUL et al., 2014).

Ilustração 2. Atividade hemolítica do complexo de inclusão.



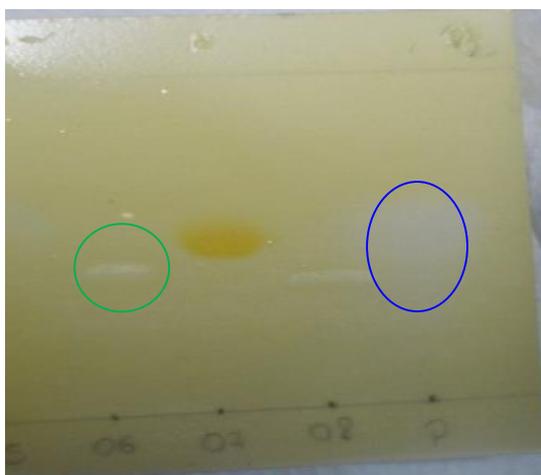
PBS: 0 (sem atividade)

3.4 Teste qualitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase

Plantas que tem demonstrado potencial atividade anticolinesterásica, também apresentam, atividade anti-inflamatória, antioxidante e outras atividades farmacológicas relevantes sendo potencialmente de interesse para o uso clínico de doença de Alzheimer, destacando a espécie *Citrus sinensis* (laranjeira) (KHALED et al., 2014) .

O resultado qualitativo da inibição da enzima acetilcolinesterase em cromatografia em camada delgada (CCD) mostrou que CIOECS- β CD inibiu significativamente a enzima pelo aparecimento de um fundo amarelo na placa com manchas brancas ao redor da amostra que foram visíveis após cerca de 5 minutos, como mostra a Ilustração 2 (ELLMAN, et al., 1961; INGKANINAN, et al., 2000; RHEE *et al.*; 2001).

Ilustração 3. Placa de CCD/Ensaio de CCD/AChE; Círculo verde: CIOECS- β CD/ Círculo Azul: Padrão Caféina

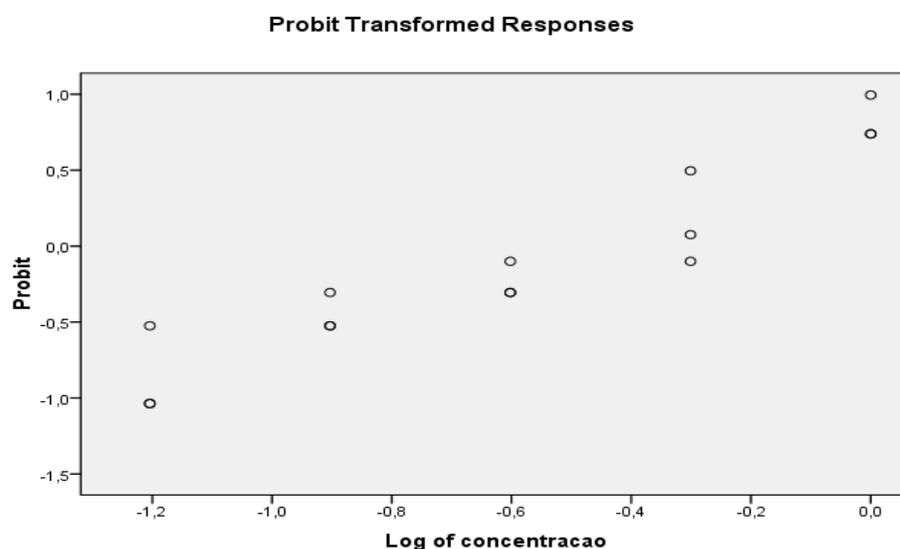


3.5 Teste quantitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase

Os resultados da inibição quantitativa da acetilcolinesterase para O CIOECS- β CD promissora atividade em ambos os testes, o valor de CI_{50} determinado fora de $CI_{50} = 0,310 \times 10^6 \mu\text{g} / \text{mL}$ com limites de 95% entre 0,248 e 0,396 mg / mL). A concentração de inibição de 50% (CI_{50}) foi testado a partir de cinco diferentes concentrações (1 mg / mL; 0,5 mg / mL; 0,25 mg / mL; 0,125 mg / mL; 0,0625 mg / mL) em triplicata, este resultado mostra que o complexo tem potencial de inibição superior ao de medicamentos utilizados

usualmente para o Alzheimer, como o controle positivo neostigmina ($CI_{50} = 1,87 \text{ ug / mL}$) (KHALED et al., 2014), bem como o gráfico de probitos tem a tendência de uma reta (Ilustração 4). Este resultado corrobora com o fato de que a indústria farmacêutica precisa buscar novas alternativas de origem natural, não somente para o Alzheimer, mas também para outras Doenças Neurodegenerativas, já que estas afetam grande parte da população idosa mundial.

