

DÉBORA BARBOSA DA SILVA SOARES

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *Psychotria viridis*
(Rubiaceae) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
EXTRATOS E CONSTITUINTES**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2015

S676e
2015
D

Soares, Débora Barbosa da Silva
Estudo fitoquímico das folhas de *Psychotria viridis*
(Rubiaceae) e avaliação da atividade biológica de
extratos e constituintes [manuscrito] / Débora Barbosa
da Silva Soares. 2015.
[xi], 147 f. : il.

Orientadora: Lucienir Pains Duarte.
Coorientador: Sidney Augusto Vieira Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Produtos naturais -
Teses 3. Rubiaceae - Teses 4. Alcaloides - Teses I.
Duarte, Lucienir Pains, Orientadora II. Vieira Filho,
Sidney Augusto, Coorientador III. Título.

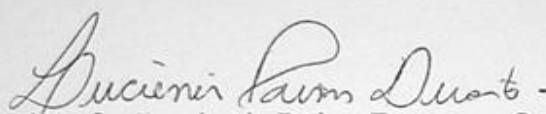
CDU 043




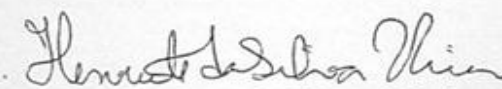
"Estudo Fitoquímico das Folhas de *Psychotria viridis* (Rubiaceae) e Avaliação da Atividade Biológica de Extratos e Constituintes"

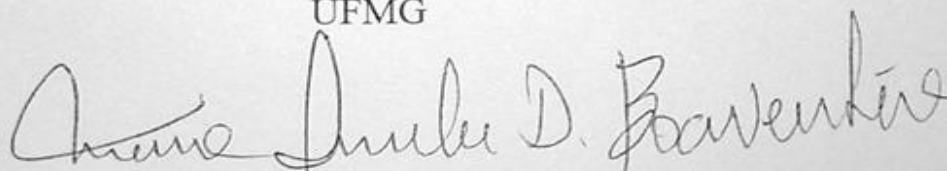
Débora Barbosa da Silva Soares

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Lucienir Pains Duarte - Orientadora
UFMG


Prof. Sidney Augusto Vieira Filho - Coorientador
UFOP


Prof. Henriete da Silva Vieira
UFMG


Prof. Maria Amélia Diamantino Boaventura
UFMG

Belo Horizonte, 23 de março de 2015.

O trabalho descrito nesta dissertação foi realizado sob orientação da Professora Doutora Lucienir Pains Duarte e coorientação do Professor Doutor Sidney Augusto Vieira Filho.

O trabalho descrito nesta dissertação foi desenvolvido sob a colaboração do perito da Polícia Federal André Dias Cavalcanti.

“Ora, até os adolescentes se cansam e ficam exaustos, e os jovens tropeçam e caem; mas aqueles que esperam no Senhor renovam suas forças. Voam alto como águias; correm e não se fatigam, caminham e não se cansam.”

Isaias 40:30-31

“Se tiveres de atravessar a água, estarei contigo. E os rios não te submergirão; se caminhares pelo fogo, não te queimarás, e a chama não te consumirá; Pois eu sou o Senhor, teu Deus, o Santo de Israel, teu salvador.”

Isaias 43:2-3

Dedico este trabalho ao meu amado pai Elson Barbosa Soares, à minha maravilhosa mãe Fátima América da Silva Soares, aos meus queridos irmãos Otávio e Marcus Vinícius Barbosa da Silva Soares.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor de minha vida, que me ama, cuida de mim, e me fortalece.

À Nossa Senhora Aparecida, mãe do Salvador e também minha mãe, que me cobre e protege e com seu manto sagrado, me acompanha e consola nas lutas diárias.

Ao meu pai Elson, que me ensinou a nunca desistir.

À minha mãe Fátima, mulher maravilhosa.

Aos meus irmãos Otávio e Marcus Vinícius, pelo elo de amor e amizade.

À Gabriela, minha irmã de coração, pela alegria transmitida.

À Poliana, pelo carinho e alegria!

À minha família, tios, primos, primas, padrinho e madrinha, afilhados e agregados, pelo elo de amor.

Ao Leonardo, por me dar força, e não me deixar desistir.

Às jardineiras, Fabiana, Lorena, Bruno, Thiago e Mariana.

Às minhas amigas Lívia, Ariadne, Danis, Aurélia, Ana, Bruna, Poliana, Jackeline e tantas outras, pela amizade.

À minha orientadora Dra. Lucienir Pains Duarte, por todo estímulo, carinho, e disposição, sempre com um sorriso no rosto e muita boa vontade.

À Larissa, melhor aluna de IC, por toda ajuda e, também, sempre com um sorriso no rosto.

Ao meu coorientador Professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo), pelo apoio, colaboração e dicas valiosas.

Aos amigos do NEPLAM, Vanessa, Vinícius, Laila, Mariana, Carol, Fernando, Djalma, Cássia, Roqueline, Fernanda e Josana pelo companheirismo diário, e especialmente à Grasi e Rafael, pela obtenção dos espectros de massas e Aline pela obtenção dos espectros no IV.

Às colaboradoras, sempre solícitas, Professoras Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi e Dra. Lúcia Pinheiro dos Santos Pimenta, pela realização dos testes biológicos.

Aos professores do Departamento de Química da UFMG, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Química da UFMG, especialmente às funcionárias da secretaria da pós-graduação, pela disponibilidade.

À Dra. Adriana Akemi Okuma, professora do CEFET-MG, pelos espectros de massas.

À Dra. Ivana Silva Lula, do LAREMAR-UFMG, pela obtenção, valiosa, dos espectros de RMN.

Ao professor Dr. José Carlos de Magalhães e doutoranda Ariadne Duarte Braga pela realização dos testes biológicos.

Ao perito da Polícia Federal André Dias Cavalcanti, pela obtenção do material vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
Plantas medicinais, uso popular e ritualístico	1
A família Rubiaceae	7
O gênero <i>Psychotria</i>	8
A espécie <i>Psychotria viridis</i>	9
OBJETIVO	12
Objetivo do trabalho	12
1 – ESTUDO FITOQUÍMICO	13
1.1 – Parte experimental.....	13
1.1.1 – Métodos gerais.....	13
1.1.2 – Coleta e identificação do material vegetal	15
1.1.3 – Preparação dos extratos das folhas de <i>Psychotria viridis</i>	15
1.1.4 – Elaboração de EHxF	17
1.1.5 – Elaboração de ECIF	22
1.1.6 – Elaboração de EMeF.....	27
1.2 – Determinação estrutural das substâncias obtidas das folhas de <i>P. viridis</i>	38
1.2.1 – PV1: Mistura de hidrocarbonetos	38
1.2.2 – PV2: Triacilglicerol.....	41
1.2.3 – PV3: β -Sistosterol e estigmasterol	44
1.2.4 – PV4: Esqualeno.....	47
1.2.5 – PV5: 24-Metilenocicloartenol.....	49
1.2.6 – PV6: Nonacosanal.....	53
1.2.7 – PV7: Nonacosanol.....	56
1.2.8 – PV8: Ácido hentriacontanoico	59

1.2.9 – PV9: Ácido hexadecanoico (ácido palmítico)	62
1.2.10 – PV10: Ácido heptadecanoico (ácido margárico).....	65
1.2.11 – PV11: Mistura de ácido ursólico e oleanólico	67
1.2.12 – PV12: 1-Palmitil-glicerol (monopalmitina).....	70
1.2.13 – PV13: Mistura de β -sistosterol e estigmasterol glicosilado.....	74
1.2.14 – PV14: N,N-Dimetiltriptamina.....	77
1.2.15 – PV15: N-Metilriptamina.....	81
1.2.16 – PV16: 4- <i>Epi</i> -metilquinato.....	84
1.2.17 – PV17: Tetradecanoato de metila	92
2 – ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	95
2.1 – Introdução geral	95
2.2 – Determinação da atividade antimicrobiana.....	96
2.2.1 – Introdução	96
2.2.2 – Teste de atividade antimicrobiana	97
2.3 – Determinação da atividade inibitória da acetilcolinesterase	101
2.3.1 – Introdução	101
2.3.2 – Tratamento da doença de Alzheimer	102
2.3.2 – Teste de inibição da AChE em microplaca empregando reagente de Ellman..	103
2.4 – Determinação da atividade antioxidante.....	106
2.4.1 – Introdução	106
2.4.2 – Método do ensaio de DPPH	107
2.5 – Avaliação da citotoxicidade	111
2.5.1 – introdução.....	111
2.5.2 – Quimioterápicos antineoplásicos naturais	113
2.5.3 – O ensaio do MTT	115
CONCLUSÃO	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXOS	136

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estudos encontrados na literatura científica para cinco das 169 espécies citadas pelos quilombolas da Sesmaria Mata-Cavalos e pelos índios Krahô, com provável ação sobre o SNC	5
Tabela 2: Frações obtidas da coluna Ap1 e eluentes utilizados.....	17
Tabela 3: Frações obtidas da coluna AP2 e eluentes utilizados	18
Tabela 4: Frações obtidas da coluna Q e eluentes utilizados	32
Tabela 5: Frações obtidas da coluna R e eluentes utilizados	33
Tabela 6: Frações obtidas da coluna S e eluentes utilizados.....	34
Tabela 7: Frações obtidas da coluna T e eluentes utilizados.....	35
Tabela 8: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV16 com os dados da literatura para 4- <i>epi</i> -metilquinato.....	90
Tabela 9: Comparação dos dados de RMN de ^1H de PV16 com os dados da literatura para 4- <i>epi</i> -metilquinato.....	91
Tabela 10: Concentração inibitória mínima das substâncias testadas, em diferentes bactérias	100
Tabela 11: Resultados do teste de inibição da enzima AChE em microplaca dos extratos e substâncias extraídas das folhas de <i>P. viridis</i>	105
Tabela 12: Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV2 (200 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para triacilglicerol	136
Tabela 13: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C obtido para PV3 (200 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para β -sitosterol e estigmasterol.....	137
Tabela 14: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV4 com os dados da literatura para esqualeno.....	138
Tabela 15: Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) obtido para PV5 e dados da literatura para 24-metilenocicloartenol	139
Tabela 16: Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para PV5 (400 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para 24-metilenocicloartenol	140

Tabela 17: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV6 com os dados calculados* para nonacosanal.....	140
Tabela 18: Comparação dos dados de RMN de ^1H de PV6 com os dados da literatura para nonacosanal.....	141
Tabela 19: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV7 com os dados da literatura para álcool graxo de cadeia longa.....	141
Tabela 20: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV8 com os dados da literatura para ácido graxo.....	142
Tabela 21: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV9 com os dados da literatura para o ácido hexadecanoico.....	142
Tabela 22: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV10 com os dados da literatura para o ácido heptadecanoico	143
Tabela 23: Atribuição de sinais do espectro de RMN de ^1H para PV11 (400 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para o ácido ursólico e oleanólico.....	143
Tabela 24: Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV11 e comparação com dados da literatura para o ácido oleanólico e ursólico	144
Tabela 25: Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV12 (100 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para monopalmitina.....	145
Tabela 26: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV13 com os dados da literatura para β -sitosterol glicosilado e estigmasterol glicosilado	146
Tabela 27: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV14 com os dados da literatura para a dimetilriptamina	147
Tabela 28: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV17 com os dados da literatura tetradecanoato de metila	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do pinitol.....	3
Figura 2: Estrutura química da (+)-tubocurarina (1), (-)-curina (2) e isochondrodendrina (3), obtidas do curare do gênero <i>Chondrodendron</i> ; da toxiferina-C (4), isolada do curare do gênero <i>Strychnos</i> e do hexametônio (5).....	4
Figura 3: Fotos de um exemplar de <i>Psychotria viridis</i>	11
Figura 4: Esquema da obtenção dos extratos de folhas de <i>P. viridis</i>	16
Figura 5: Esquema do fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>P. viridis</i>	19
Figura 6: Esquema do fracionamento do ECIF e obtenção das substâncias.	23
Figura 7: Esquema do fracionamento ácido-base do EMeF das folhas de <i>P. viridis</i>	29
Figura 8: Esquema da obtenção das substâncias dos extratos provenientes da extração ácido base.	30
Figura 9: Esquema do fracionamento do EMeF e isolamento de constituintes.	36
Figura 10: Espectro na região do IV de PV1 (KBr).....	38
Figura 11: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) de PV1 em CDCl_3	39
Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (50 MHz) de PV1 em CDCl_3	40
Figura 13: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV2 (KBr).	41
Figura 14: Espectro de RMN de ^1H obtido para PV2 (200 MHz, CDCl_3).....	42
Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV2 (50 MHz, CDCl_3).....	43
Figura 16: Subespectro DEPT-135 obtido para PV2 (50 MHz, CDCl_3).	43
Figura 17: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV3 (KBr).	44
Figura 18: Espectro de RMN de ^1H obtido para PV3 (200 MHz, CDCl_3).....	45
Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV3 (50 MHz, CDCl_3).....	46
Figura 20: Subespectro DEPT-135 obtido para PV3 (50 MHz, CDCl_3).	46
Figura 21: Espectro e ampliações de RMN de ^1H de PV4 (CDCl_3 ; 400 MHz).....	47
Figura 22: Espectro e expansão de RMN de ^{13}C de PV4 (CDCl_3 ; 100 MHz).	48
Figura 23: Subespectro DEPT-135 de PV4 (CDCl_3 , 100 MHz).	48

Figura 24: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV5 (ATR).	49
Figura 25: Espectro de RMN de ^1H obtido para PV5 (400 MHz, CDCl_3).	50
Figura 26: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV5 (100 MHz, CDCl_3).	51
Figura 27: Subespectro DEPT-135 obtido para PV5 (100 MHz, CDCl_3).	51
Figura 28: Cromatograma e espectro de massas de PV5, obtidos por GC-EM.	52
Figura 29: Espectro na região do IV de PV6 (KBr).	53
Figura 30: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PV6 em CDCl_3 + Piridina- d_5	54
Figura 31: Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (400 MHz) de PV6 em CDCl_3 + Piridina- d_5	55
Figura 32: Espectro na região do IV de PV7 (ATR).	56
Figura 33: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) de PV7 em CDCl_3 + Piridina- d_5	57
Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (50 MHz) de PV7 em CDCl_3 + Piridina- d_5	58
Figura 35: Espectro na região do IV de PV8 (ATR).	59
Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) PV8 em CDCl_3 + Piridina- d_5	60
Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C subespectro DEPT-135 (100 MHz) de PV8 em CDCl_3 + Piridina- d_5	61
Figura 38: Espectro na região do IV de PV9 (ATR).	62
Figura 39: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) PV9 em CDCl_3	63
Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (100 MHz) de PV9 em CDCl_3	64
Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) PV10 em CDCl_3 + Piridina- d_5	65
Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) PV10 em CDCl_3 + Piridina- d_5	66
Figura 43: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) PV11 em CDCl_3	67
Figura 44: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PV11 em CDCl_3	68
Figura 45: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de PV11 em CDCl_3	69
Figura 46: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV12 (KBr).	70
Figura 47: Espectro de RMN de ^1H obtido para PV12 (400 MHz, CDCl_3).	71
Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV12 (100 MHz, CDCl_3).	72
Figura 49: Subespectro DEPT-135 obtido para PV12 (100 MHz, CDCl_3).	72

Figura 50: Cromatograma e espectro de massas de PV11, obtidos por GC-EM e possíveis caminhos de fragmentação.	73
Figura 51: Espectro na região do IV de PV13 (KBr).	74
Figura 52: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PV13 em CDCl_3 +Piridina- d_5	75
Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PV13 em CDCl_3 + Piridina- d_5	76
Figura 54: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de PV13 em CDCl_3 + Piridina- d_5	76
Figura 55: Fotos das cromatoplas obtidas por CCD analítica, de PV14. Fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3) em atmosfera de amônia; (a) revelação com solução de vanilina perclórica e (b) reagente de Dragendorff.	77
Figura 56: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV14 (KBr).	78
Figura 57: Espectro de RMN de ^1H obtido para PV14 (50 MHz, CD_3OD).	79
Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV14 (50 MHz, CD_3OD).	79
Figura 59: Subespectro DEPT-135 obtido para PV14 (50 MHz, CD_3OD).	80
Figura 60: Espectro de massas de alta resolução, EM-ESI-IT-TOF, obtido para PV14.	80
Figura 61: Foto de cromatoplas obtida por CCD analítica, da fração AG60 a 64. Fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3) em atmosfera de amônia; revelação com solução de vanilina perclórica.	81
Figura 62: Foto da cromatoplas obtida por CCD preparativa, da amostra AG60 a 64. Fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3) em atmosfera de amônia; revelação luz UV.	81
Figura 63: Foto da cromatoplas obtida por CCD analítica, da fração AG60 a 64 após purificação por CCD preparativa. Fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3) em atmosfera de amônia; revelação com reagente de Dragendorff.	82
Figura 64: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV15 (ATR).	83
Figura 65: Espectro de espectro de massas de alta resolução, EM-ESI-IT-TOF, obtido para PV15.	83
Figura 66: Espectro na região do IV de PV16 (KBr).	84
Figura 67: Espectro de RMN de ^1H obtido para PV16 (400 MHz, CD_3OD).	85
Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (em preto) e subespectro DEPT-135 (em cinza) obtido para PV16 (100 MHz, CD_3OD).	86

Figura 69: Mapa de contornos HSQC (400 MHz) de PV16 em CD ₃ OD.	87
Figura 70: Mapa de contornos HMBC (400 MHz) de PV16 em CD ₃ OD.	88
Figura 71: Mapa de contornos COSY (400 MHz) de PV16 em CD ₃ OD.	89
Figura 72: Mapa de contornos NOESY (400 MHz) de PV16 em CD ₃ OD.	90
Figura 73: Espectro de massas de alta resolução, EM-ESI-IT-TOF, obtido para PV16.	91
Figura 74: Espectro na região do IV de PV17 (KBr).	92
Figura 75: Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) PV17 em CDCl ₃	93
Figura 76: Espectro de RMN de ¹³ C (em cinza) e subespectro DEPT-135 (em preto), 100 MHz, de PV17 em CDCl ₃	94
Figura 77: Estrutura química da triptamina	98
Figura 78: Teste para MIC em <i>B. cereus</i> , à esquerda, e <i>S. aureus</i> , à direita.	99
Figura 79: Teste para MIC em <i>E. coli</i> , à esquerda, e <i>K. oxytoca</i> , à direita.	99
Figura 80: Teste para MIC em <i>K. pneumoniae</i> , bactéria Gram-negativa.	100
Figura 81: Sequência de reações propostas no método de Ellman.	104
Figura 82: Gráfico da porcentagem de inibição do EMeF, DMT e padrões.	109
Figura 83: Gráfico da porcentagem de inibição do EAcf e padrões	110
Figura 84: Gráfico da porcentagem de inibição do ECIF e padrões <i>versus</i> concentração (µg/mL).	110
Figura 85: Gráfico da mortalidade por DCNT no Brasil entre 1996-2007.	111
Figura 86: Foto de um exemplar de <i>Podophyllum peltatum</i> L. (1*) e estruturas químicas da lignana ariltetralínica podofilotoxina (2**), a partir da qual foram obtidos o etoposídeo (3**) e o teniposídeo (4).	113
Figura 87: Foto de um exemplar de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don (1*) e estruturas químicas dos alcaloides, vimblastina (2**) e vincristina (3**).	114
Figura 88: Foto de um exemplar de <i>Taxus brevifolia</i> Nutt (1*) e estrutura química do paclitaxel (2**)	114
Figura 89: Conversão do corante MTT amarelo, para o formazan roxo, pela succinato desidrogenase presente na mitocôndria de células vivas	115
Figura 90: Avaliação da viabilidade de células tumorais, B16F10 (à esquerda) e 4T1 (à direita), após tratamento com EMeF.	118

Figura 91: Avaliação da viabilidade de células normais BHK (à esquerda) e CHO (à direita), após tratamento com EMeF..	118
Figura 92: Avaliação da viabilidade de células tumorais, B16F10 (à esquerda) e 4T1 (à direita), após tratamento com EAcF.....	119
Figura 93: Avaliação da viabilidade de células normais BHK (à esquerda) e CHO (à direita), após tratamento com EAcF..	119
Figura 94: Avaliação da viabilidade de células tumorais, B16F10 (à esquerda) e 4T1 (à direita), após tratamento com DMT	120

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	<i>Attenuated total reflection</i>
BHI	<i>Broth heart infusion</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada de sílica gel
CCDP	Cromatografias em camada delgada preparativa
CEFET-MG	Centro Federal de Ensino Tecnológico de Minas Gerais
CerQBio	Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado
CG	Cromatografia gasosa
CGAR	Cromatografia gasosa de alta resolução
CPAFA	Centro Panamericano de Febre Aftosa
DA	Doença de Alzheimer
DCNT	Doenças crônicas não-transmissíveis
DEPT-135	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135</i>
DL50	Dose letal mediana
DMT	N,N-Dimetiltriptamina
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilhidrazila
DTNB	5,5'-Ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)
EM	Espectrometria de massas
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy</i>

HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>
HTS	<i>High throughput screening</i>
Hz	Hertz
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LAREMAR	Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução
LCMS-ESI-IT-TOF	<i>Liquid chromatograph-mass spectrometry electrospray ionization- ion trap-time of flight mass spectrometry</i>
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
NCCSL	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NEPLAM	Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais
NOESY	<i>Two dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SNC	Sistema nervoso central
TMS	Tetrametilsilano
TNB	5-Tio-2-nitrobenzoato
TRIS-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano cloridrato
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

O estudo fitoquímico dos extratos hexânico, clorofórmico e metanólico das folhas de *Psychotria viridis*, resultou no isolamento de uma mistura de dois triterpenos pentacíclicos, ácido ursólico e ácido oleanólico; três esteroides, o 24-metileno-cicloartan-3 β -ol, e mistura de β -sitosterol e estigmasterol; uma mistura de dois esteroides glicosilados, 3-O- β -D-glicosil- β -estigmasterol e 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol; o triterpeno poli-insaturado esqualeno; dois ésteres de glicerol, o monoacilglicerol monopalmitina e um triacilglicerol; uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa; um aldeído de cadeia longa, o nonacosanal; três ácidos graxos de cadeia longa, o ácido hentriacontanoico, hexadecanoico e heptadenoico; um álcool graxo, o nonacosanol; um éster graxo, o tetradecanoato de metila; um derivado do ácido quínico, o 4-*epi*-metilquinato; e dois alcaloides indólicos, N,N-dimetiltriptamina e N-metiltriptamina. A estrutura química dos compostos isolados foi determinada por métodos espectroscópicos (IV, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , HSQC, HMBC e NOESY) e espectrométricos (CG-EM e LCMS-ESI-IT-TOF).

O estudo da atividade biológica envolveu testes de inibição da acetilcolinesterase, efeito antimicrobiano e citotoxicidade.

Apresentaram inibição da acetilcolinesterase os extrato hexânico (EHxF), clorofórmico (ECIF), em acetato de etila (EAcF), e metanólico (EMeF), as substâncias 24-metileno-cicloartan-3 β -ol, N,N-dimetiltriptamina (DMT) e mistura de 3-O- β -D-glicosil- β -estigmasterol e 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol. Sendo que os ECIF e EAcF apresentaram inibição maior que 90 %. Para a triptamina (precursora do DMT) foi observada atividade contra *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*. O EMeF apresentou atividade antioxidante (expressa como inibição de oxidação do radical) maior que 85 % a partir da concentração 125,00 $\mu\text{g/mL}$. Os EMeF e EAcF foram capazes de induzir a morte e/ou de inibir a proliferação de linhagens de células tumorais, B16F10 e 4T1, sem afetar a viabilidade celular de células normais, CHO e BHK. O DMT também apresentou atividade acentuada para as linhagens tumorais B16F10 e 4T1.

Palavras-chave: Fitoquímica; *Psychotria viridis*; Rubiaceae; alcaloides; N,N-dimetiltriptamina

ABSTRACT

Phytochemical study of the hexane, chloroformic and methanolic extracts from the leaves of *Psychotria viridis* resulted in the isolation of: a mixture of two pentacyclic triterpenes, ursolic and oleanolic acid; three steroids, 24-methylenecycloartanol and a mixture of stigmasterol and β -sitosterol; a mixture of two steroid glucoside, 3-O- β -D-glucosyl- β -sitosterol e 3-O- β -D-glucosyl- β -stigmasterol; the polyunsaturated triterpene, squalene; two esters of glycerol, the monoacylglycerol monopalmitin and a triacylglycerol; a mixture of long chain hydrocarbons; an aldehyde, nonacosanal; three long chain fat acids, the hentriacontanoic, hexadecanoic and heptadenoic acids; a methyl ester, methyl heptadecanoate; a quinic acid derivate, the methyl 4-*epi*-quinate and two indole alkaloids, N,N-dimethyltryptamine and N-methyltryptamine. The chemical structures were determined by spectroscopic (IR, ^1H and ^{13}C NMR, HSQC, HMBC and NOESY) and spectrometric (CG-EM e LCMS-ESI-IT-TOF) methods.

The study of the biological activity consisted of activity of the capacity to inhibit acetylcholinesterase, antimicrobial activity and evaluation of citotoxic activity. The hexane, chloroformic, ethyl acetate and methanolic extracts, the substances 24-methylenecycloartanol, N,N-dimethyltryptamine (DMT) and a mixture of 3-O- β -D-glucosyl- β -sitosterol e 3-O- β -D-glucosyl- β -stigmasterol showed cholinesterase inhibiting activity. Wherein the chloroformic and ethyl acetate extracts showed cholinesterase inhibiting activity higher than 90%.

Tryptamine (DMT precursors) was active against *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*. The methanolic extract showed antioxidant activity (oxygen radical scavenging capacity) higher than 85%, at concentration above 125,00 $\mu\text{g/mL}$.

The methanolic and ethyl acetate extracts were able to inhibit the growth and/or induce the death of the tumoral cell strains B16F10 and 4T1, without damaging of the integrity of the normal cell strain BHK and CHO. The DMT also demonstrated a pronounced activity against tumoral cell strains B16F10 and 4T1.

Keywords: Phytochemistry; *Psychotria viridis*; Rubiaceae; alkaloids; N,N-dimethyltryptamine.

INTRODUÇÃO

Plantas medicinais, uso popular e ritualístico

A utilização de plantas com fim terapêutico, principalmente para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (PINTO *et al.*, 2005). Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), plantas medicinais são todas aquelas, silvestres ou cultivadas, que são utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico, ou como fonte de fármacos e de seus precursores (ARIAS, 1999).

A OMS considera as plantas medicinais como importantes instrumentos da assistência farmacêutica e, por meio de vários comunicados e resoluções, expressa sua posição a respeito da necessidade de valorizar a sua utilização no âmbito sanitário, visto que medicamentos à base de plantas são amplamente utilizados em países em desenvolvimento (WHO, 1993). Estima-se que 70 a 90 % da população desses países dependam de plantas medicinais no que se refere à Atenção Primária à Saúde, onde constituem a alternativa mais prontamente disponível (WHO, 2011).

No Brasil, a utilização de ervas medicinais tem na prática indígena suas bases, que influenciada pela cultura africana e portuguesa, gerou uma vasto conhecimento popular (ALVES E SILVA, 2003). Apesar de a flora brasileira possuir uma grande diversidade genética vegetal, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (NODARI E GUERRA, 1999), no país ainda são consideradas raras as pesquisas envolvendo o grau de utilização de plantas como medicamentos e sua inserção na cultura popular (VEIGA, 2008).

Muitas plantas medicinais de uso popular são, também, utilizadas em rituais religiosos. Essa é uma prática comum resultante da forte influência cultural dos indígenas locais miscigenadas as tradições africanas, oriundas de três séculos de tráfico escravo e da cultura europeia trazida pelos colonizadores (ALMEIDA, 2003).

As plantas ritualísticas tornam-se sagradas quando a sua utilização em rituais confere a elas um valor sagrado, que será legitimado através de ritos próprios de um

dado modelo de crença, filosofia ou pensamento (CAMARGO, 2007). São plantas que combatem o cansaço e a insônia, que aliviam a sensação de fome, que estimulam ou anulam o apetite sexual, que provocam depressão e euforia, que proporcionam visões e previsões. São utilizadas pela via oral ingeridas de forma *in natura* ou preparadas; pela via respiratória por meio da inalação de suas fumaças, ou cheiradas; ou por via tópica onde são aplicadas sobre a pele sã ou escarificada. Em função disso, diferentes tipos plantas ou produtos dela têm sido popularizados em ambientes religiosos ou não, em todo o mundo (CAMARGO, 2007).

Existem estudos científicos que comprovam as propriedades farmacológicas de algumas dessas plantas e dão sentido às utilizações ritualísticas. Em geral, a atividade dessas substâncias se confunde com o misticismo religioso dos índios e a sabedoria dos curandeiros, xamãs e pajés, os quais, normalmente, desempenham papel tanto de guia religioso, quanto de médico em sua tribo. Dessa forma, é difícil a distinção entre as ações farmacológicas desses preparados e seus efeitos placebo nas curas fenomenológicas, que ocorrem nos rituais (CALLAWAY *et al.*, 1994; CALLAWAY, 1988).

Entre as plantas que já têm estudos que relacionam as propriedades medicinais ao seu significado místico pode-se citar a *Erythrina verna* (mulungu), utilizada em rituais fúnebres, essa apresenta comprovados efeitos sedativos, causando entorpecimento e bradicardia. A *Melissa officinalis* (erva-cidreira), utilizada em banhos de descarrego e alívio, apresenta efeitos analgésico e tranquilizante, além de provocar uma diminuição da insônia e da ansiedade (CAMARGO, 1998; CORRÊA *et al.*, 1998).

Entre as plantas sagradas, conhecida por seus “poderes mágicos” está a *Petiveria alliacea* L. de nome vulgar “Amansa-senhor”. A planta era dada, pelos negros do período escravista, aos seus senhores, visando proteger as mulheres negras do assédio desses. Os senhores de escravos eram acometidos de perturbações mentais quando, secretamente lhes eram ministradas doses parceladas da planta por tempo prolongado, em rituais de quebranto (estado mórbido atribuído pela credence popular ao mau-olhado) (CAMARGO, 2007). O quadro clínico, do processo de envenenamento pela planta, é lento e evolui para “indiferença, imbecilidade, fraqueza cerebral, pequenas convulsões e posteriormente espasmos, mudez por paralisia da laringe e morte no final de um ano, dependendo da dose” (PECKOLT E PECKOLT *apud*

CAMARGO, 2007). Esse quadro é atribuído principalmente à atividade hipoglicemiante induzida pela planta, em função da existência nas folhas e caule de pinitol (3-O-metil-quirositol) (Figura 1), composto com propriedade hipoglicemiante, de efeito semelhante ao da insulina (BATES *et al.*, 2000). A hipoglicemia priva o cérebro de glicose e, por período prolongado, causa lesão irreversível neste órgão, com sequelas tais como retardo mental, ataxia, incontinência, afasia, parkinsonismo, epilepsia, coma e morte (GOODMAN E GILMAN, 2005).

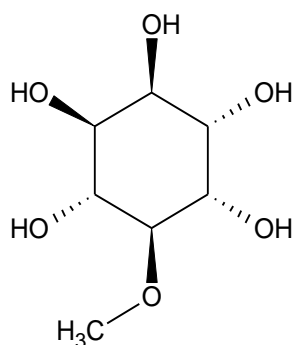


Figura 1: Estrutura química do pinitol.

O preparo de associações de plantas, consideradas mágicas, capazes de induzir efeitos surpreendentes, é uma prática a qual não se deve exclusivamente aos negros, conhecidos como grandes detentores do conhecimento de plantas tóxicas (CAMARGO, 2007). Há séculos, os índios da etnia Ticuna da Amazônia empregam misturas sagradas contendo cascas de *Strychnos castelnaei* Wedd., folhas de *Dieffenbachia seguine* Scho. e *Chondrodendron tomentosum*, algumas espécies da família Piperaceae e, também, de Minespermaceae, na preparação do curare, veneno utilizado nas pontas de flechas para abater animais de caça (CAMARGO, 2007). As substâncias presentes no curare serviu de inspiração para os pesquisadores desenvolverem os bloqueadores ganglionares representados entre outros pelo hexametônio (BARREIRO, 2001). As estruturas químicas de algumas substâncias presentes no curare, bem como a do hexametônio, estão representadas da Figura 2, pág. 4.

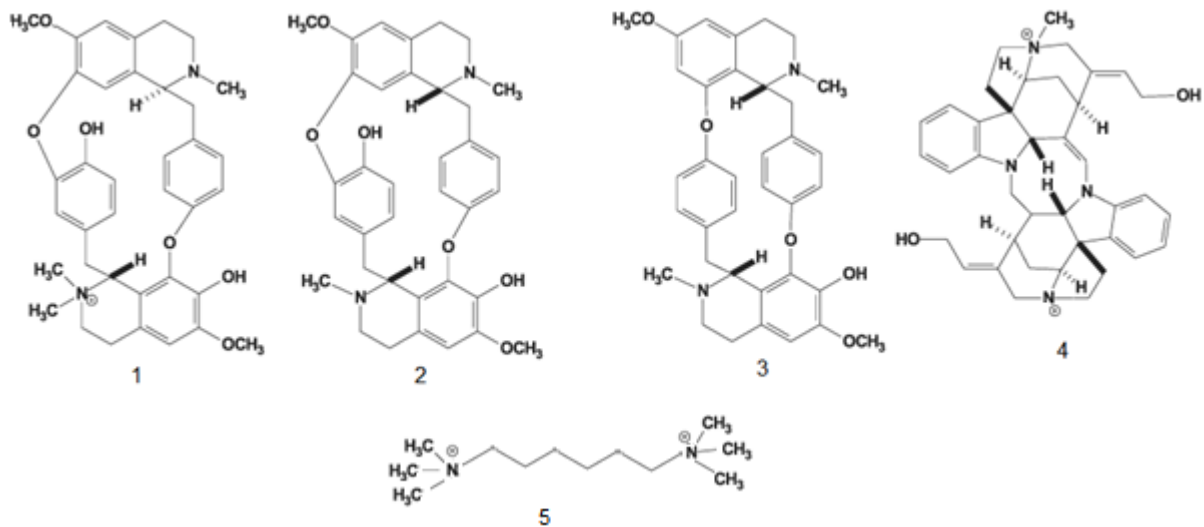


Figura 2: Estrutura química da (+)-tubocurarina (1), (-)-curina (2) e isochoindrone (3), obtidas do curare do gênero *Chondrodendron*; da toxiferina-C (4), isolada do curare do gênero *Strychnos* e do hexametônio (5).

Fonte: adaptado de VIEGAS *et al.*, 2006.

Contudo, a maior parte das plantas ritualísticas utilizadas nas práticas de cerimônias de cura, frequentes entre descendentes de africanos e índios, sejam elas o xamanismo, o trabalho de ponto ou rituais de umbanda; são plantas que, atuam no SNC, utilizadas para facilitar a comunicação com guias espirituais (CAMARGO, 2006). Portanto, as plantas classificadas como alucinógenos, são as mais utilizadas em função da existência de um cunho religioso marcante expresso em rituais.

Geralmente, dois níveis de saber estão envolvidos no uso desses vegetais, sendo esses o conhecimento do seu preparo correto e a capacidade de dominar seus efeitos alucinógenos, de modo a canalizá-los para percepções que façam sentido dentro do contexto religioso e social do grupo (MELATTI, 2007).

No Brasil, entre as populações tradicionais, é raro observar o uso dessas plantas psicoativas, aquelas que alteram alguns aspectos da mente, incluindo o comportamento, humor, ansiedade, cognição e bem-estar (BERTOLOTE E GIROLAMO, 1993). Já entre os quilombolas e as etnias indígenas, esses usos são mais recorrentes (RODRIGUES E CARLINI, 2003).

Por meio de estudos relacionados aos possíveis efeitos sobre o SNC induzidos por plantas utilizadas por duas etnias brasileiras, índios Krahô (estado do Tocantins) e quilombolas (Quilombo Mata-Cavalos, no estado do Mato Grosso) foram estabelecidos correlações entre seus usos e os efeitos/ações demonstrados pela ciência (RODRIGUES E CARLINI, 2003) (Tabela 1).

Tabela 1: Estudos encontrados na literatura científica para cinco das 169 espécies citadas pelos quilombolas da Sesmaria Mata-Cavalos* e pelos índios Krahô**, com provável ação sobre o SNC

Nome científico (família)	Usos relacionados pelos quilombolas* e Krahô**	Efeito/ação descrito nos estudos
<i>Cybistax antisyphilitica</i> (Mart.) Mart. Ex DC. (Bignoniaceae)	Dor de cabeça*	Analgésico
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Staf (Poaceae)	Calmante*	Ansiolítico
<i>Heteropteris aphrodisiaca</i> O. Mach. (Malpighiaceae)	Rejuvenescedor*	Antioxidante Melhora da Memória
<i>Petiveria alliacea</i> L. (Phytolaccaceae)	Altera a mente*	Depressor do SNC
<i>Cochlospermum regium</i> (Mart.) Pilger (Cochlospermaceae)	Dor de cabeça**	Antinociceptivo

Fonte: Adaptado de RODRIGUES E CARLINI, 2003, p. 153.

Reconhecendo que produtos naturais são excelentes fontes de compostos com estruturas químicas complexas que podem apresentar atividade biológica, vários estudos têm sido conduzidos a fim de descobrir novos alvos farmacológicos no SNC. Cita-se como exemplo a harmina, um alcaloide β -carbonílico. Este se encontra presente

na casca e folha de *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae), um dos componentes utilizados na preparação da bebida ritualística ayahuasca (yagé, hoasca, daime ou caapi) utilizada em rituais religiosos no Brasil, Bolívia, Equador e Peru (CALLAWAY *et al.*, 1998). Em estudos recentes foi demonstrado que o alcaloide atua sobre o SNC, inibindo a monoamino-oxidase (MAO) (PIRES *et al.*, 2010), enzima responsável por metabolizar as monoaminas endógenas (BREAKEYFIELD *et al.*, 1976). Assim, inibidores da MAO (IMAO) levam ao aumento dos depósitos de aminas, principalmente da dopamina, noradrenalina e serotonina no cérebro. A consequência deste efeito inibitório é um estado de excitação, euforia, aumento da atividade psicomotora (efeito antidepressivo), entre outros (FARZIN E MANSOURI, 2006).

Contudo, o alcaloide apresenta, também, efeito alucinógeno atribuído à similaridade estrutural com aminas endógenas, como a triptamina e serotonina, e a ligação a seus receptores (FORTUNATO, 2009).

Exemplos de outras plantas ritualísticas, que alteram o funcionamento do SNC, incluem a *Lophophora williamsii* (Lem. ex Salm-Dyck J.M. Coult.) (Peiote) utilizada no México e na América Central, a *Mimosa hostilis* Benth (Jurema), no nordeste brasileiro, a *Tabernanthe iboga* Baill (Iboga) na África e a *Peganum harmala* L. (Pégano) no Oriente médio (TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Assim, a rica herança de plantas para a medicina é bem conhecida, têm-se por exemplo o analgésico morfina, obtido da *Papaver somniferum*; o antimalárico quinina, obtido da *Cinchona sp*; o fármaco anticolinérgico atropina, obtido da *Atropa belladonna*; o bloqueador neuromuscular tubocurarina obtido da *Chondodendron tomentosum* (SOUSA, 2012). Sendo alguns desses citados ainda úteis como agentes terapêuticos.

Apesar da riqueza das plantas alucinógenas, poucas são utilizadas para tratar doenças mentais. Não há exemplos de plantas utilizadas como antipsicóticas ou antimaniacas ou aceitas como medicamentos psicoativos úteis (RODRIGUES E CARLINI, 2006). E esta é uma triste realidade, pois é senso comum que o futuro da psiquiatria está cada vez mais relacionado com a descoberta de novos psicofármacos (CATALDO NETO *et al.*, 2003), e tratamentos psiquiátricos com fármacos sintéticos estão longe de ser satisfatórios. Os agentes psicoterapêuticos atualmente disponíveis não são totalmente eficazes no tratamento dos sintomas das diferentes doenças

mentais. Eles podem levar muito tempo para começar a surtir efeitos benéficos e, em muitos casos induzem reações adversas graves (RODRIGUES E CARLINI, 2006). No entanto, o potencial para a descoberta de novos psicofármacos a partir de produtos naturais é enorme. Uma vez que, metabólitos secundários são elaborados dentro de sistemas vivos, e alguns deles possuem maior afinidade por receptores biológicos do que compostos sintetizados aleatoriamente, eles são considerados como bons protótipos para o desenvolvimento de futuros medicamentos (CHIN *et al.*, 2006).

Apesar da riqueza da biodiversidade brasileira, até o momento, não foram desenvolvidos fitoterápicos destinados a tratamentos psiquiátricos (RODRIGUES E CARLINI, 2006). Portanto, a exploração da diversidade química dos produtos naturais presentes na flora brasileira, visando à obtenção de novos medicamentos, é promissora. Neste contexto, destacam-se as diferentes espécies nativas da família Rubiaceae.

Portanto, a exploração da diversidade química dos produtos naturais na busca de novos medicamentos pode trazer bons resultados.

A família Rubiaceae

Entre as espécies de plantas com potencial propriedade medicinal, encontram-se vários membros da família Rubiaceae. Nas últimas décadas, tem aumentado o interesse no estudo de espécies dessa família em função do elevado número de substâncias com potencial atividade biológica, entre elas compostos pertencentes a diferentes classes químicas, como alcaloides e antraquinonas (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006).

A família Rubiaceae Juss. foi descrita pela primeira vez em 1789 por Antoine Laurent de Jussie, sendo considerada como a quarta família em número de espécies entre as Angiospermas encontradas no Neotrópico e em outras partes do Mundo. A grande diversidade de espécies com representantes na maioria dos biomas tornam esta família um dos mais importantes componentes da vegetação tropical (DELPRETE E JARDIM, 2012). Com aproximadamente 650 gêneros e cerca de 13000 espécies

(GOVAERTS et al., 2007), família Rubiaceae é constituída por quatro subfamílias: *Ixoroideae*, *Rubioideae*, *Cinchonoideae* Raf. e *Antirheoideae* Raf. (LIMA, 2011).

Na América do Sul, encontram-se 30 % do total das espécies da família Rubiaceae, o que supera em número de espécies, todas as regiões da Terra, estando, em seguida na região sul da Ásia e África. No Brasil, as rubiáceas são representadas por aproximadamente 2.000 espécies distribuídas em 110 gêneros (DELPRETE, 2004), sendo encontradas nos principais ecossistemas brasileiros, como Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, sob a forma de árvores, arbustos, subarbustos ou ervas perenes ou anuais, além de lianas e epífitas (LIMA, 2011).

As espécies desta família apresentam grande diversidade de metabólitos secundários, como alcaloides indólicos, taninos, triterpenos, saponinas, esteroides e flavonoides (LIMA, 2011) e, portanto, são amplamente utilizadas na medicina popular e na fabricação de fitoterápicos. Um exemplo é a unha de gato, fitoterápico formulado à base da raiz de *Uncaria tomentosa* e indicado no tratamento de reumatismo e artrite (MORAES, 2013).

Na família Rubiaceae a subfamília Rubioideae possui a segunda maior concentração de alcaloides (DELPRETE, 2004) pertencentes a mais de dez classes diferentes, destacando-se os isoquinolínicos, com 44 substâncias elucidadas, os quinolínicos, com 70 alcaloides e os indólicos, com 391 compostos isolados (CORDELL et al., 2001). As espécies desta subfamília estão distribuídas em 15 tribos, sendo a maior delas a Psychotrieae, formada por aproximadamente 50 gêneros, com espécies amplamente distribuídas em toda a zona tropical (LIBOT et al., 1987).

O gênero *Psychotria*

O gênero *Psychotria*, pertencente à família Rubiaceae, foi descrito por Linneaus em 1759, como um dos maiores gêneros de plantas com flores. Nele estão incluídas cerca de 1000 espécies (STEYERMARK, 1974), a maioria de hábito arbustivo; embora árvores, ervas, lianas e epífitas também sejam conhecidas (NEPOKROEFF et al., 1999).

De acordo com características morfológicas e distribuição geográfica, o gênero é dividido em três subgêneros: *Psychotria* (pantropical), *Heteropsychotria* (inclui as

espécies de *Psychotria* neotropicais) e *Tetramerae* (inclui espécies da África e Madagascar) (FARIA, 2009).

Em função das poucas características morfológicas diferenciadoras, o gênero *Psychotria* é de taxonomia complexa. Em função disso, alcaloides indólicos são considerados como marcadores químicos, importantes para os estudos quimiotaxonômicos de espécies desse gênero (PORTO *et al.* 2009).

Pesquisas etnofarmacológicas têm mostrando que plantas do gênero *Psychotria* são utilizadas, na medicina tradicional, para uma grande variedade de indicações terapêuticas (LIMA, 2011). Os mais frequentes usos internos estão relacionados ao tratamento de afecções do aparelho reprodutor feminino, como auxiliar de sintomas do pré- e pós-parto, a doenças dos brônquios e distúrbios gastrointestinais. Quanto ao uso externo, é relatada a sua utilização para tratar afecções cutâneas, "tumores", úlceras, distúrbios oculares, no tratamento de febre e em casos de dores de cabeça e dores de ouvido, na forma de cataplasmas ou banhos (FARIA, 2009).

De várias espécies de *Psychotria* são obtidos materiais bioativos, como por exemplo, extratos de *P. microlabastra* (KHAN *et al.*, 2001) e *P. capensis* que apresentaram atividade antibiótica, de *P. serpens* que tem propriedades antivirais, de *P. Hawaiiensis* (LOCHER *et al.*, 1995) e extratos de *P. insularum* aos quais foram atribuídas atividades antiviral, antifúngica e anti-inflamatória (DUNSTAN *et al.*, 1997).

A espécie *Psychotria viridis*

Psychotria viridis (Figura 3, pág. 11) é uma espécie utilizada no preparo da bebida ayahuasca, em associação com *Banisteriopsis caapi* Morton (CALLAWAY E GROB, 1998). A bebida foi, inicialmente, utilizada por grupos indígenas associados ao xamanismo e por curandeiros vegetalista que praticavam a medicina popular à base de extratos vegetais (LUNA, 1986).

A N,N-dimetiltriptamina (DMT), substância presente no chá, é substância proscrita, cujo uso está proibido no Brasil, considerada psicotrópica, pela Portaria SVS/MS nº 344/1998. Esta Portaria define que as substâncias listadas como

psicotrópicos são substâncias que podem determinar dependência física ou psíquica (GARRIDO E SABINO, 2009).

Em agosto de 2006, foi sancionada no Brasil a lei 11.343, que permite o uso “ritualístico-religioso”, desde que autorizado pelo Estado, de “substâncias psicotrópicas”, com base na Convenção de Viena, das Nações Unidas, sobre Substâncias Psicotrópicas, em 1971 (GROISMAN, 2013). A liberação da pesquisa científica e uso ritualístico da Ayahuasca é regulamentada pela resolução nº 1/2010 do Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas (GARRIDO E SABINO, 2009).

A espécie *P. viridis* é popularmente conhecida como chacrona ou chacruna e é morfologicamente, similar à outras espécies do gênero (BLACKLEDGE E TAYLOR, 2003).

P. viridis foi primeiramente descrita por Ruiz & Pavón em 1779 (ARANHA *et al.*, 1991). É representada por arbustos e cresce naturalmente em áreas florestais planas e úmidas de Cuba, região norte da América Central até a região central da América do Sul. Ocorre mais comumente na Amazônia peruana e boliviana (BLACKLEDGE E TAYLOR, 2003). É classificada da seguinte forma (FARIA, 2009):

Taxonomia:

- Reino Plantae
- Superdivisão Spermatophyta
- Divisão Magnoliophyta
- Classe Magnoliopsida
- Subclasse Asteridae
- Ordem Rubiales
- Família Rubiaceae
- Gênero *Psychotria*
- Espécie *P. viridis*



Figura 3: Fotos de um exemplar de *Psychotria viridis*.

OBJETIVO

Objetivo do trabalho

Estudar fitoquimicamente a espécie *Psychotria viridis* visando identificar novos metabólitos bioativos que contribuam para o estudo quimiotaxonômico e para o conhecimento químico e biológico dessa espécie.