Ilustração 4. Análise de Probitos da IC50 do complexo de inclusão



4 CONCLUSÃO

O CIOECS- β CD não apresentou sinais de citotoxicidade a partir do teste do MTT e mostrou-se atóxico nos testes de *Artemia salina* e hemólise, bem como inibiu qualitativamente e quantitativamente a enzima acetilcolinesterase. Assim, a amostra mostra-se inicialmente segura como uma alternativa de interesse para futuros medicamentos para pacientes com Alzheimer ou outras doenças neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS

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

DOLCI, A.; PANTEGHINI, M. Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? **Clinica Chimica Acta**. v. 432, p.38–43, 2014.

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

S. GUL; AZIZ-UR-REHMAN; ABBASI, M. A.; KHAN, K. M.; NAFEESA, K.; SIDDIQA, A.; AKHTAR, M. N.; SHAHID, M.; SUBHANI, Z. Synthesis, antimicrobial evaluation and hemolytic activity of 2-[[5-alkyl/aralkyl substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl]thio]-N-[4-(4-morpholinyl) phenyl]acetamide derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, p. 3-9, 2014.

INGKANINAN, K., DE BEST, C. M., VAN DER HEIJDEN, R., HOFTE, A. J. P., KARABATAK, B., IRTH, H., VAN DER GEENF, J., VERPOORTE, R. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. **Journal of Chromatography A**. v. 872, p. 61-73, 2000.

ISLAM, M. T.; NOOR, M. A.; KARON, B.; FREITAS, R. M. *In vitro* antimicrobial and brine shrimp lethality of *Allophylus cobbe* L. **An international quarterly journal of research in Ayurveda**, v. 33, n. 2, p. 299-302, 2012.

KHALED, N. Z. R.; SUCUPIRA, A. C. C.; CARDOSO, K. M. F.; FEITOSA, C. M. Evaluation of acetylcholinesterase inhibition by *Bauhinia alba aerial parts* methanol extract and bio-active constituents. **PHARMANEST An International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**. v. 5, n. 1, p. 1791-1800, 2014.

KHALED, N. Z. R.; SUCUPIRA, A. C. C.; FERREIRA, P. M. P.; FEITOSA, C. M. Phytoconstituents and evaluation of acetylcholinesterase inhibition by metanol extract of *Liquidambar styraciflua* (L.) Aerial parts. **Journal of applied pharmaceutical Science**, v. 6, n. 2, p. 143-152, 2014.

MARTINS, V. J. M.; LINS, R. X.; BERLINCK, T. C. A.; FIDEL, R. A. S. Cytotoxicity of Root Canal Sealers on Endothelial Cell Cultures. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 1, p. 15-20, 2013.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E., Mcl. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983

KOLEY, D.; BARD, A. J. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 39, p. 16783–16787, 2010.

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. **Journal of Chromatography A**. v. 915, p. 217-223, 2001.

SHAKIR L.; EJAZ, S.; ASHRAF, M. B.; QURESHIC, N. A.; ANJUMD, A. A.; ILTAF I.; JAVEED, A. Ecotoxicological risks associated with tannery effluente Wastewater. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 180-191, 2012.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química nova**, v. 21, n. 5, p. 557- 559, 1998.

SKEHAN , P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOARES, D. M.; GINANI, F.; BARBOZA, C. A. G. Rendimento de células mesenquimais do ligamento periodontal humano submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 41, n. 6, p. 415-419, 2012.

CAPÍTULO IV

PEDIDO DE PATENTE: “Preparação e caracterização de complexo de inclusão do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com β -ciclodextrina e suas aplicações em formulações farmacêuticas na terapia da doença de Alzheimer”

Obtenção de uma formulação farmacêutica a partir do complexo de inclusão do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e suas aplicações com β -ciclodextrina e suas aplicações na terapia da Doença de Alzheimer.

REIVINDICAÇÕES

1. **“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck COM β -ciclodextrina E SUAS APLICAÇÕES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER”**. Produto natural, **caracterizado por** o óleo essencial apresentar ação inibitória da enzima acetilcolinesterase *in vitro* e *in vivo*.

2. **“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck COM β -ciclodextrina E SUAS APLICAÇÕES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER”** produto natural da reivindicação 1, sendo que este óleo essencial **caracterizado por** ser apresentada na forma seca, semi-sólida, líquida e/ou obtida por meio de qualquer solvente ou solução extrativa, independente das proporções entre os solventes.