Neste contexto, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- realização do estudo fitoquímico de folhas de *Psychotria viridis*, visando o isolamento, a elucidação estrutural e a identificação dos metabólitos secundários presentes nas suas folhas;
- confirmação estrutural dos metabólitos secundários isolados, utilizando métodos espectroscópicos;
- estabelecimento de relações fitoquímicas entre espécies da família Rubiaceae e contribuição para o estudo quimiotaxonômico; e
- avaliação do potencial biológico da espécie através da realização de estudos de atividade biológica de extratos e das substâncias isoladas.

1 – ESTUDO FITOQUÍMICO

1.1 – Parte experimental

1.1.1 – Métodos gerais

As cromatografias em coluna (CC) foram feitas utilizando-se sílica gel 60 (70-230 Mesh), em colunas de vidro cujo diâmetro e altura variaram conforme a massa das amostras. Os solventes empregados nas análises cromatográficas foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. A reutilização desses solventes, quando em mistura e para a mesma coluna, foi realizada após correção das proporções das misturas utilizando refratômetro modelo Biorbrix. O acompanhamento das colunas foi feito através de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se sílica gel.

Para as cromatografias em camada delgada (CCD) e camada delgada preparativa (CCDP) empregou-se placas de vidro e placas de alumínio Merck sílica gel 60 F₂₅₄. As placas de vidro para CCD e CCDP foram confeccionadas com camada de sílica gel G 60 (7 g suspensas em 15 mL de água), com espessura de 0,25 mm (CCD) ou de 0,50 mm (CCDP). Após secagem parcial à temperatura ambiente, as placas foram ativadas em estufa a 100 °C durante prazo mínimo de 30 minutos.

Nesse trabalho, foi adotado como primeiro critério de pureza, a presença de uma única mancha observada em CCD analítica, usando-se diferentes sistemas de eluição e reveladores.

Como agentes reveladores para CCD e CCDP foram empregados:

- Luz UV (254 e 365 nm);
- Solução de vanilina perclórica.

Preparo:

Solução A: solução diluída de vanilina em álcool etílico (1:99).

Solução B: solução de ácido perclórico em água (3:97),

Utiliza-se a mistura de A e B na proporção de 1:1 v/v.

- Reagente de Dragendorff: Utilizado para a detecção de alcaloides e compostos nitrogenados.

Preparo:

Solução A, 0,85g de subnitrato de bismuto, 10 mL de ácido acético glacial, 40 mL de água destilada.

Solução B, 8,0 g de iodeto de potássio, 20 mL de água destilada.

Utiliza-se a mistura de 5 mL das soluções A e B, acrescentando-se 20 mL de ácido acético glacial e 100 mL de água destilada.

Resposta positiva: Coloração alaranjada.

Para revelação das placas por irradiação com luz UV, foi utilizado o aparelho CHROMATO-UVVE da Ultra-Violet Products, Inc.

As faixas de fusão dos compostos isolados foram determinadas em aparelho Microquímica MQAPF-302.

Espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando, para as amostras em estado sólido, pastilhas de KBr [1 % (m/m)], e para as amostras líquidas janelas de NaCl. Os equipamentos usados foram espectrômetro Shimadzu IR-408 do Departamento de Química, UFMG e o espectrômetro modelo Spectrum One Perkin Elmer do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG. O último possui dispositivo ATR permitindo que o espectro seja obtido diretamente da amostra sólida sem a necessidade do uso de pastilha.

Os espectros de RMN de 1D e 2D foram obtidos em espectrômetros Bruker *Avance* DPX-200 e DRX-400 do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química, UFMG. Os solventes deuterados utilizados encontram-se indicados em cada caso. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna e as constantes de acoplamento (J) expressas em Hz.

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-EM) foram realizadas no laboratório de cromatografia do Centro Federal de Ensino Tecnológico de Minas Gerais (CEFET-MG) em cromatógrafo a gás AGILENT 7890A GC FOR 5975 séries MSD, equipado com detector de massas e coluna HP 5MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m). Como gás de arraste foi utilizado hélio, em fluxo de 1,4 mL/min.

As análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Gasosa e

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do Departamento de Química, UFMG. Foi utilizado cromatógrafo líquido, modelo LC-20AD Shimadzu, acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu IT-TOF), híbrido contendo analisadores do tipo ion trap e TOF em sequência (LCMS-ESI-IT-TOF).

1.1.2 – Coleta e identificação do material vegetal

A coleta das folhas, de *P. viridis*, utilizadas para realização do estudo fitoquímico, foi realizada pelo perito da Polícia Federal André Dias Cavalcanti, em julho de 2013, na parte da manhã, no núcleo da União do Vegetal situado no município de Lagoa da Prata, Minas Gerais, situado a 20° 01' 21" de latitude Sul e a 45° 32' 37" de longitude Oeste.

1.1.3 – Preparação dos extratos das folhas de *Psychotria viridis*

O material coletado foi seco em estufa de ventilação forçada, a 40 °C. Após secagem, as folhas foram trituradas em moinho de martelos, obtendo-se 362,4 g de material vegetal pulverizado. Os extratos das folhas pulverizadas foram preparados empregando extração exaustiva por maceração à temperatura ambiente. Foram utilizados hexano, clorofórmio, acetato de etila e finalmente metanol. Após filtração, cada solvente foi removido e recuperado em evaporador rotatório, sendo adotado pressão reduzida para aqueles de maior ponto de ebulição. O esquema de preparação dos extratos está representado na Figura 4, pág. 16. Os extratos foram rotulados utilizando a seguinte nomenclatura: letra E, para extrato; Hx para hexânico; Cl para clorofórmico; Ac para em acetato de etila; Me para metanólico e F para folhas. A título de exemplo, o extrato hexânico das folhas foi identificado como EHxF (Figura 4, pág. 16).

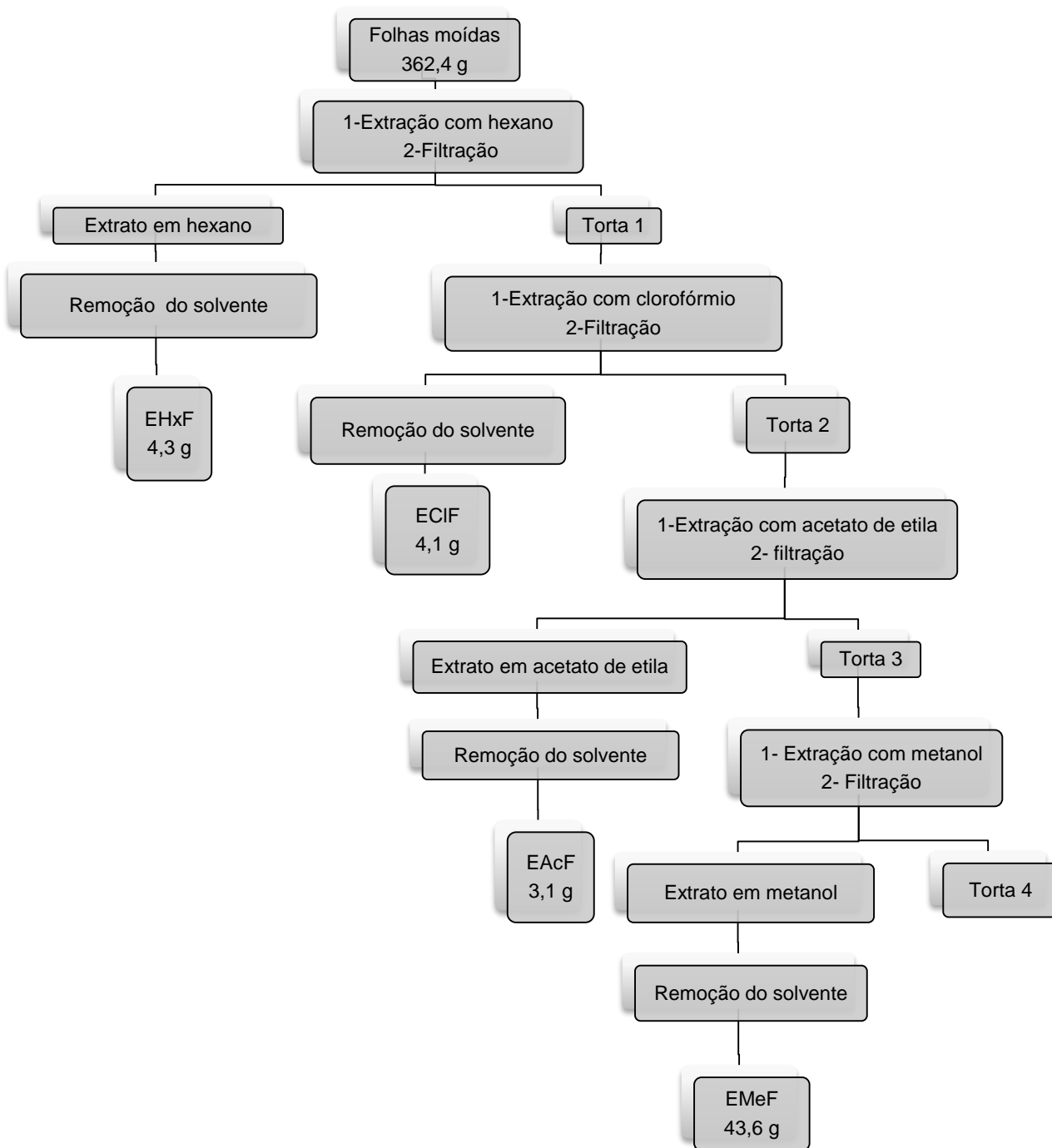


Figura 4: Esquema da obtenção dos extratos de folhas de *P. viridis*.

1.1.4 – Elaboração de EHxF

O extrato hexânico (EHxF) (4,3 g) das folhas de *P. viridis* foi submetido à CC de média pressão, utilizando aparelho Isolera-One, da Biotage™, equipado com coluna SNAP™ 100g, com detector de UV (UV1 254 nm UV2 280 nm) e fluxo da fase móvel de 50 mL/min. Uma vez que a capacidade máxima da coluna é de aproximadamente 3,0 g o extrato foi dividido em duas partes, a primeira parte (2,2 g do extrato) foi submetido à CC denominada Ap1.

Os eluentes utilizados foram hexano e clorofórmio e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 73 frações de volumes variados conforme Tabela 2.

Tabela 2: Frações obtidas da coluna Ap1 e eluentes utilizados

Fração	Eluente	Gradiente de concentração (%)			Volume coletado (mL)
1 a 25	Hexano	100			25
26 a 50	Hexano/Clorofórmio	0,1	A	25	50
56 a 59	Hexano/Clorofórmio	26	A	50	125
60 a 65	Hexano/Clorofórmio	51	A	99	250
66 a 71	Clorofórmio	100			250
72-73	Metanol	100			500

O restante do extrato (2,1 g) foi submetido à segunda CC denominado Ap2, utilizando a mesma coluna e o mesmo fluxo da coluna Ap1.

Os eluentes utilizados foram hexano e clorofórmio e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 84 frações de volumes variados conforme Tabela 3, pág.18. Os volumes e proporções das misturas de solventes foram diferentes dos utilizados na coluna Ap1, pois durante a corrida observou-se que houve perda da resolução da coluna.

Tabela 3: Frações obtidas da coluna Ap2 e eluentes utilizados

Fração	Eluente	Gradiente de concentração (%)			Volume coletado (mL)
1 a 51	Hexano	100			20
52 a 66	Clorofórmio/Hexano	0,1	A	24	50
67 a 76	Clorofórmio/Hexano	25	A	99	250
77 a 82	Clorofórmio	100			250
83 e 84	Metanol	100			300

As frações de ambas as colunas que apresentaram perfis similares, observados através de análise por CCD, foram reunidas formando seis grupos, sendo cada um deles submetidos a processos visando o isolamento de constituintes (Figura 5, pág.19).

As frações das colunas Ap1 e Ap2, bem como das demais colunas, que apresentaram massas muito pequenas ou perfil muito complexo em análise por CCD, não foram trabalhadas.

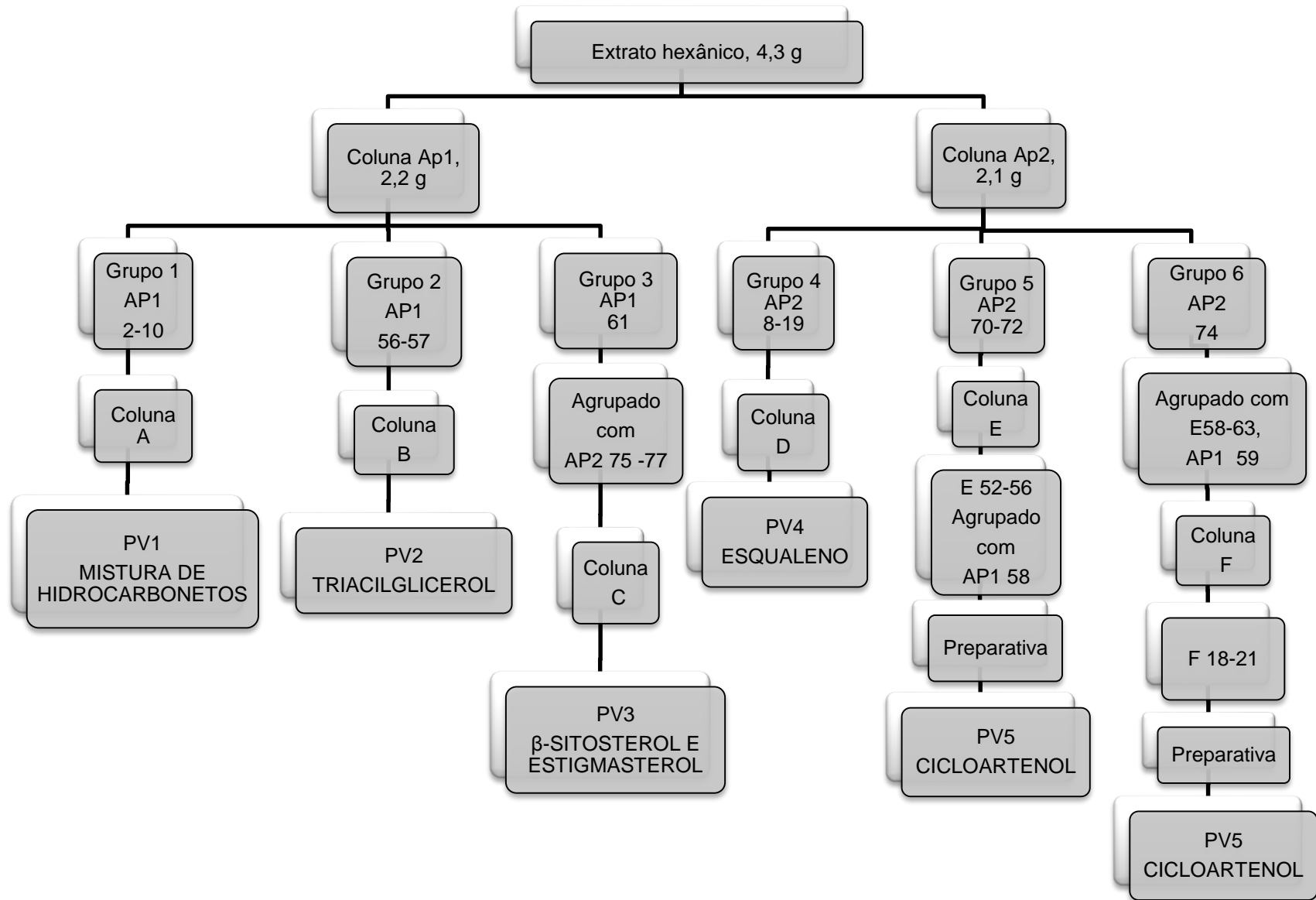


Figura 5: Esquema do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *P. viridis*.

Grupo 1:

Frações Ap1 2 a 10. Para esse grupo (80,1 mg), em CCD, foram observadas quatro manchas com boa separação. O grupo foi submetido à CC (Coluna A). Utilizaram-se 24,1 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 30 frações de aproximadamente 15 mL cada. Após análise por CCD, as frações A1 a 4 (100% hexano) foram reagrupadas levando à obtenção de um sólido branco amorfo (26,8 mg) com faixa de fusão de 58-60 °C. O sólido foi identificado como mistura de hidrocarbonetos (PV1), após análise do espectro no IV, de RMN e cromatograma de CG-MS.

Grupo 2:

Frações Ap1 56 e 57. Para esse grupo (89,2 mg), em CCD, foram observadas cinco manchas sem boa separação. O grupo foi submetido à CC (Coluna B). Utilizaram-se 31,5 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, acetato e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 50 frações de aproximadamente 15 mL cada. Após análise por CCD, as frações B26 a 36 (86% de hexano, 14% de acetato de etila) foram reagrupadas. Foi obtido um sólido ceroso (16,7 mg). Após análise do espectro no IV, de RMN o sólido foi identificado como triacilglicerol (PV2).

Grupo 3:

A fração Ap1 61 apresentou o mesmo perfil cromatográfico das frações AP2 75 a 77 (coluna AP2, Tabela 3, pág. 18) e, portanto, foram agrupadas. Para esse grupo (198,2 mg), em CCD, foram observadas cinco manchas sem boa separação. O grupo foi submetido à CC (Coluna C). Utilizaram-se 60,5 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, acetato e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 90 frações de aproximadamente 15 mL cada. Após análise por CCD, as frações C51 a 55 (88% de hexano, 12% de acetato de etila) foram reagrupadas. Foi obtido um sólido amarelado amorfo impuro, que após lavagem com acetona apresentou-se como sólido cristalino (20,6 mg), com somente uma mancha em

CCD com faixa de fusão de 136-140 °C. Após análise do espectro no IV, de RMN o sólido foi identificado como mistura de β -sitosterol e estigmasterol (PV3).

Grupo 4:

Frações AP2 8 a 19. Para esse grupo (801,2 mg), em CCD, foram observadas cinco manchas sem boa separação. O grupo foi submetido à CC (Coluna D). Utilizaram-se 70,5 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, acetato e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 102 frações de aproximadamente 15 mL cada. Após análise por CCD, as frações D22 a 41 (93% de hexano, 7% de acetato de etila) foram reagrupadas. Foi obtido um líquido incolor (4,2 mg). Após análise do espectro no IV, de RMN o líquido foi identificado como esqualeno (PV4).

Grupo 5:

Frações AP2 70 a 72. Para esse grupo (183,1 mg), em CCD, foram observadas três manchas com boa separação. O grupo foi submetido à CC (Coluna E). Utilizaram-se 41,5 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, acetato e metanol puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 83 frações de aproximadamente 15 mL cada. Após análise por CCD, as frações E52 a 56 (97% de hexano, 3% de acetato de etila) foram agrupadas.

Esse subgrupo apresentou mesmo perfil cromatográfico que a fração Ap1 58 (Coluna Ap1, Tabela 2, pág. 17) e, portanto, foram agrupados. Após análise por CCD, foi possível observar duas manchas em CCD com boa separação. Fez-se CCD preparativa na tentativa de separar as substâncias. Foi obtido um sólido amorfo (6,1 mg) com faixa de fusão de 119-120 °C. Após análise do espectro no IV, de RMN o sólido foi identificado como 24-metileno-cicloartan-3 β -ol (PV5).

Grupo 6:

A fração AP2 74 apresentou mesmo perfil cromatográfico das frações E58 a 63 (coluna E) e Ap1 59 (coluna Ap1) e, portanto, foram agrupadas. Para este grupo (88,1 mg), em CCD, foram observadas três manchas com boa separação. O grupo foi submetido à CC (Coluna F). Utilizaram-se 19,5 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os

eluentes foram hexano, acetato e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 56 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações F18 a 21(43,1 mg) foram reagrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em CCD.

Esse subgrupo apresentou duas manchas em CCD com boa separação. Fez-se CCD preparativa na tentativa de separar as substâncias. Foi obtido um sólido amorfo (10,1 mg) com faixa de fusão de 119-120 °C. Após análise por CCD comparativa, a fração foi identificada como 24-metileno-cicloartan-3 β -ol (PV5).

Do extrato hexânico foi possível isolar 5 substâncias, algumas como misturas, conforme está apresentado na Figura 5, pág. 19.

1.1.5 – Elaboração de ECIF

O extrato clorofórmico das folhas de *P. viridis* (ECIF) foi submetido à CC (coluna H) utilizando-se 4,1 g da amostra e 129,3 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes utilizados foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 84 frações de aproximadamente 250 mL cada. Após análise por CCD, algumas frações foram reunidas em grupos (Figura 6, pág.23).

1 – ESTUDO FITOQUÍMICO

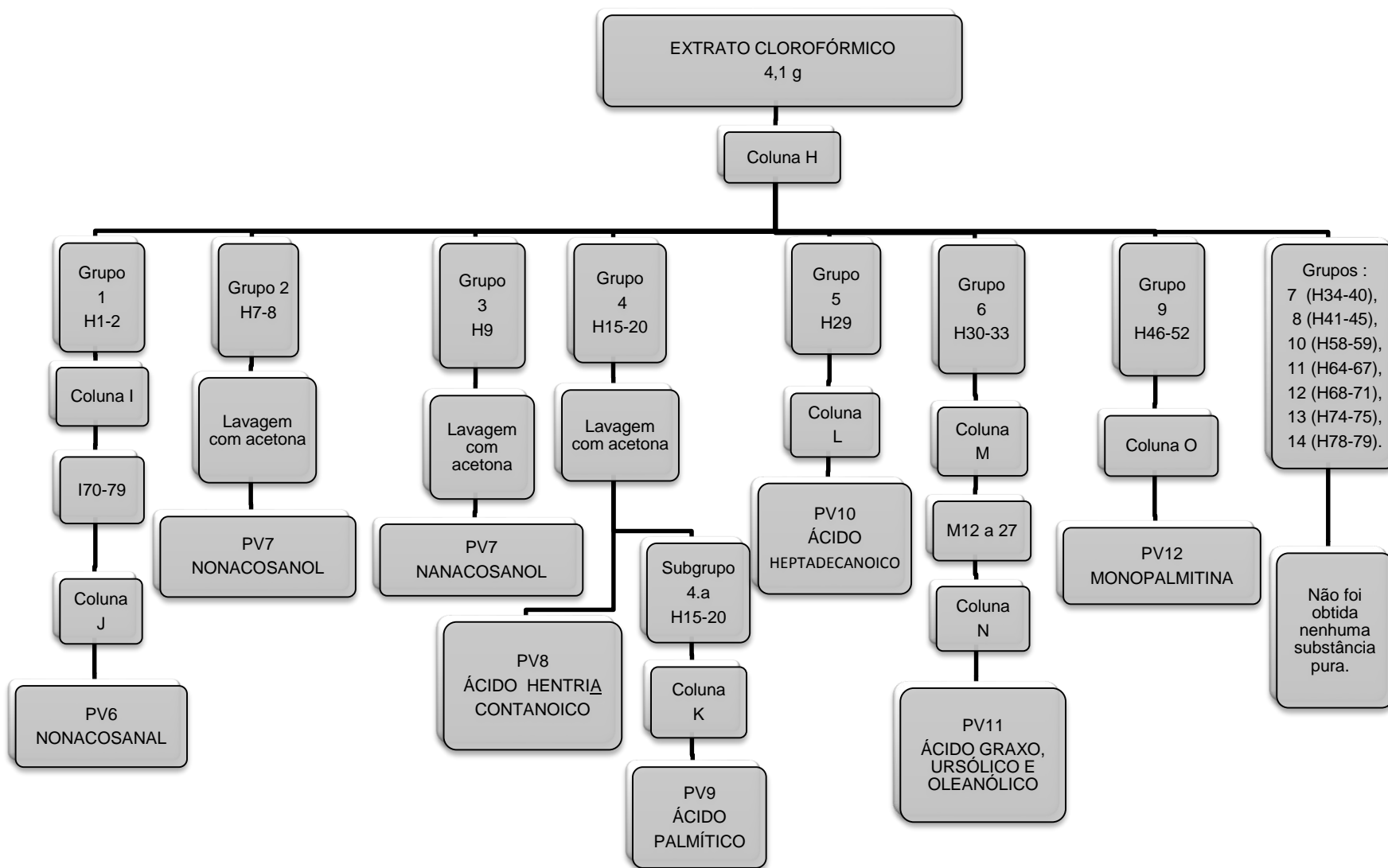


Figura 6: Esquema do fracionamento do ECIF e obtenção das substâncias.

Grupo 1:

Frações H1 e 2. Para esse grupo (400,1 mg), em CCD, foram observadas cinco manchas com boa separação. O grupo foi submetido à CC (Coluna I). Utilizaram-se 64,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 128 frações de aproximadamente 15 mL cada. As frações I70 a I79 (40% Hexano e 60% Clorofórmio) apresentaram perfil cromatográfico semelhante e, portanto, foram reagrupadas. Esse subgrupo (43,1 mg) apresentou três manchas em CCD com valores de Rf muito próximos, com boa separação, e foi submetido à CC (Coluna J). Utilizaram-se 5,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano e clorofórmio, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 43 frações de aproximadamente 15 mL cada. Após análise por CCD, as frações J18 e 19 (75% de hexano e 25% de clorofórmio), apresentaram uma única mancha, demonstrando seu grau de pureza. A amostra foi obtida como um sólido branco amorfo (10,6 mg) com faixa de fusão de 74-76 °C. O sólido foi identificado como o aldeído graxo nonacosanal (PV6) após análise do espectro no IV e de RMN.

Grupo 2:

Frações H7 e 8. Para esse grupo (22,2 mg), em CCD, foram observadas quatro manchas sem boa separação. Foi adicionado acetona nesse grupo e houve precipitação de um sólido branco que foi filtrado. Esse sólido (12,3 mg) apresentou uma única mancha em CCD e faixa de fusão de 82-84 °C. Foram obtidos espectros na região do infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C e o sólido foi identificado como nonacosanol (PV7).

Grupo 3:

Fração H9. Para esse grupo (35,4 mg), em CCD, foram observadas cinco manchas sem boa separação. A adição de acetona levou à precipitação de um sólido branco que foi filtrado. Esse sólido (13,1 mg) apresentou uma única mancha em CCD e faixa de fusão de 79-81 °C. Foram obtidos espectros no infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C e o sólido foi identificado como quantidade adicional de nonacosanol (PV7).

Grupo 4:

Frações H15 a 20. Para esse grupo (115,7 mg), em CCD, foram observadas seis manchas sem boa separação. Ao grupo foi adicionado acetona, houve precipitação de um sólido branco que foi filtrado sob pressão reduzida. Esse sólido (9,0 mg) apresentou uma única mancha em CCD e faixa de fusão de 86-88 °C. Foram obtidos espectros no infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C e o sólido foi identificado como ácido hentriacontanoico (PV8). O filtrado foi recromatografado (subgrupo 4 a).

Subgrupo 4 a:

Filtrado de H15 a 20. Esse subgrupo (100,3 mg) apresentou duas manchas em CCD com valores de R_f muito próximos, sem boa separação, mesmo com a utilização de diferentes misturas de solventes como eluentes. O grupo foi submetido à CC (Coluna K). Utilizaram-se 15,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 65 frações de aproximadamente 15 mL cada. As frações K13 e 14 (90% de hexano, 10% de acetato) demonstraram-se aparentemente puras em análise por CCD. Foi obtido um sólido branco amorfo (3,3 mg) com faixa de fusão de 63-64 °C. Foram obtidos espectros no infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C e o sólido foi identificado como ácido hexadecanoico (palmítico) (PV9).

Grupo 5:

Fração H29. Para esse grupo (39,9 mg), em CCD, foram observadas três manchas com boa separação. O grupo foi submetido à CC (Coluna L). Utilizaram-se 23,9 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 91 frações de aproximadamente 15 mL cada. A fração L13 (80% de hexano, 20% de acetato) demonstrou-se aparentemente pura em análise por CCD. Foi obtido um sólido branco amorfo (7,8 mg) com faixa de fusão de 60-62 °C. Foram obtidos espectros no infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C e o sólido foi identificado como ácido heptadecanoico (PV10).

Grupo 6:

Frações H30 a 33. Para esse grupo (96,1 mg), em CCD, foram observadas três manchas com boa separação. O grupo foi submetido à CC (Coluna M). Utilizaram-se 40,1 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 73 frações de aproximadamente 15 mL cada. Após análise por CCD, as frações M12 a 27 (70% de hexano, 30% de acetato) foram reagrupadas.

Esse subgrupo (30,3 mg) apresentou três manchas em CCD, com valores de Rf muito próximos, sem boa separação, mesmo com a utilização de diferentes misturas de solventes como eluentes. O grupo foi submetido à CC (Coluna N). Utilizaram-se 15,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 21 frações de aproximadamente 15 mL cada.

As frações N6 a 7 demonstraram-se aparentemente puras em análise por CCD, e foram reagrupadas. Foi obtido um sólido branco amorfo (4,5 mg). Após análise do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C a fração foi identificada como mistura de ácido graxo, ácido ursólico e oleanólico (PV11).

Grupo 9:

Frações H46 a 52. Para esse grupo (32,5 mg), em CCD, foram observadas três manchas sem boa separação. O grupo foi submetido à CC (Coluna O). Utilizaram-se 19,6 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 54 frações de aproximadamente 15 mL cada. As frações O30 a 32 (acetato 50%, hexano 50%) demonstraram-se aparentemente puras em análise por CCD. Foi obtido um sólido ceroso (5,5 mg). A fração foi identificada como monopalmitina (PV12), após análise do espectro no IV, RMN e espectrometria de massas.

Os grupos 7 (H34-40), 8 (H41-45), 10 (H58-59), 11 (H64-67), 12 (H68-71), 13 (H74-75) e 14 (H78-79) foram todos recromatografados separadamente, utilizando eluentes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade, foram recolhidas em média 60 frações por coluna. Após

análise por CCD, nenhuma fração, de nenhum dos grupos, mostrou grau de pureza adequado e não foi obtida nenhuma substância pura.

1.1.6 – Elaboração de EMeF

O extrato metanólico das folhas de *Psychotria viridis*, EMeF (43,6 g), foi submetido à duas metodologias de separação.

Primeiramente, 23,5 g do extrato EMeF foram submetidos à extração ácido-base (Figura 7, pág. 29), que é um procedimento padrão para o isolamento de alcaloides (FARIA, 2009). A fração restante do extrato (20,1 g) foi submetida à CC (Coluna U) (Figura 9, pág. 36).

1.1.6.1 Extração ácido-base do EMeF

O extrato EMeF (23,5 g) foi solubilizado em solução aquosa de ácido acético 10% (v/v), mantido sob agitação em banho de gelo por 3 horas, e posteriormente deixado em repouso em geladeira por 24 horas. Após este tempo a solução foi filtrada em funil de Büchner para a separação dos resíduos formados, fornecendo a solução aquosa ácida 1 (pH \approx 1) e a fração insolúvel, que foi filtrada e seca (6,3 g).

A solução aquosa ácida 1 foi submetida à partição, por três vezes, com CHCl₃ fornecendo a solução aquosa ácida 2 e a solução do extrato clorofórmico ácido. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo e obteve-se o extrato clorofórmico ácido seco (ECIAc, 222,0 mg).

A solução aquosa ácida 2 foi neutralizada com NH₄OH (concentrado), fornecendo a solução aquosa neutra (pH \approx 7,5), essa foi submetida à partição, por três vezes, com CHCl₃ fornecendo a solução aquosa neutra 2 e a solução do extrato clorofórmico neutro. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo e obteve-se o extrato clorofórmico neutro seco (ECINt, 284,0 mg).

A solução aquosa neutra 2 teve o pH elevado pela adição de NH₄OH até pH \approx 8,5, sendo denominada de solução aquosa alcalina 1, essa foi submetida à partição, por três vezes, com CHCl₃ fornecendo a solução aquosa alcalina 2 e a solução do

extrato clorofórmico alcalino. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo e obteve-se extrato clorofórmico alcalino seco (ECIAlc, 922,0 mg).

A solução aquosa alcalina 2 foi submetida à partição, por três vezes, com acetato de etila, fornecendo assim a solução do extrato em acetato de etila alcalino. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo e obteve-se o extrato em acetato de etila alcalino seco (EAcAlc, 982,0 mg) e a solução aquosa alcalina 3, que foi desprezada.

Todas as soluções de extratos obtidas, foram lavadas com solução aquosa, saturada, de NaCl, para a quebra da emulsão formada, e seco sob Na_2SO_4 , para remoção de resíduo de água.

Os extratos obtidos da extração ácido-base foram submetidos à purificação por CC e CCDP, conforme mostrado na Figura 8, pág. 30.

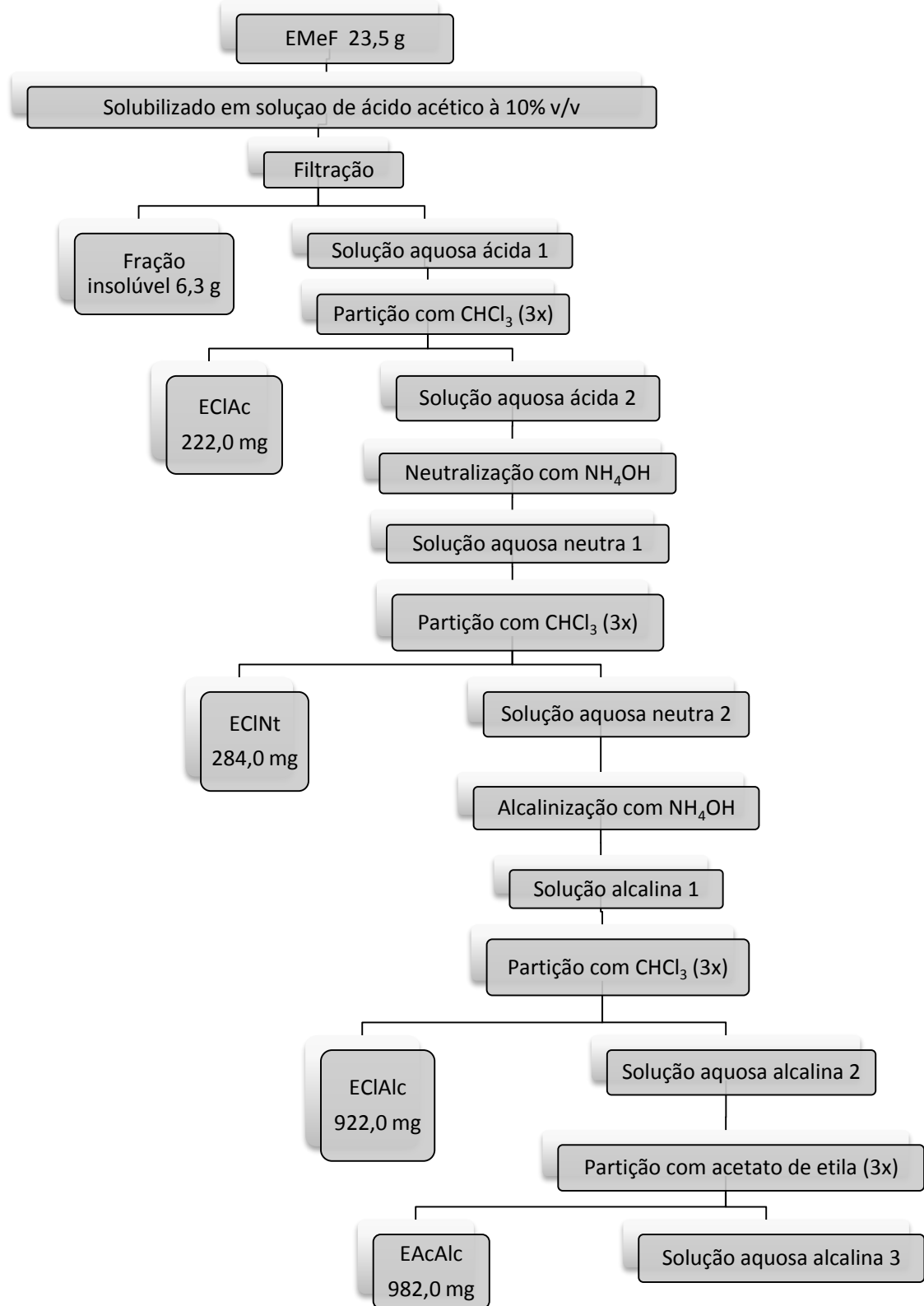


Figura 7: Esquema do fracionamento ácido-base do EMeF das folhas de *P. viridis*

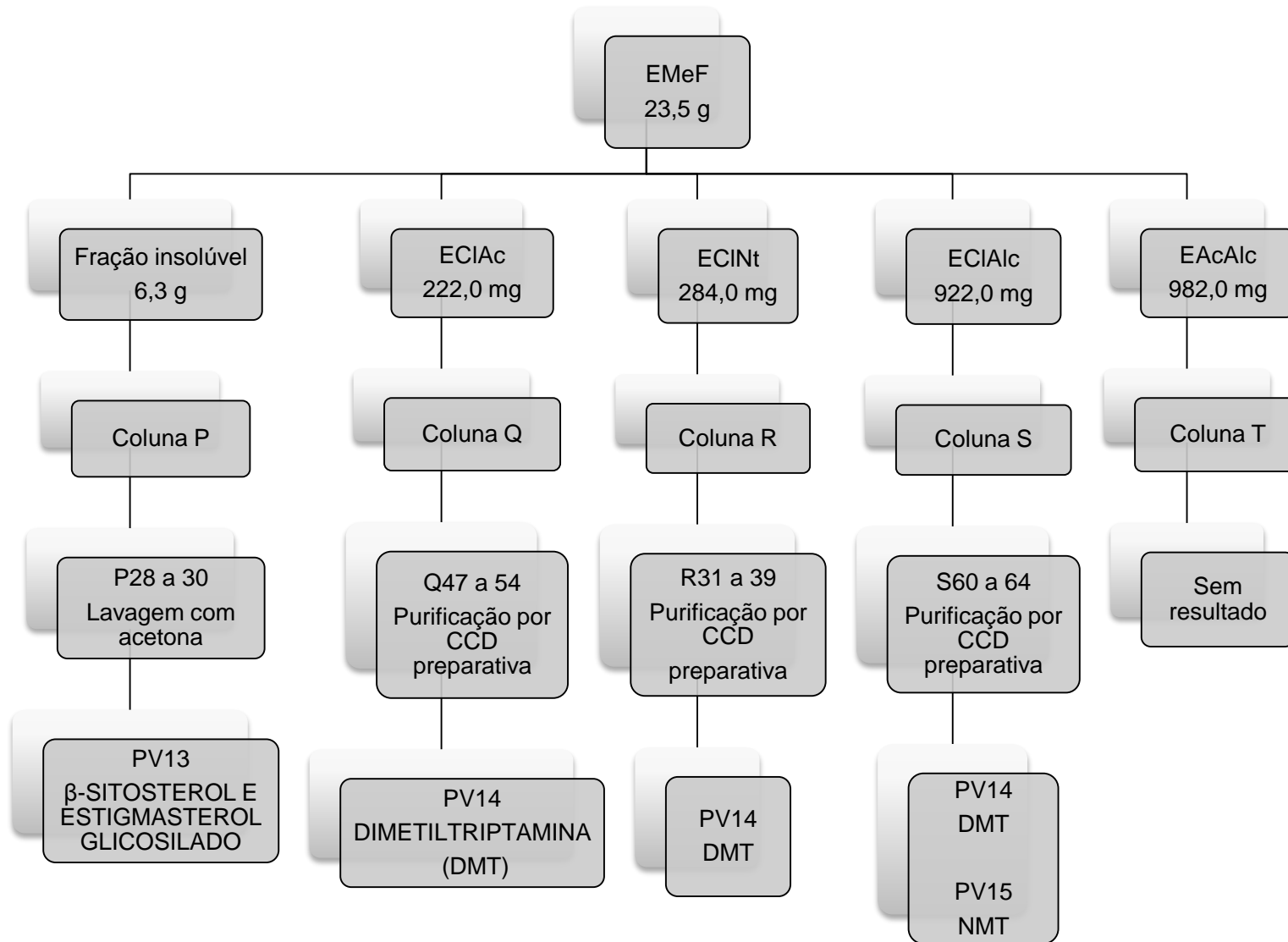


Figura 8: Esquema da obtenção das substâncias dos extratos provenientes da extração ácido base.

1.1.6.1.1 Fração insolúvel

A fração insolúvel (6,3 g) em solução aquosa de ácido acético a 10% v/v, resultante do processo de fracionamento ácido base, foi submetida à CC (Coluna P). Utilizaram-se 226,2 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 155 frações de aproximadamente 15 mL cada. As frações P28 a 30 (70% clorofórmio e 30% metanol) foram obtidas como um sólido amorfo esverdeado, aparentemente impuro em análise por CCD. A mistura foi purificada por lavagem com acetona, obtendo-se um sólido branco amorfo (29,1 mg), aparentemente puro em análise por CCD. Após análise do espectro no IV, de RMN o sólido foi identificado como mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilado (PV13).

1.1.6.1.2 Extrato clorofórmico ácido (ECIAc)

O extrato clorofórmico ácido (222,0 mg) foi submetido à CC (Coluna Q). Utilizaram-se 26,2 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 80 frações de aproximadamente 15 mL cada e uma fração final de 100 mL (Tabela 4, pág. 32). Após análise por CCD, as frações Q47 a 54 foram agrupadas e obteve-se um sólido amorfo castanho, aparentemente impuro em análise por CCD. Este grupo foi purificado por CCD preparativa em sílica gel 60, tendo como fase móvel a mistura $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3) em atmosfera saturada de amônia. A substância de Rf 0,46 foi obtida como um sólido amorfo (10,4 mg), amarelo claro e identificada como N,N-dimetiltriptamina (PV14) após análise por CCD comparativa.

Tabela 4: Frações obtidas da coluna Q e eluentes utilizados

Fração	Eluente (%)		
	CHCl ₃	MeOH	NH ₄ OH
0 a 12	100	0	0
13 a 20	99	1	0
21 a 27	97	2,7	0,3
28 a 40	95,05	4,45	0,5
41 a 47	94	5,5	0,5
48 a 53	93	6	1
54 a 58	89	9,5	1,5
59 a 62	85	13	2
63 a 65	77	20	3
66 a 72	67	30	3
73 a 75	56	40	4
76 a 80	46	50	4
81	36	60	4

1.1.6.1.3 Extrato clorofórmico neutro (ECINt)

O extrato clorofórmico neutro (284,0 mg) foi submetido à CC (Coluna R). Foram utilizados 27,1 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram CHCl₃/CH₃OH/ NH₄OH, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 56 frações de aproximadamente 15 mL cada e uma fração final de 100 mL (Tabela 5, pág. 33). Após análise por CCD, as frações R31 a 39 foram agrupadas, foi obtido um sólido amorfo castanho, aparentemente impuro em análise por CCD. A mistura foi purificada por CCD preparativa em sílica gel 60, tendo como fase móvel a mistura CHCl₃/CH₃OH (97:3) em atmosfera de amônia. Após elaboração o sólido (42,5 mg) foi identificado como N,N-dimetiltriptamina (PV14) após análise do espectro no IV, de RMN e dados de LCMS-ESI-IT-TOF.

Tabela 5: Frações obtidas da coluna R e eluentes utilizados

Fração	Eluente (%)		
	CHCl ₃	MeOH	NH ₄ OH
0 a 7	100	0	0
8 a 14	99	1	0
15 a 17	95	5	0
18 a 20	90	10	0
21 a 23	85	15	0
24 a 26	80	20	0
27 a 29	70	30	0
30 a 32	59	40	1
33 a 35	48	50	2
36 a 38	37	60	3
39 a 41	31	65	4
42 a 52	25	70	5
53 a 56	15	80	5
57	0	95	5

1.1.6.1.4 Extrato clorofórmico alcalino (ECIAIc)

O extrato clorofórmico alcalino (922,0 mg) foi submetido à CC (Coluna S). Foram utilizados 70,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 100 frações de aproximadamente 15 mL cada e uma fração final de 100 mL (Tabela 6, pág. 34). As frações S33 a 59 foram agrupadas, foi obtido um sólido amorfo castanho (170 mg), aparentemente impuro em análise por CCD. O sólido foi identificado como contendo majoritariamente N,N-dimetiltriptamina (PV14) após análise por CCD comparativa.

Foram agrupadas, também, as frações S60 a 64. Esse subgrupo (47,5 mg) foi obtido um sólido amorfo castanho e apresentou duas manchas principais em CCD, com o mesmo perfil de revelação e com boa separação. Fez-se CCD preparativa na tentativa de separar as substâncias em sílica gel 60, tendo como fase móvel a mistura CHCl₃/MeOH (97:3) em atmosfera de amônia. A fração de maior R_f foi obtida como um sólido amorfo amarelo claro (15,7 mg) e identificada, por CCD comparativa, como DMT (PV14). A fração de menor R_f foi obtida como um sólido amorfo castanho

claro (6,5 mg). Após análise do espectro no IV, e dados de LCMS-ESI-IT-TOF fração foi identificada como N-metilriptamina (NMT, PV15).

Tabela 6: Frações obtidas da coluna S e eluentes utilizados

Fração	Eluente (%)		
	CHCl ₃	MeOH	NH ₄ OH
0 a 15	100	0	0
16 a 28	95	5	0
29 a 38	90	10	0
39 a 51	84	15	1
52 a 57	78	20	2
58 a 63	67	30	3
64 a 70	61	35	4
71 a 77	55	40	5
78 a 84	43	50	7
85 a 90	30	60	10
91 a 98	10	80	10
99 a 101	0	100	0

1.1.6.1.5 Extrato em acetato de etila alcalino (ECIAIc)

O extrato em acetato alcalino (982,0 mg) primeiramente apresentou-se como um sólido branco amorfo. Porém, o extrato demonstrou grande instabilidade refletida na sua degradação durante a manipulação. O sólido inicialmente branco, amorfo e solúvel em metanol, tornou-se gradativamente escuro e parcialmente solúvel em metanol, demonstrando uma mistura complexa em análise por CCD.

A fração desse extrato (620,0 mg), solúvel em metanol, foi submetida à CC (Coluna T). Utilizaram-se 52,6 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade.

Obtiveram-se 56 frações de aproximadamente 15 mL cada. Porém, não foi possível isolar nenhuma fração pura desse extrato.

1.1.6.2 – CC do restante do EMeF

O restante do extrato metanólico (20,1 g) das folhas foi submetido à CC (coluna U) (Figura 9, pág. 36). Foram utilizados 129,3 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram clorofórmio, e metanol, puros ou em misturas, com ou sem NH₄OH, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 85 frações de aproximadamente 250 mL cada (Tabela 7). Após análise por CCD, algumas frações foram reunidas em grupos.