3. **“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck COM β -ciclodextrina E SUAS APLICAÇÕES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER”** produto natural das Reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** ser obtido por meio de qualquer técnica ou processo de semi-síntese e/ou síntese.

5. **“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck COM β -ciclodextrina E SUAS APLICAÇÕES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER”**. ” produto produto natural da Reivindicação 2, **caracterizado por** se apresentar na forma seca, pode ter sido obtido por meio do processo de secagem do produto sintético por meio de qualquer processo viável de secagem da fração e que possua ou não qualquer excipiente sólido como carreador.

6. **“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck COM β -ciclodextrina E**

SUAS APLICAÇÕES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER". pro^{2/3} tural da Reivindicação 1, **caracterizado por** veiculado em qualquer apresentação farmacêutica, esteja esta na forma de produtos farmacêuticos sólidos, semi-sólidos e/ou líquidos, estéreis ou não, independente da via de administração, posologia, concentração do produto sintético na formulação e forma de liberação dos ativos (liberação imediata, liberação controlada, e etc.).

7. **“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck COM β -ciclodextrina E SUAS APLICAÇÕES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER**”. ” produto farmacêutico da Reivindicação 6, **caracterizado por** apresentar a ação farmacológica de interesse quando isolado ou quando associado a qualquer outro fármaco (sintético, semissintético, fitofármaco, mineral, biológico, biotecnológico ou fitoterápico) que potencialize a ação anticolinesterásia *in vitro* e/ou *in vivo*.

8. **“ PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck COM β -ciclodextrina E SUAS APLICAÇÕES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER**”, produto farmacêutico da Reivindicação 7, **caracterizado por** uso humano que pode ser destinado a administração pediátrica, adulta ou geriátrica.

9. **“ PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck COM β -ciclodextrina E SUAS APLICAÇÕES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER**”, produto farmacêutico da Reivindicação 6, **caracterizado por** tratar apraxias construtivas, agnosias e distúrbios afásicos, bem como outras doenças onde os distúrbios das funções cognitivas responda pela fisiopatologia inerente.

RESUMO

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck COM β -ciclodextrina E SUAS APLICAÇÕES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER”.

A presente invenção referente a aplicação óleo essencial extraído das folhas de *Citrus sinensis* e o complexo de inclusão deste com a β -ciclodextrina com potencial aplicação como inibidores da enzima acetilcolinesterase e os métodos para obtenção dos mesmos. O óleo essencial ou seu complexo podem ser de utilidade no tratamento da doença de Alzheimer, podendo ser administrados como formulações farmacêuticas convencionais ou como preparações transdermais de liberação controlada. A presente invenção referente especificamente a atividade anticolinesterásica *in vivo* e *in vitro* do óleo essencial das folhas de *C. sinensis* e elaboração do complexo de inclusão e a sua aplicação em formulação de produto(s) farmacêutico(s) para o prevenção e/ou tratamento do Mal de Alzheimer, doença associada à redução de neurotransmissores cerebrais, principalmente a acetilcolina.

Comprovou-se a formação do complexo do óleo essencial de *Citrus sinensis* com a β -ciclodextrina através de análises espectroscópicas. Comprovando em estudos preliminares que o óleo essencial de *C. sinensis* inibe significativamente a acetilcolinesterase e melhora significativamente a memória dos animais. Estudos futuros visam analisar este complexo de inclusão que serão administrados em ratos para comparar com resultados do óleo essencial administrado *in natura* nestes animais.

JUSTIFICATIVA

A presente invenção trata da elaboração de um complexo de inclusão (CE) com o agente complexante β -ciclodextrina e o óleo essencial (OE) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, uma espécie conhecida popularmente como laranja, que apresenta algumas atividades relevantes a saber: sedativa e hipnótica. O óleo essencial de *C. sinensis* apresenta potencial aplicação como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) e a métodos para obtenção dos mesmos. O complexo de inclusão pode ser de utilidade no tratamento da doença de Alzheimer, podendo ser administrados como formulações farmacêuticas convencionais ou como preparações transdermais de liberação controlada. A presente invenção trata especificamente a elaboração do complexo de inclusão com o óleo essencial de *C. sinensis* presente nas folhas da planta e a sua aplicação em formulação de produto(s) farmacêutico(s) para o prevenção e/ou tratamento do Mal de Alzheimer, doença associada à redução de neurotransmissores cerebrais, principalmente a acetilcolina.