Tabela 7: Frações obtidas da coluna U e eluentes utilizados

Fração	Eluente (%)		
	CHCl ₃	MeOH	NH ₄ OH
0 a 9	100	0	0
10 a 13	98	2	0
14 a 17	96	4	0
18 a 21	94	6	0
22 a 26	92	8	0
27 a 33	90	10	0
34 a 40	85	15	0
41 a 50	80	17	3
51 a 56	77	20	3
57 a 60	70	25	5
61 a 63	65	30	5
64 a 67	58	35	7
68 a 71	48	45	7
72 a 75	38	55	7
76 a 79	28	65	7
80 a 84	18	75	7
85	0	95	5

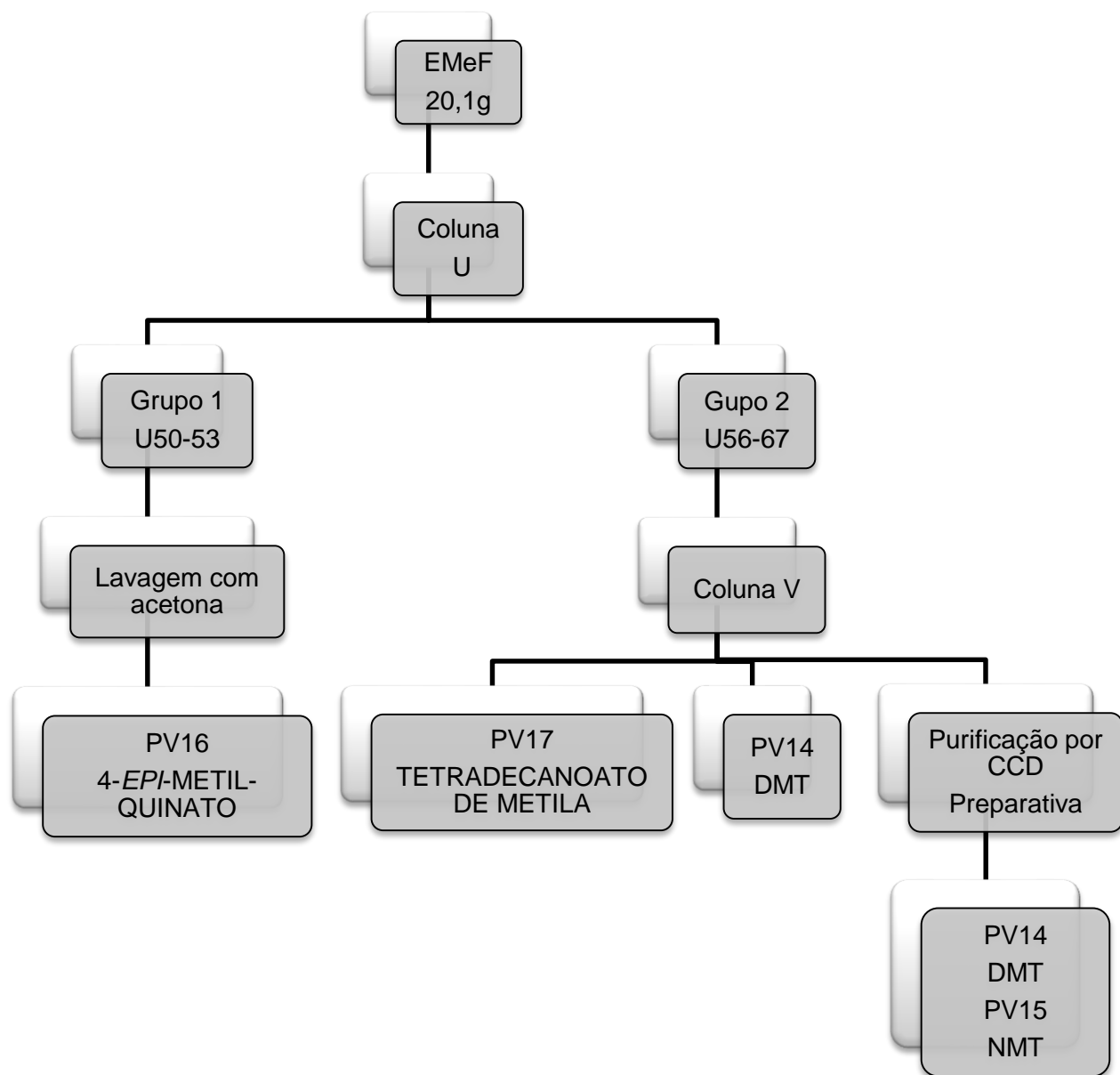


Figura 9: Esquema do fracionamento do EMeF e isolamento de constituintes.

Grupo 1:

Frações U50 a 53. Esse grupo (40,2 mg) foi lavado com acetona, houve precipitação de um sólido cristalino na forma de agulhas (11,2 mg). Esse sólido apresentou uma única mancha em CCD e faixa de fusão de 159-161 °C. Foram obtidos espectros no infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C , massas e dados de LCMS-ESI-IT-TOF e o sólido foi identificado como 4-*epi*-metil-quinato (PV16).

O restante da amostra não foi trabalhada por apresentar massa muito pequena.

Grupo 2:

Frações U55 a 67. Para esse grupo (2,0 g), em CCD, foram observadas 3 manchas com boa separação. O grupo foi submetido à CC (Coluna V). Utilizaram-se 73,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 110 frações de aproximadamente 15 mL cada.

Após análise por CCD, as frações V2 e 3 (100% CHCl_3) demonstraram-se aparentemente puras em análise por CCD. Foi obtido um líquido viscoso, transparente e amarelado. Após análise do espectro no IV, de RMN o líquido (41,4 mg) foi identificado como tetradecanoato de metila (PV17).

As frações V33 a 40 (86% CHCl_3 , 12% MeOH, 2% NH_4OH) foram agrupadas, a amostra (205,9 mg) foi obtida como um sólido amorfo, viscoso, castanho, aparentemente impuro em análise por CCD. Após comparação por padrão foi possível identificar a amostra como rica em DMT.

As frações V41 a 43 (86% CHCl_3 , 12% MeOH, 2% NH_4OH) demonstraram-se aparentemente impuras em análise por CCD, e por comparação por padrão foi possível identificar DMT (PV14) e NMT (PV15). As frações foram agrupadas, a amostra foi obtida como um sólido amorfo viscoso castanho (28,2 mg). Fez-se CCD preparativa, em sílica gel 60, na tentativa de separar as substâncias, tendo como fase móvel a mistura $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3) em atmosfera de amônia. A fração de maior R_f foi obtida como um sólido amorfo amarelo claro (19,1 mg) identificado por CCD comparativa como DMT (PV14). A fração de menor R_f foi obtida como um sólido amorfo castanho claro (8,5 mg). Após análise do espectro no IV, e dados de LCMS-ESI-IT-TOF o sólido foi identificado como N-metilriptamina (NMT, PV15).

1.2 – Determinação estrutural das substâncias obtidas das folhas de *P. viridis*

1.2.1 – PV1: Mistura de hidrocarbonetos

PV1 (26,8 mg) foi obtido a partir do extrato hexânico das folhas e apresentou-se como um sólido branco de ponto de fusão 58-60 °C.

No espectro no IV (Figura 10) é possível observar bandas de absorção intensas em 2958 a 2850 cm^{-1} característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 e da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos, respectivamente. É observada, também, a presença de bandas de deformação angular de baixa intensidade dos grupos C-H referentes à alcanos alifáticos em 1474 e 1464 cm^{-1} e uma banda de deformação angular de CH_2 em 730 cm^{-1} .

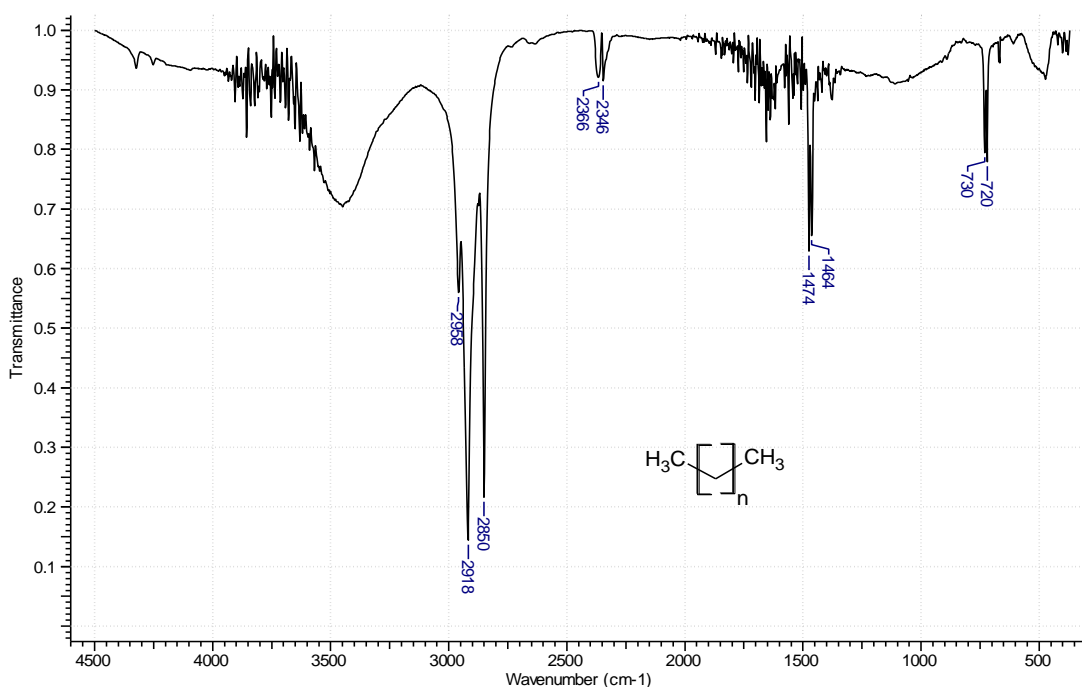


Figura 10: Espectro na região do IV de PV1 (KBr).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 11, pág. 39) são observados um tripleto em δ_H 0,88 (t, $J = 6,0$ Hz), referente ao grupo metila, e um sinal intenso em δ_H 1,25, atribuído aos grupos metilênicos da cadeia alifática de hidrocarboneto.

No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figura 12, pág. 40) são observados cinco sinais, que foram classificados como sendo uma metila e quatro grupos metilênicos. O sinal em δ_{C} 14,12 foi atribuído à metila do hidrocarboneto e os demais sinais são referentes aos grupos metilênicos da cadeia alifática.

Devido ao perfil do espectro no IV e RMN de PV1, concluiu-se que a amostra trata-se de uma mistura de hidrocarbonetos.

A caracterização dos hidrocarbonetos presentes em PV1 foi feita por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-EM). Pela análise do cromatograma e espectro de massas, foi possível identificar os principais constituintes como sendo $\text{C}_{25}\text{H}_{52}$ (1,7 %), $\text{C}_{26}\text{H}_{54}$ (4,2%), $\text{C}_{27}\text{H}_{56}$ (3,8%), $\text{C}_{28}\text{H}_{58}$ (2,8%), $\text{C}_{29}\text{H}_{60}$ (47,5%), $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$ (7,7%), $\text{C}_{31}\text{H}_{64}$ (27,2%).

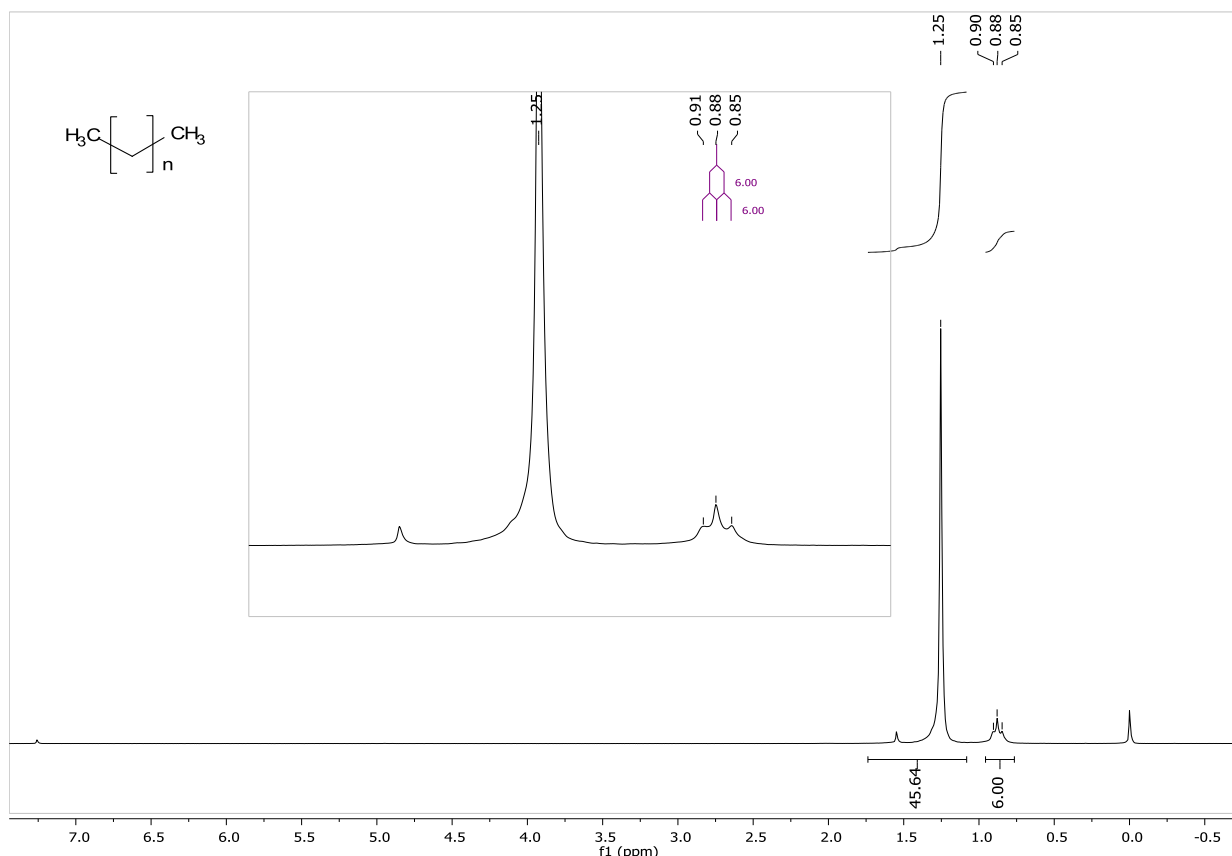


Figura 11: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) de PV1 em CDCl_3 .

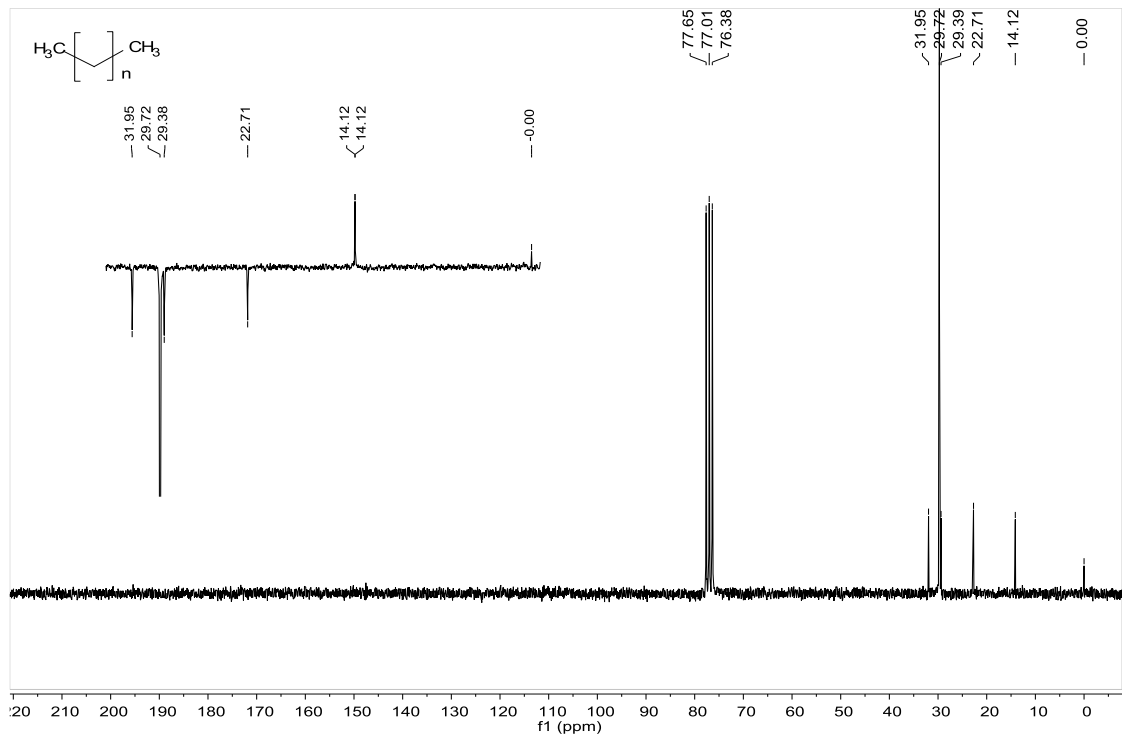


Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 (50 MHz) de PV1 em CDCl_3 .

1.2.2 – PV2: Triacilglicerol

PV2 (16,7 mg) foi obtido a partir de EHxF, apresentou-se como um sólido ceroso.

No espectro no IV (Figura 13) obtido de PV2 são observadas bandas de absorção em 2928 e 2856 cm^{-1} característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 e da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos, respectivamente. A natureza alifática pode ser confirmada, também, pela presença de bandas de deformação angular de baixa intensidade dos grupos C-H referentes à alcanos alifáticos em 1466 cm^{-1} e uma banda de deformação angular de CH_2 em 722 cm^{-1} . Adicionalmente observam-se duas bandas intensas em 1742 e 1720 cm^{-1} referente à deformação axial do grupo carbonila e uma banda em 1170 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C-O, concordantes para a ligação éster presente na estrutura geral de um triacilglicerol. A banda intensa em 3448 cm^{-1} foi atribuído à água do KBr.

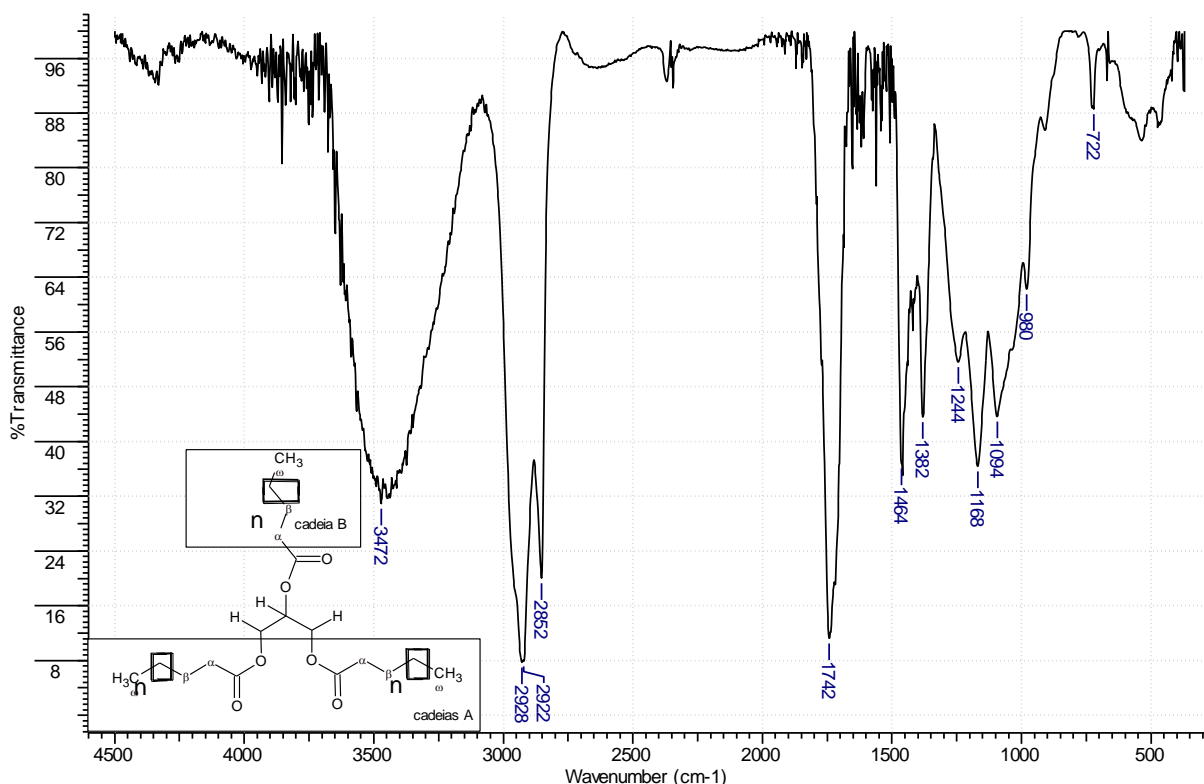


Figura 13: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV2 (KBr).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 14, pág. 42) obtido para PV2 são observados um multipletto entre δ_{H} 4,09-4,32 e um sinal em δ_{H} 5,26-5,35 referente aos átomos de hidrogênio Ha e Hb, respectivamente. Foram observados, também, um triplete em δ_{H} 2,31 (t, $J = 7,3$ Hz) correspondente aos átomos de hidrogênio α , e um sinal δ_{H} 1,61 correspondente ao deslocamento químico dos átomos de hidrogênio β .

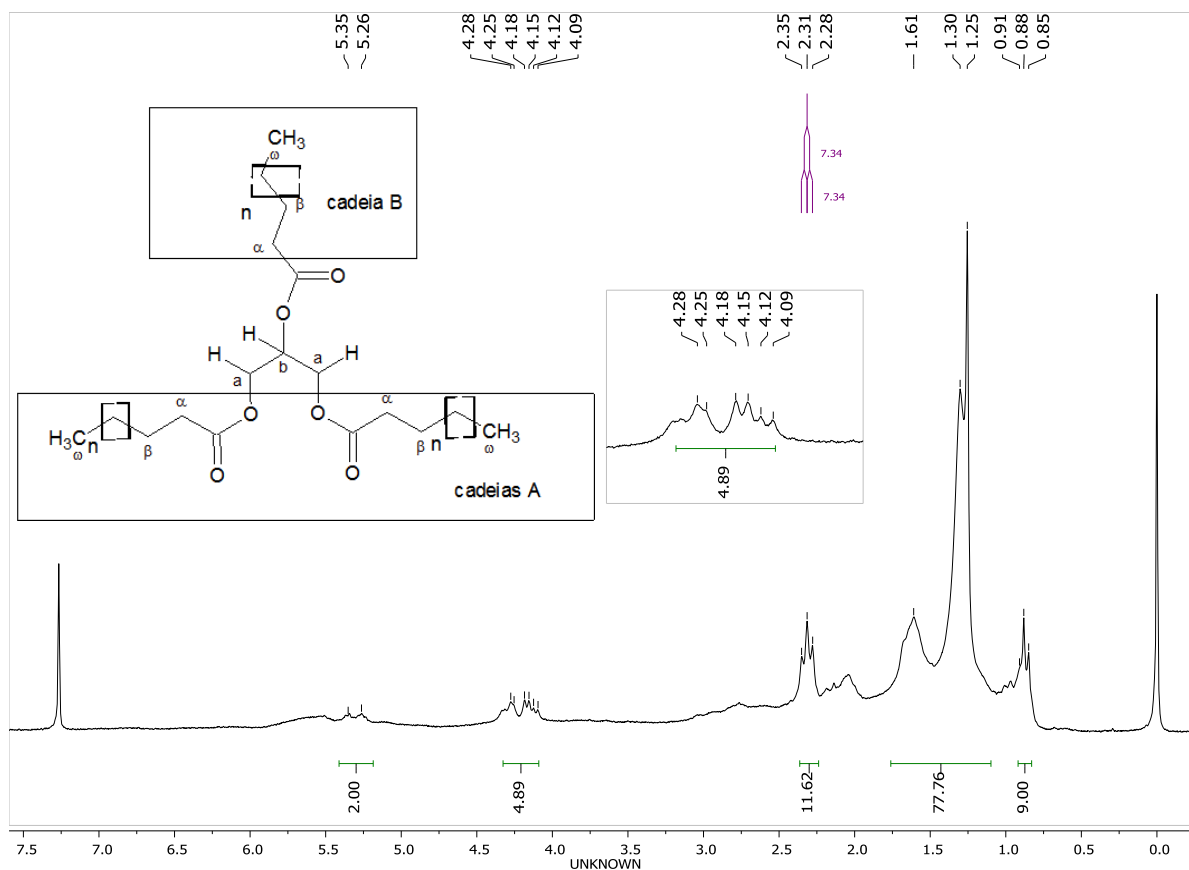


Figura 14: Espectro de RMN de ^1H obtido para PV2 (200 MHz, CDCl_3).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 15, pág. 43) os sinais em δ_{C} 173,21 e 171,97 foram atribuídos às carbonilas das cadeias A e B, respectivamente. No subespectro DEPT-135 (Figura 16, pág. 43) foi possível observar sinais em δ_{C} 62,18 e δ_{C} 69,06 referentes aos átomos de carbono metilênicos A e metínico B, respectivamente, e δ_{C} 14,09 referentes aos átomos de carbono metílicos.

A partir da comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV2 com dados da literatura (GUNSTONE *et al.*, 1991) concluiu-se que a amostra trata-se de um triacilglicerol (Tabela 12, pág. 136).

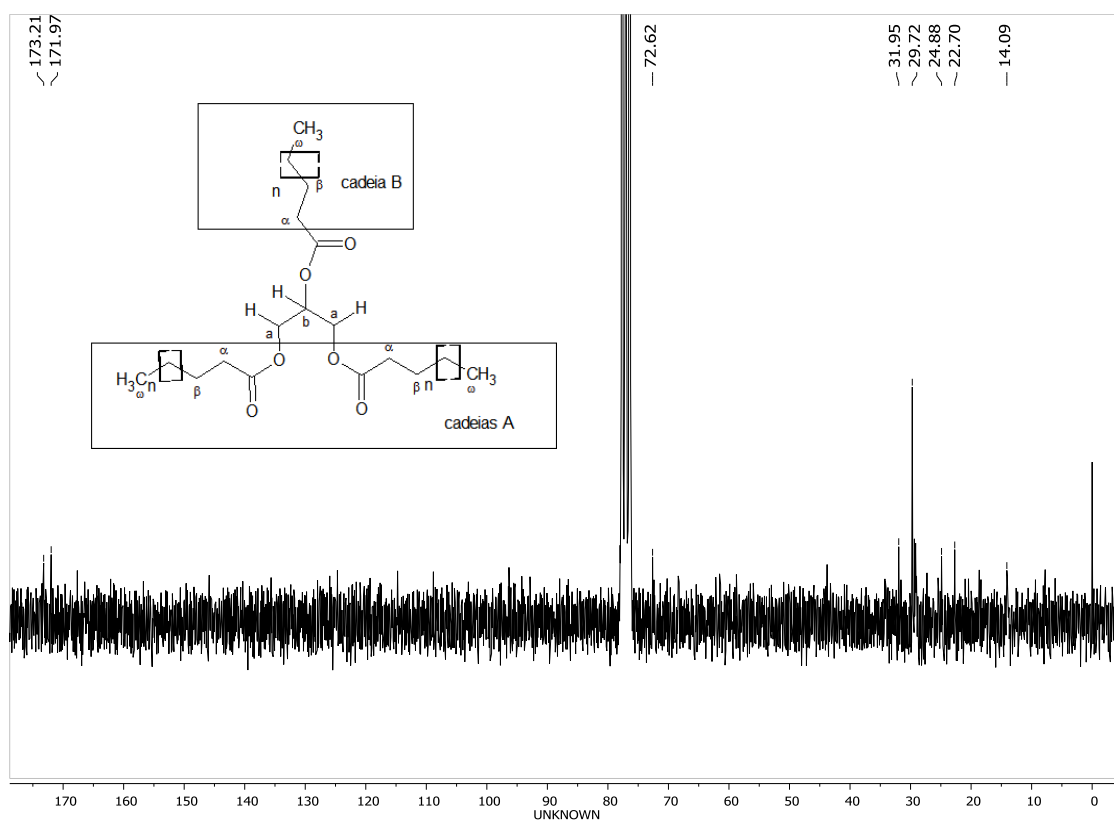


Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV2 (50 MHz, CDCl_3).

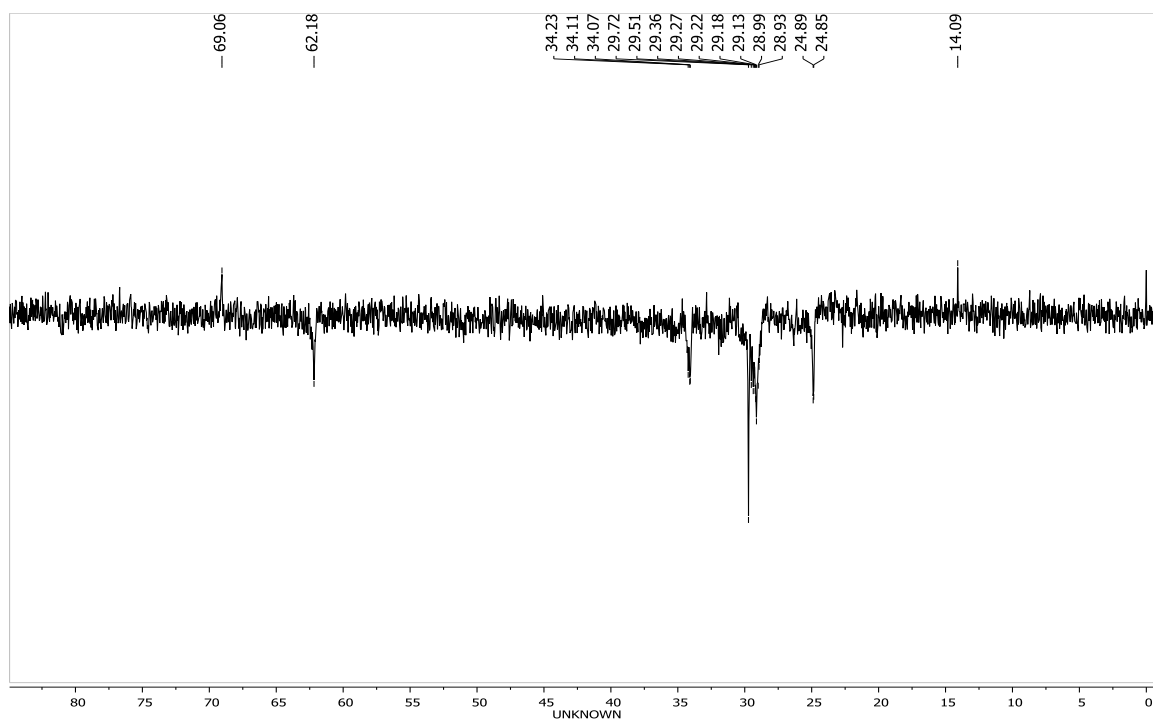


Figura 16: Subespectro DEPT-135 obtido para PV2 (50 MHz, CDCl_3).

1.2.3 – PV3: β -sistosterol e estigmasterol

PV3 (20,6 mg) foi obtida a partir do EHxF, apresentou-se como um sólido cristalino, com temperatura de fusão na faixa entre 136-140 °C.

No espectro no IV (Figura 17) são observadas bandas de absorção em 3430 cm^{-1} característica de estiramento da ligação O-H, bandas em 2960 cm^{-1} a 2852 cm^{-1} características de estiramento da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos, respectivamente, bandas em 1466 e 1382 cm^{-1} características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos, e banda em 1054 cm^{-1} característica de estiramento de ligação CO de álcool.

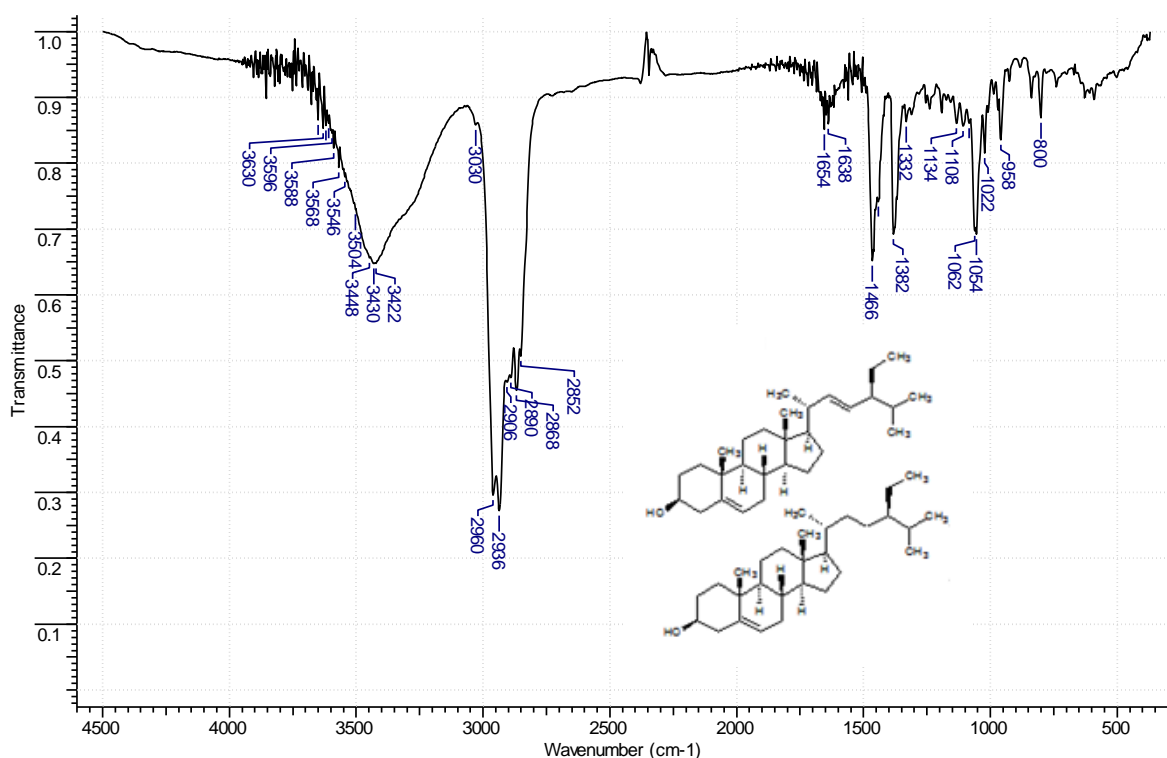


Figura 17: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV3 (KBr).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 18, pág. 45), obtido para PV3, observam-se diversos sinais na região entre δ_{H} 0,68 e δ_{H} 2,29, característicos de átomos de hidrogênio metílicos (CH_3), metilênicos (CH_2) e metínicos (CH) de esteroides. O multiplete em δ_{H} 3,47-3,58 é atribuído ao átomo de hidrogênio H3 dos esteroides. O sinal largo em δ_{H} 5,36 é atribuído ao átomo de hidrogênio olefínicos H6 da mistura

de esteroides e o multipeto entre δ_H 5,03-5,22 é atribuído aos átomos de hidrogênio H22 e H23 do estigmasterol.

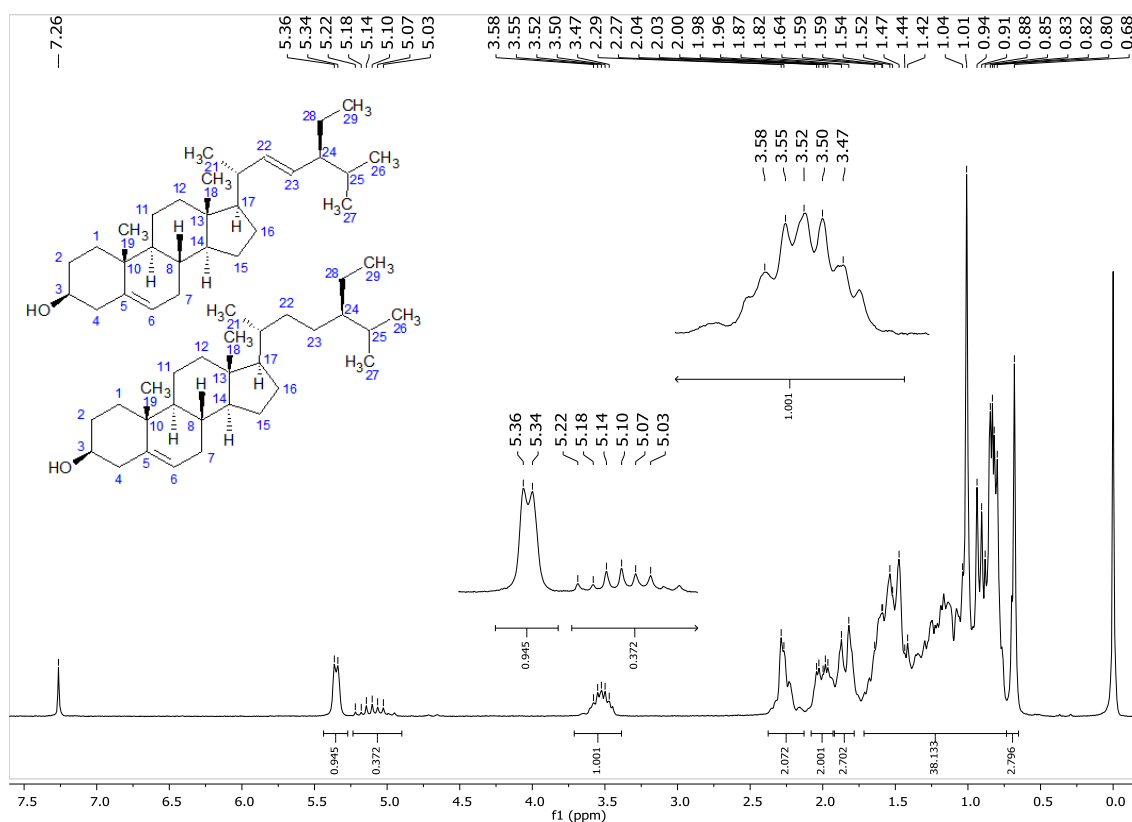


Figura 18: Espectro de RMN de ^1H obtido para PV3 (200 MHz, CDCl_3).

No espectro de RMN de ^{13}C , é possível observar deslocamentos químicos característicos dos átomos de carbono olefínicos em δ_C 140,78 e 121,72 que são atribuídos aos átomos de carbono C5 e C6 da mistura. Os sinais observados em δ_C 138,31 (C22) e 129,30 (C23) são atribuídos à presença de estigmasterol.

A partir dos sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19, pág. 46) e no subespectro DEPT-135 (Figura 20, pág. 46), juntamente com análise dos demais espectros, foi possível identificar PV3 como uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol.

As atribuições dos dados espectrais de RMN de ^{13}C obtidos para PV3 e valores referenciados na literatura (GOULART *et al.*, 1993) para a mistura de β -sitosterol e estigmasterol estão listadas na Tabela 13, pág. 137.

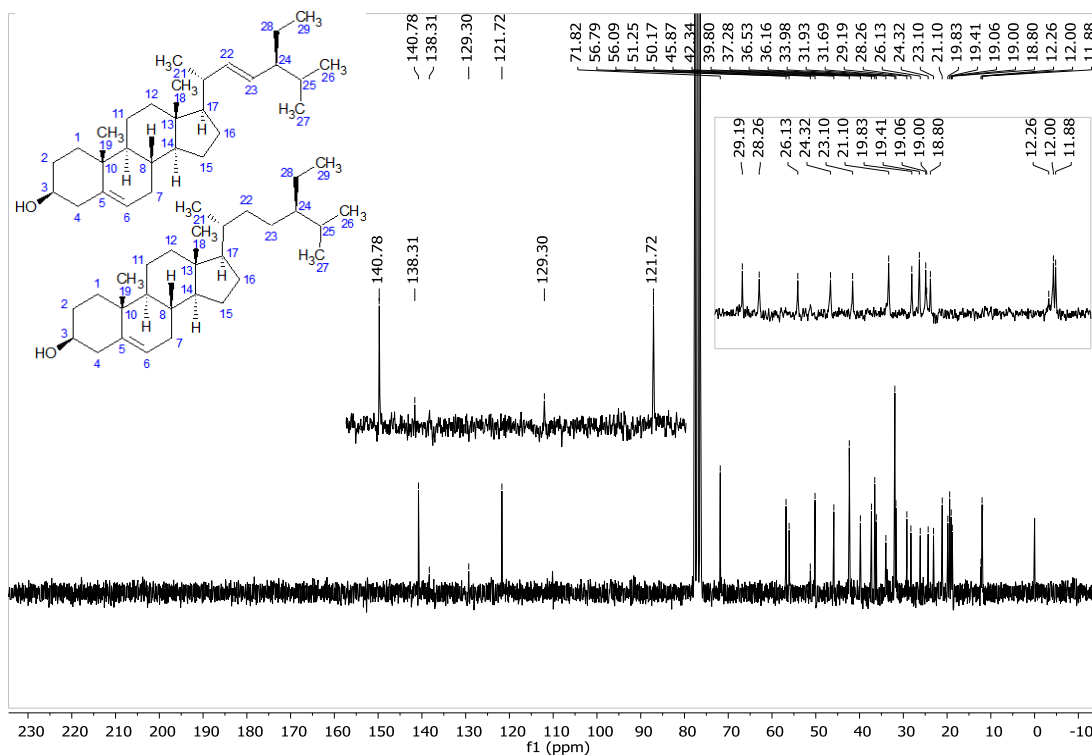


Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV3 (50 MHz, CDCl_3).

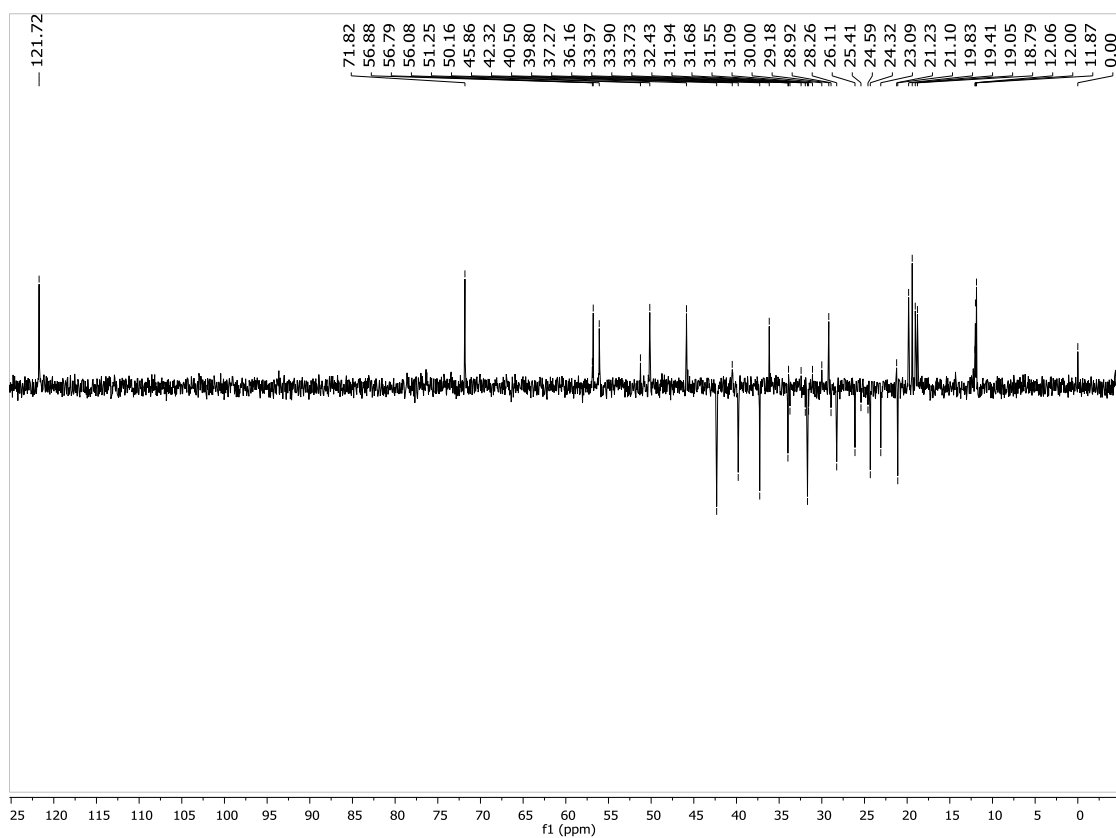


Figura 20: Subespectro DEPT-135 obtido para PV3 (50 MHz, CDCl_3).

1.2.4 – PV4: Esqualeno

PV4 (4,2 mg) foi isolado do extrato EHxF como um líquido incolor (óleo), miscível em CHCl_3 . Em análise por CCD, usando hexano como eluente, apresentou uma única mancha rosa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 21) e ^{13}C (Figura 22, pág. 48) de PV4 foram indicativos de natureza olefínica do composto, devido à presença de sinais de átomos de hidrogênio entre δ_H 5,08-5,15, e de átomos de carbono entre δ_C 124,31 a 135,12, regiões características de compostos com ligações duplas.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 22, pág. 48) observam-se 15 sinais, e a partir da análise desses juntamente com o subspectro DEPT-135 (Figura 23, pág. 48), foram atribuídos a quatro grupos CH_3 , na região δ_C 16,01 a 25,69, quatro grupos CH_2 entre δ_C 26,69 a 39,74, três grupos CH entre δ_C 124,31 e 124,44 e três átomos de carbono não hidrogenados situados entre δ_C 131,24 e 135,12 (Tabela 14, pág.138).

A partir da comparação dos dados do espectro de RMN de ^1H , ^{13}C e subspectro DEPT-135, foi possível identificar PV4 como sendo o esqualeno.

No espectro de RMN de ^{13}C o sinal em δ_C 29,71 foi atribuído à impureza graxa, sendo contaminante de PV4 (VALLADÃO, 2005).

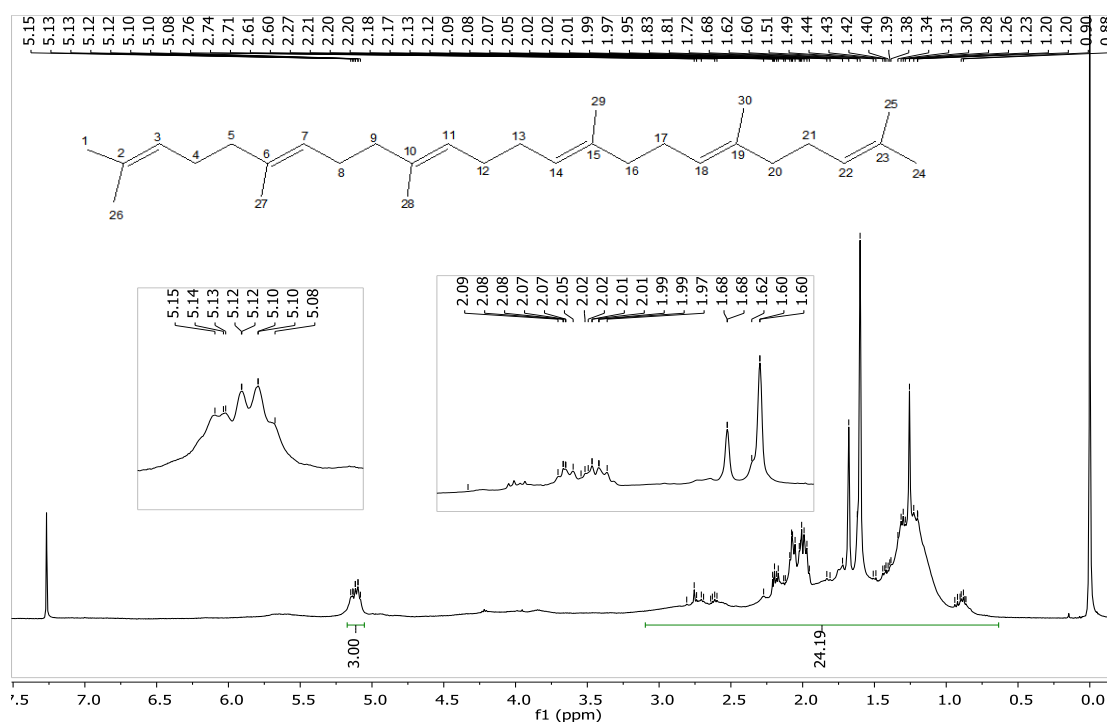


Figura 21: Espectro e ampliações de RMN de ^1H de PV4 (CDCl_3 ; 400 MHz).

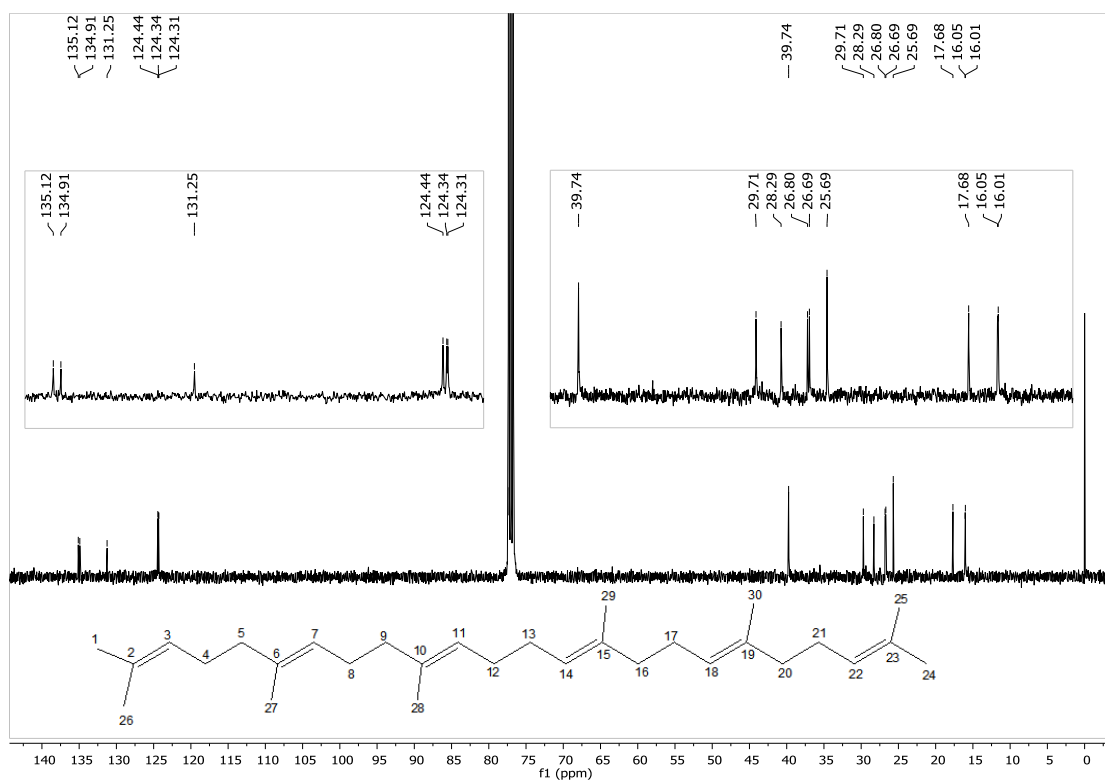


Figura 22: Espectro e expansão de RMN de ^{13}C de PV4 (CDCl_3 ; 100 MHz).

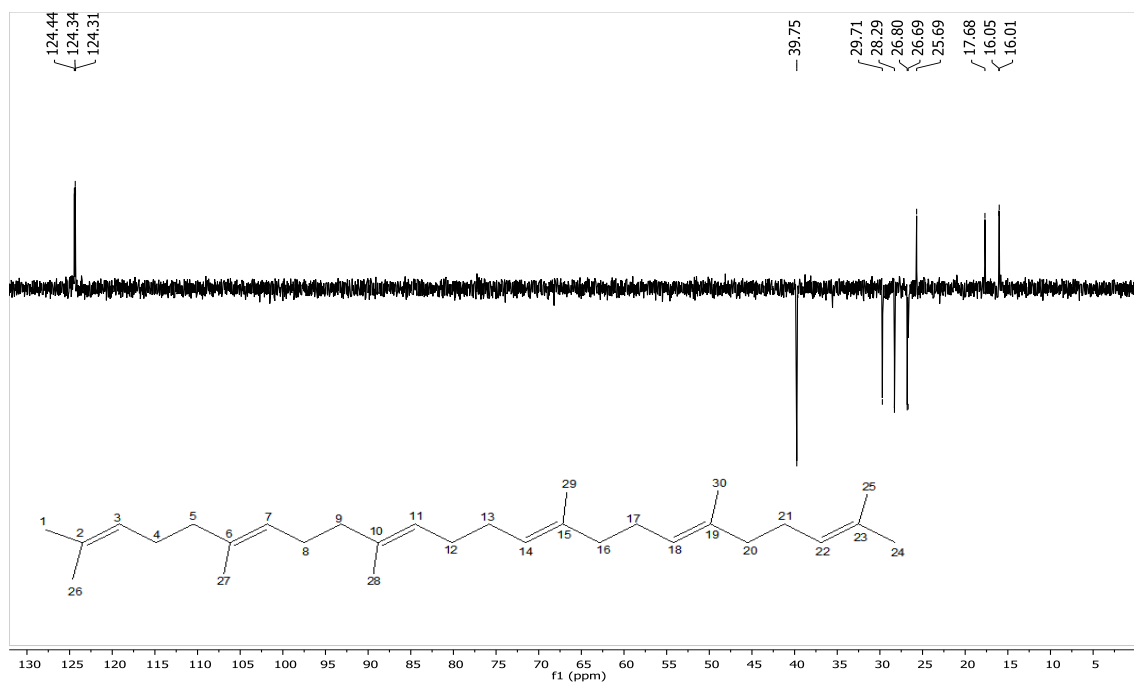


Figura 23: Subespectro DEPT-135 de PV4 (CDCl_3 , 100 MHz).

1.2.5 – PV5: 24-metilenocicloartenol

PV5 (16,2 mg) foi obtida a partir de EHxF, apresentou-se como um sólido branco, com temperatura de fusão na faixa entre 119-120 °C.

No espectro no IV (Figura 24) obtido da amostra observa-se uma banda em 3403 cm^{-1} característica de estiramento da ligação O-H. Observam-se também bandas em 2929 cm^{-1} característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 de compostos alifáticos, em 2865 cm^{-1} características de estiramentos simétrico e assimétrico de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos. Banda em 1640 cm^{-1} característica de estiramento da ligação C=C de alquenos. Bandas em 1462 e 1375 cm^{-1} referentes à deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos, e banda 1047 cm^{-1} típica de estiramento de ligação CO de álcool, e um sinal intenso em 885 cm^{-1} características de deformação angular fora do plano da ligação CH de grupos $\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$.

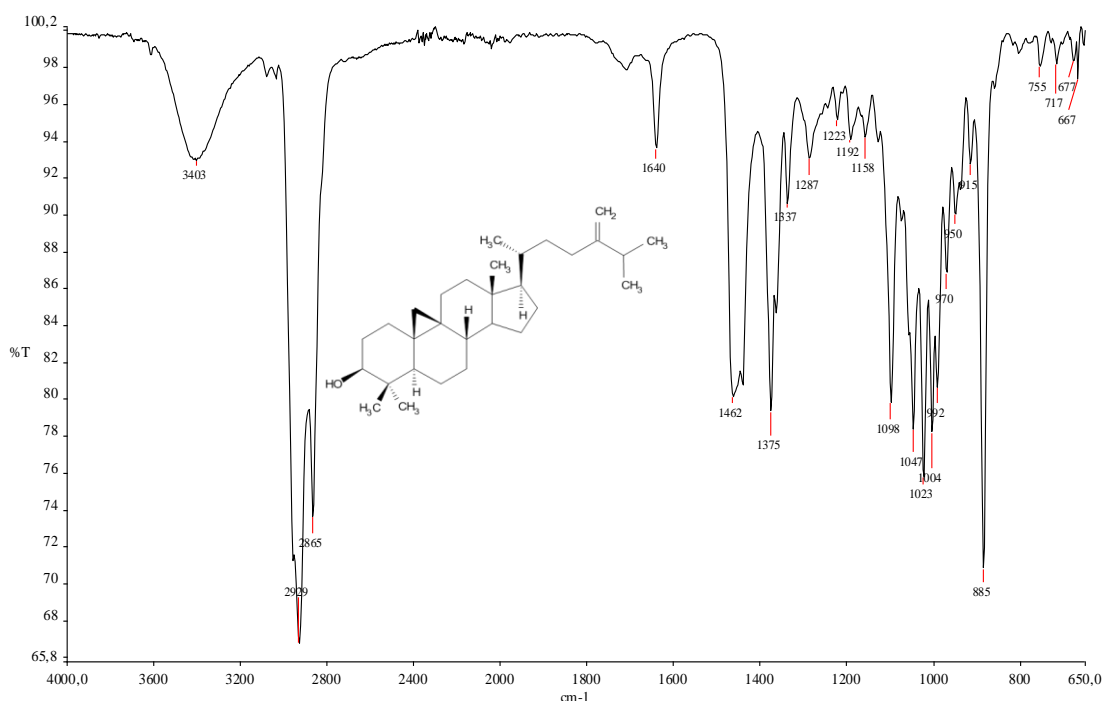


Figura 24: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV5 (ATR).

Por meio dos dados do espectro de RMN de ^1H (Figura 25, pág. 50) do composto, foi possível concluir tratar-se de um cicloartano devido, principalmente, à

presença de dois dupletos em δ_H 0,35 ($J= 4,17$ Hz) e δ_H 0,57 ($J= 4,11$ Hz), evidenciando a presença de um anel de ciclopropano (DE PASCUAL *et al.*, 1987)

A existência de uma ligação dupla terminal foi confirmada por meio de dois singletos largos em δ_H 4,72 e δ_H 4,66. O sinal a δ_H 3,27 foi atribuído ao átomo de hidrogênio metínico H3 do carbono hidroxilado.

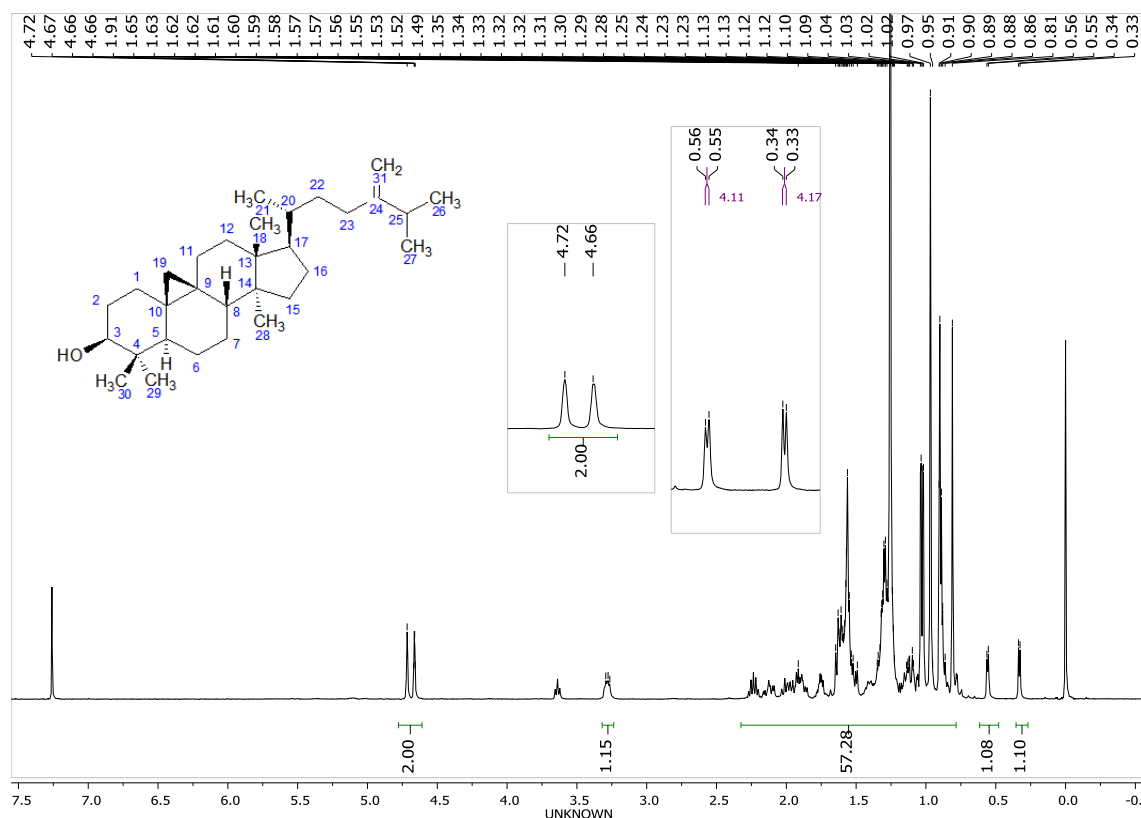


Figura 25: Espectro de RMN de ¹H obtido para PV5 (400 MHz, CDCl₃).

O espectro de RMN de ¹³C (Figura 26, pág. 51) e subespectro DEPT-135 (Figura 27, pág. 51) corroboraram a existência de uma dupla ligação terminal ao apresentar dois sinais de carbonos olefínicos em δ_C 156,94 (C) e δ_C 105,95 (CH₂).

A partir da análise dos demais sinais dos espectros foi possível identificar PV5 como 24-metilenocicloartenol. As atribuições dos dados espectrais de RMN de ¹³C e de ¹H obtidos para PV5 e valores referenciados na literatura (DE PASCUAL *et al.*, 1987) para 24-metilenocicloartenol estão listadas nas Tabela 15, pág. 139 e Tabela 16, pág. 140.

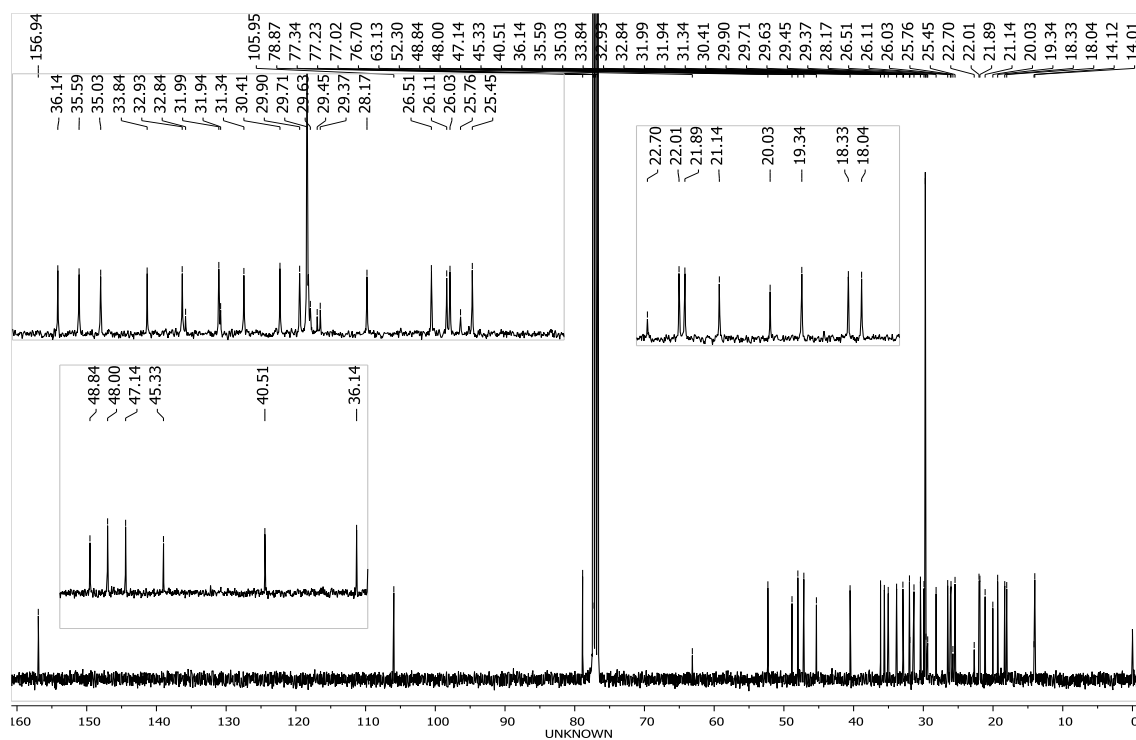


Figura 26: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV5 (100 MHz, CDCl_3).

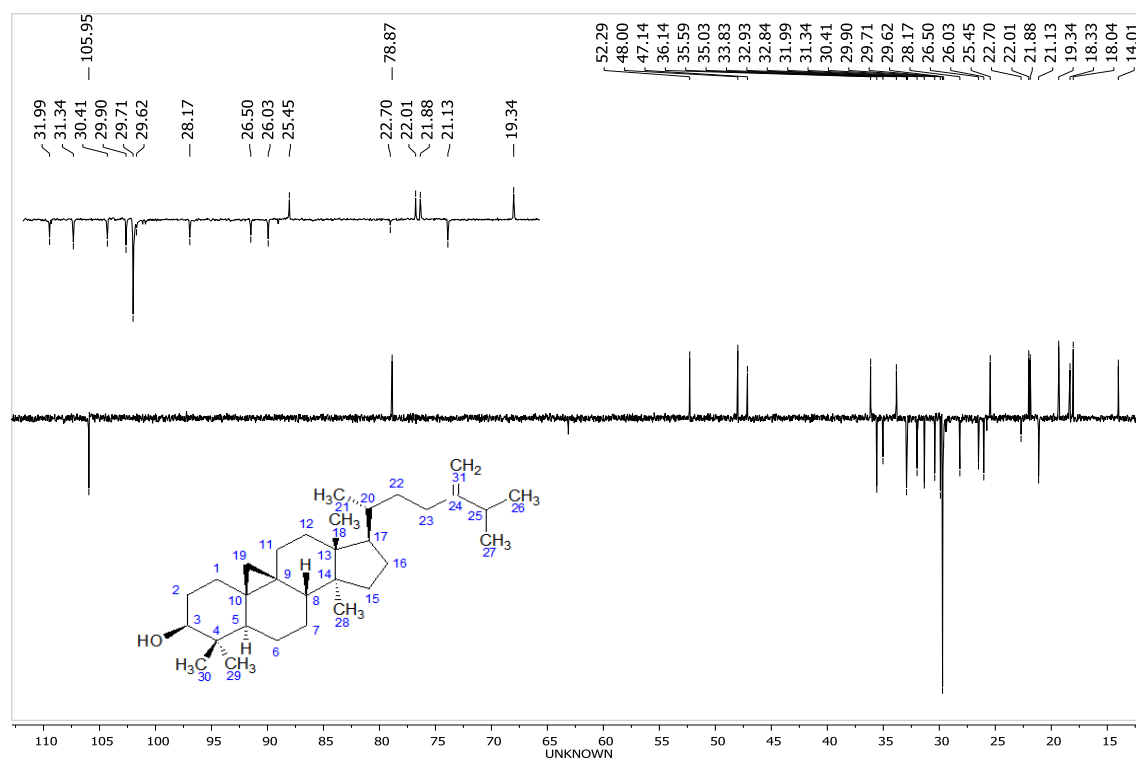


Figura 27: Subespectro DEPT-135 obtido para PV5 (100 MHz, CDCl_3).

Esse composto foi submetido à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Figura 28), e no espectro foi possível observar o pico do íon molecular m/z 440 Da compatível com a fórmula molecular $C_{31}H_{52}O$ do composto. Observou-se, também, fragmentos de m/z 425 [$M-CH_3$], 407 [$425-H_2O$] um íon m/z 300 [$C_{22}H_{36}$] resultante da fragmentação típica de triterpenos tetracíclicos com um anel ciclopropano em 9:19 (AYATOLLAHI *et al*, 2011), e m/z 175 [300 -cadeia lateral]⁺, esse tipo de fragmentação é comum em cicloartanos (AYATOLLAHI *et al*, 2011). Os sinais intensos, em m/z 207 e 281 são característicos de siloxanos, provenientes da sangria da coluna.

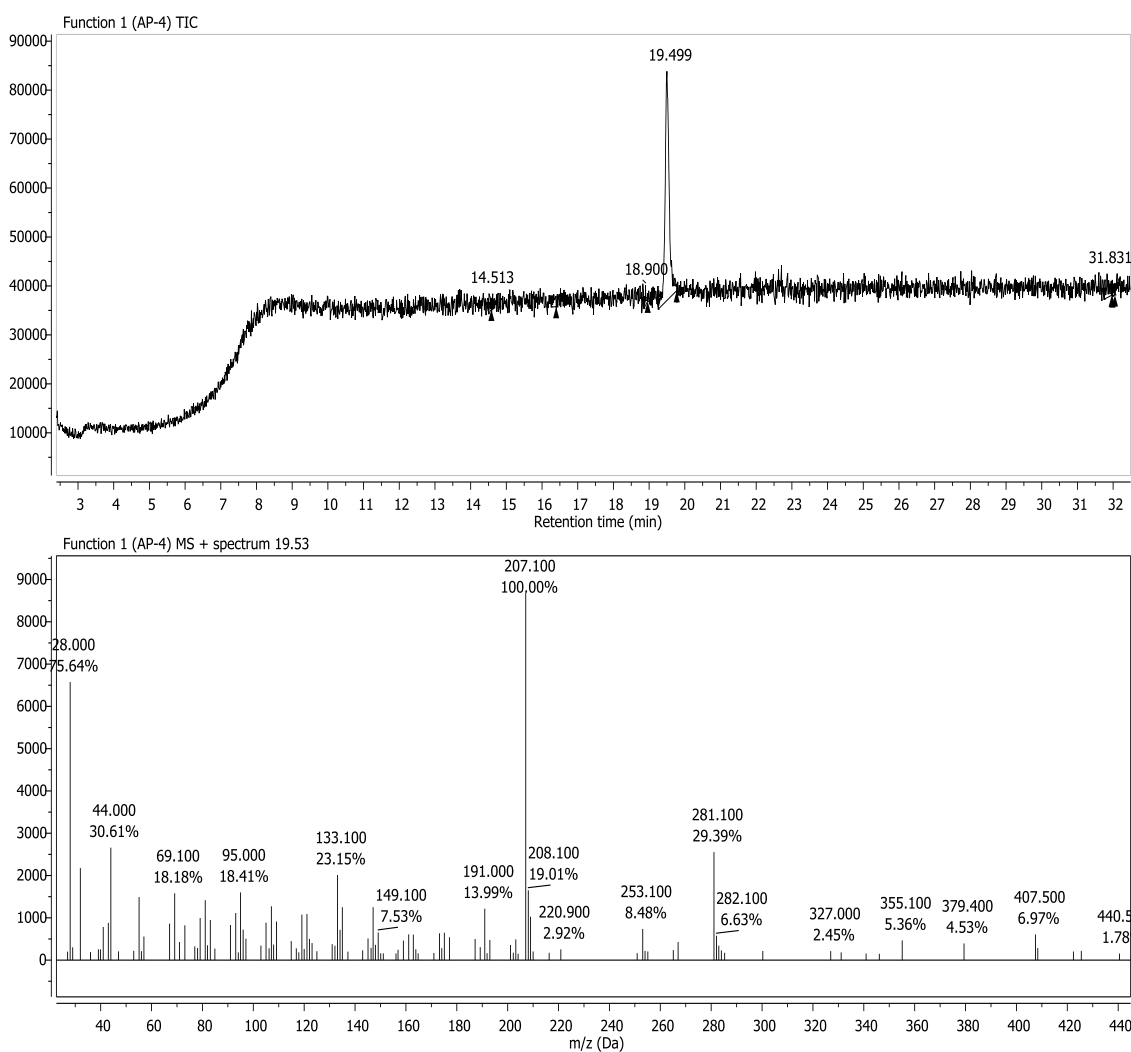


Figura 28: Cromatograma e espectro de massas de PV5, obtidos por GC-EM.

1.2.6 – PV6: Nonacosanal

PV6 (10,6 mg) foi isolado do ECIF apresentou-se como um sólido branco amorfo, apresentou faixa de fusão de 74-76 °C.

No espectro na região do IV (Figura 29) observam-se bandas em 2918 cm^{-1} característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 de compostos alifáticos e 2850 cm^{-1} característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos. A banda em 1720 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento de ligação C=O, e em 1474 e 1464 cm^{-1} foram atribuídas à deformação angular de ligação CH de cadeia longa. As bandas em 720 e 730 cm^{-1} são características de deformação de $(\text{CH}_2)_n$ de cadeia com “n” maior que quatro.

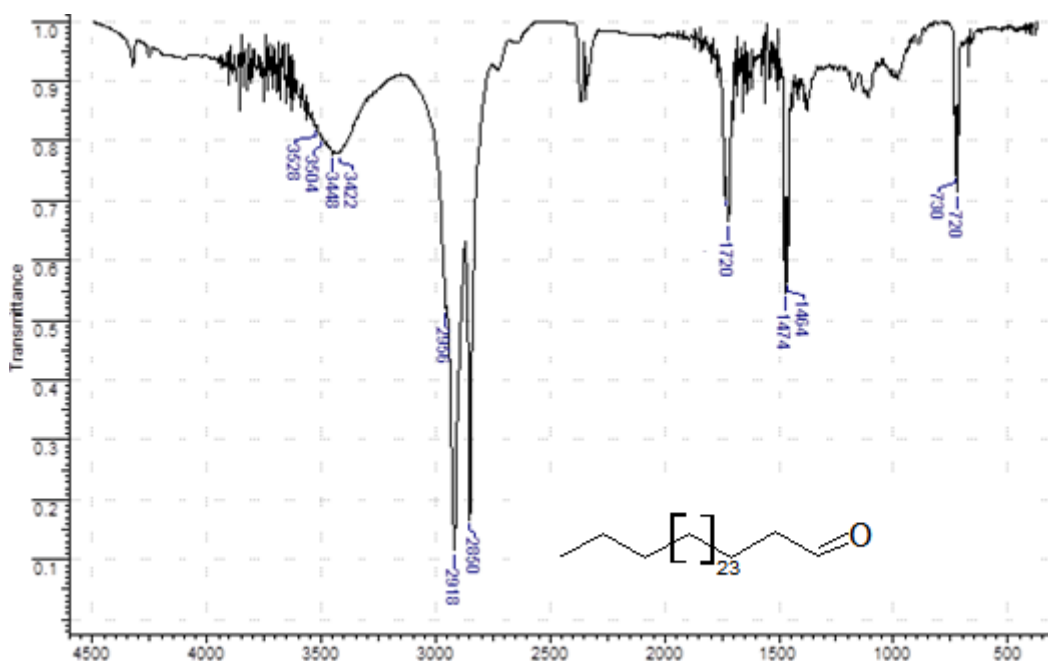


Figura 29: Espectro na região do IV de PV6 (KBr).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 30, pág. 54), foi possível observar um tripleto em δ_H 9,75 (t, $J = 1,6$ Hz, 1H) atribuído ao átomo de hidrogênio do grupo aldeído. O sinal em δ_H 2,39 (td, $J = 7,3$ e $1,9$ Hz, 2H) foi atribuído aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono adjacente à carbonila. Os sinais entre δ_H 1,63-1,59 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono C-3, e o tripleto em δ_H 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) foi atribuído aos átomos de hidrogênios do grupo metila. O

sinal intenso em δ_H 1,26 foi atribuído aos grupos metilênicos da cadeia alifática do aldeído.

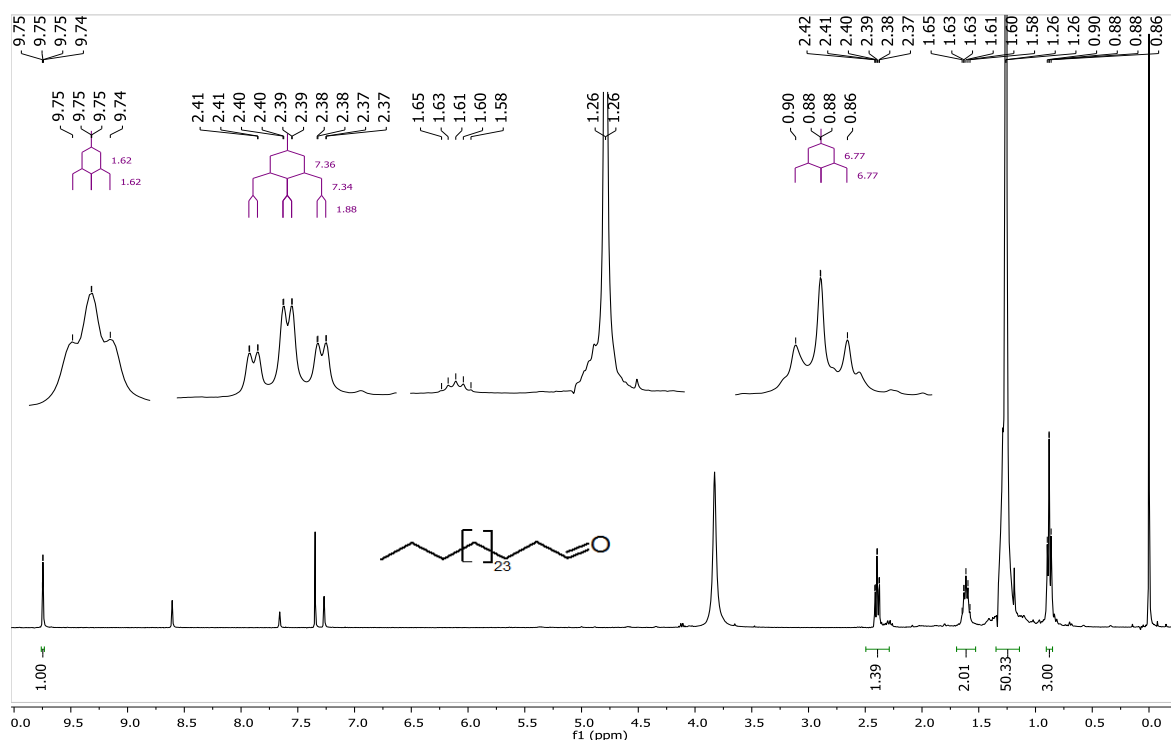


Figura 30: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PV6 em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 31, pág. 55) observa-se a presença de oito sinais, que, a partir do subespectro DEPT-135, foram atribuídos como sendo referentes a um grupo metila, uma carbonila e a grupos metilênicos. O sinal em δ_C 202,85 foi atribuído à carbonila e, o sinal em δ_C 14,12 foi atribuído à metila terminal do aldeído. Os demais sinais são referentes aos grupos metilênicos da cadeia alifática de PV6.

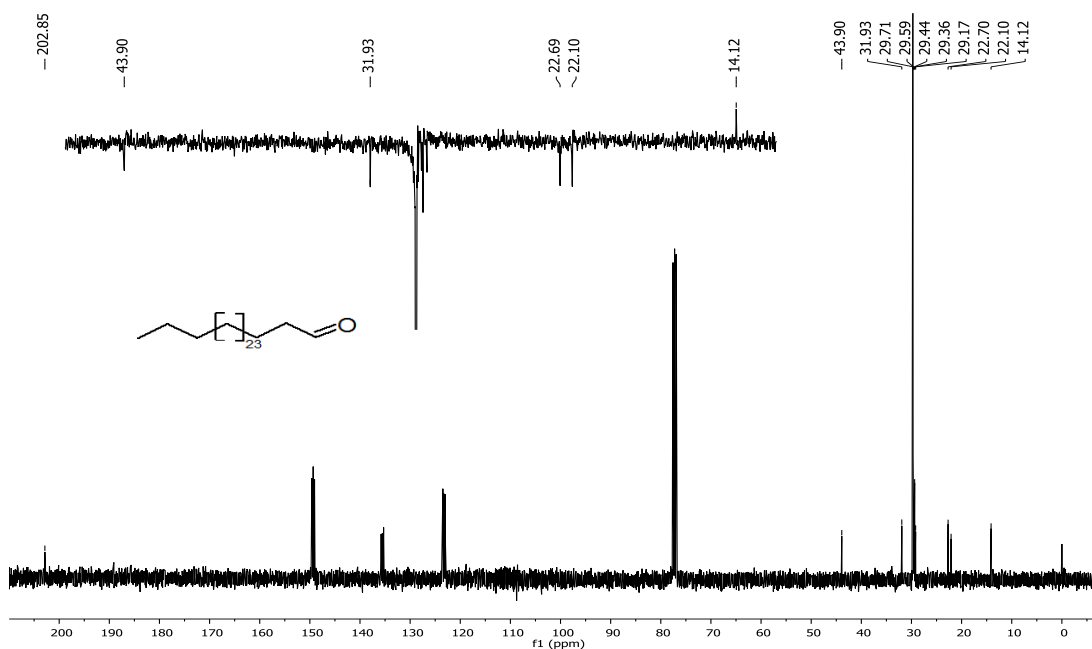


Figura 31: Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (400 MHz) de PV6 em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

Os dados obtidos de RMN de ^{13}C e ^1H foram comparados com os dados calculados (Tabela 17, pág. 140) e literatura (ŘEZANKA E SIGLER, 2007) (Tabela 18, pág. 141), juntamente com os dados obtidos a partir do espectro no infravermelho e pela integração dos átomos de hidrogênio do espectro de ^1H , foi possível sugerir PV6 como sendo um aldeído de cadeia longa, o nonacosanal ($\text{C}_{29}\text{H}_{58}\text{O}$).

1.2.7 – PV7: Nonacosanol

PV7 (25,4 mg) foi isolado do ECIF apresentou-se como um sólido branco amorfo de faixa de fusão 79-81 °C.

No espectro na região do IV (Figura 32) de PV7 é possível observar uma banda larga de absorção em 3346 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação OH. Bandas em 2915 cm^{-1} característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 de compostos alifáticos e 2848 cm^{-1} característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos. Bandas em 1472 e 1462 cm^{-1} atribuídas à deformação angular de ligação CH de cadeia longa. As bandas em 729 e 718 cm^{-1} são características de deformação de $(\text{CH}_2)_n$ de cadeia com “n” maior que quatro.

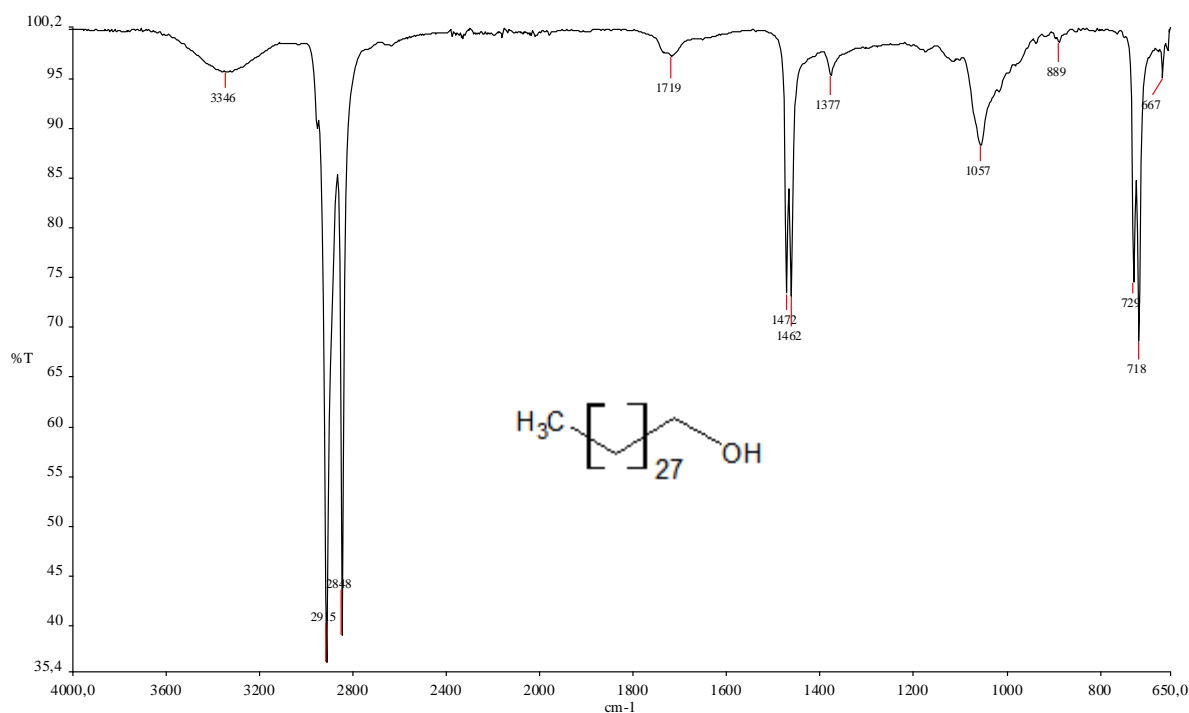


Figura 32: Espectro na região do IV de PV7 (ATR).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 33, pág. 57) é observado um tripleto em δ_H 3,66 (t, $J = 6,5$ Hz), atribuído aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono hidroxilado ($\text{C}\alpha$). O sinal entre δ_H 1,56-1,60 foi atribuído aos átomos de hidrogênio ligados ao átomo de carbono $\text{C}2$, o tripleto em δ_H 0,88 (t, $J = 6,2$ Hz) foi atribuído aos

átomos hidrogênio da metila e o sinal intenso em δ_H 1,26 foi atribuído a grupos metilênicos da cadeia alifática do álcool.

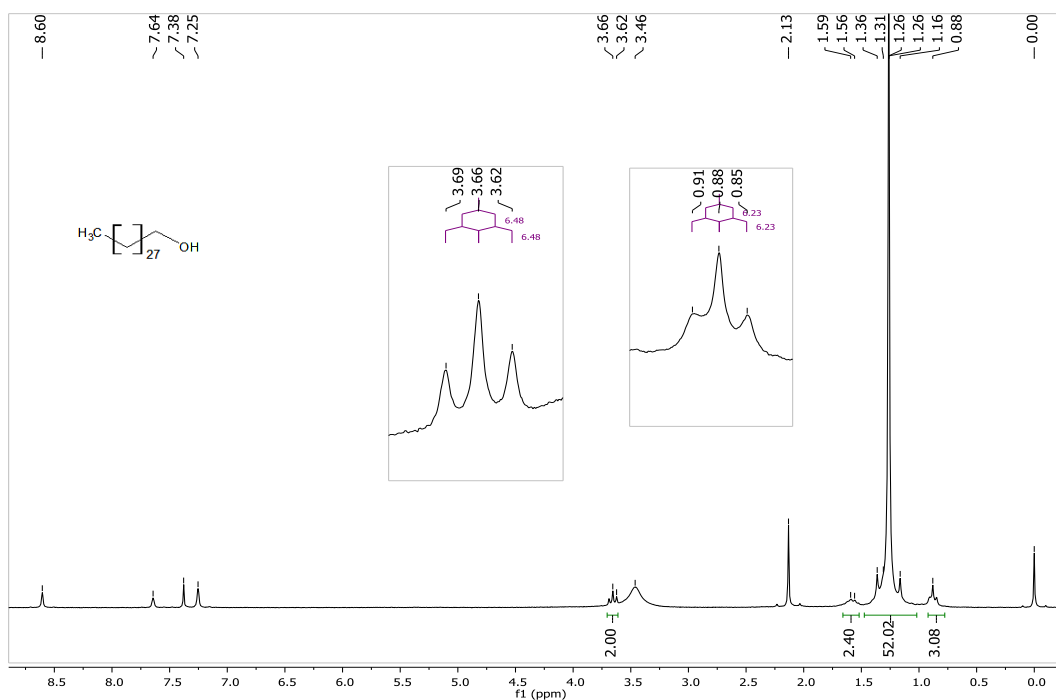


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) de PV7 em $\text{CDCl}_3 + \text{Piridina-d}_5$.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 34, pág. 58) foram observados oito sinais, que a partir do subespectro DEPT-135, foram classificados como sendo referentes a um grupo metila, em δ_c 14,66, e grupos metilênicos, e o sinal em δ_c 63,11 foi atribuído ao átomo de carbono hidroxilado.

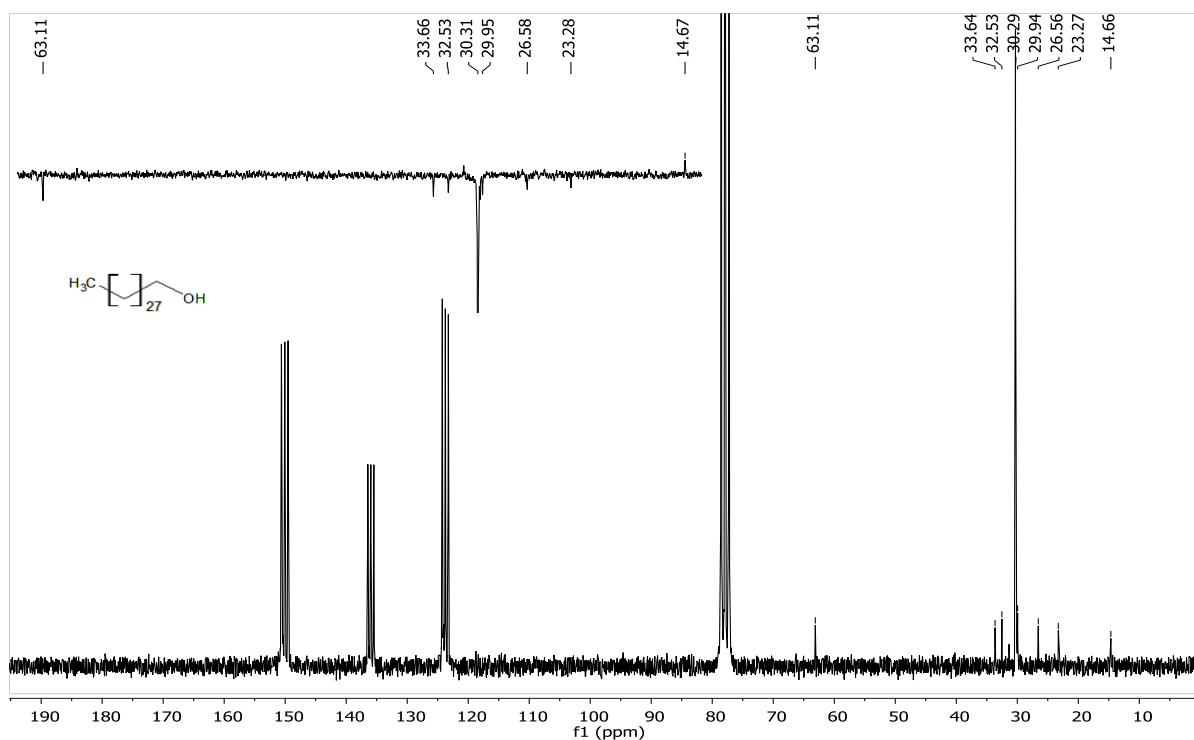


Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 (50 MHz) de PV7 em $\text{CDCl}_3 + \text{Piridina-d}_5$.

Por meio da análise dos espectros no IV e RMN, comparação com dados da literatura (Tabela 19, pág. 141) e levando em consideração a integração dos átomos de hidrogênio, foi possível sugerir que PV7 seja o nonacosanol ($\text{C}_{29}\text{H}_{60}\text{O}$).

1.2.8 – PV8: Ácido hentriacontanoico

PV8 (9,0 mg) foi isolado do ECIF e apresentou-se como um sólido branco, pouco solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão de 86-88 °C.

No espectro na região do IV (Figura 35), de PV8, observam-se bandas de absorção em 2915-2848 cm^{-1} características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, evidenciando a natureza alifática da substância. A banda em 1703 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C=O de ácido carboxílico, as bandas em 1472 e 1462 cm^{-1} foram atribuídas à deformação angular de ligação CH de cadeia longa e as bandas em 729 e 719 cm^{-1} são características de deformação de $(\text{CH}_2)_n$ de cadeia com “n” maior que quatro.

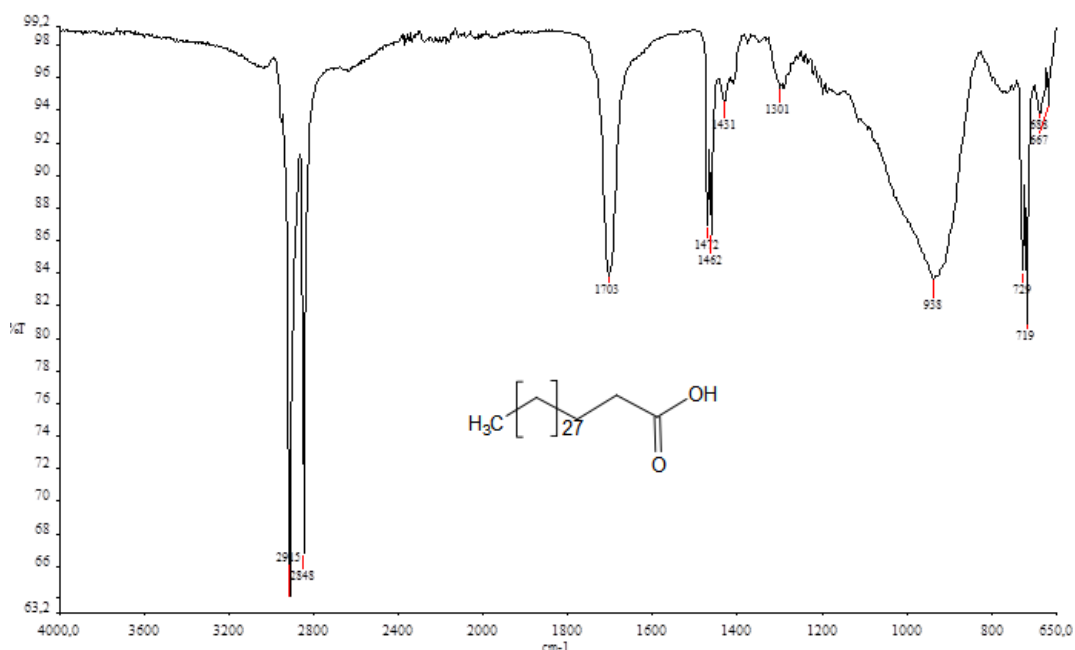


Figura 35: Espectro na região do IV de PV8 (ATR).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 36, pág. 60) de PV8 observam-se um tripleto em δ_H 2,37 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), atribuído ao hidrogênio adjacente à carbonila, um multiplete entre δ_H 1,66-1,73, referente ao hidrogênio do carbono β , e outro tripleto em δ_H 0,88 (t, $J = 6,5$ Hz), referente aos hidrogênios do grupo metila terminal. O sinal intenso em δ_H 1,27 (54 H) foi atribuído aos grupos metilênicos da cadeia longa de ácido graxo.

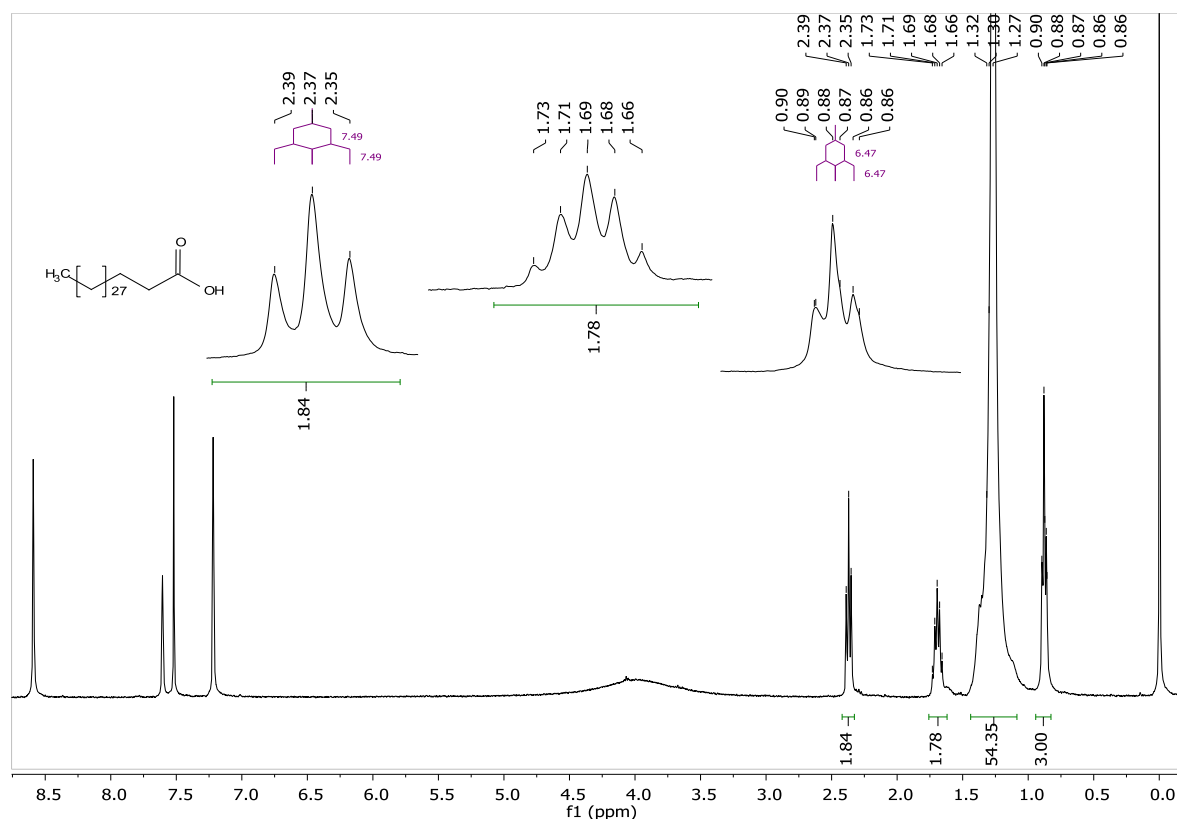


Figura 36: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) PV8 em CDCl₃+ Piridina-d₅.

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 37, pág.61) foi possível observar 12 sinais, sendo o sinal em δ_C 176,50 referente à carboxila, e o sinal em δ_C 14,13 referente ao carbono metílico. Os sinais entre δ_C 22,69 e 34,67 foram relacionados aos grupos metilênicos do composto.

A análise dos espectros de RMN, a comparação com os valores de RMN de ¹³C da literatura (Tabela 20, pág. 142) (GUNSTONE *et al.*, 1976), e levando em consideração a integração dos átomos de hidrogênio permitiram sugerir PV8 como sendo ácido hentriacontanoico (C₃₁H₆₂O₂).

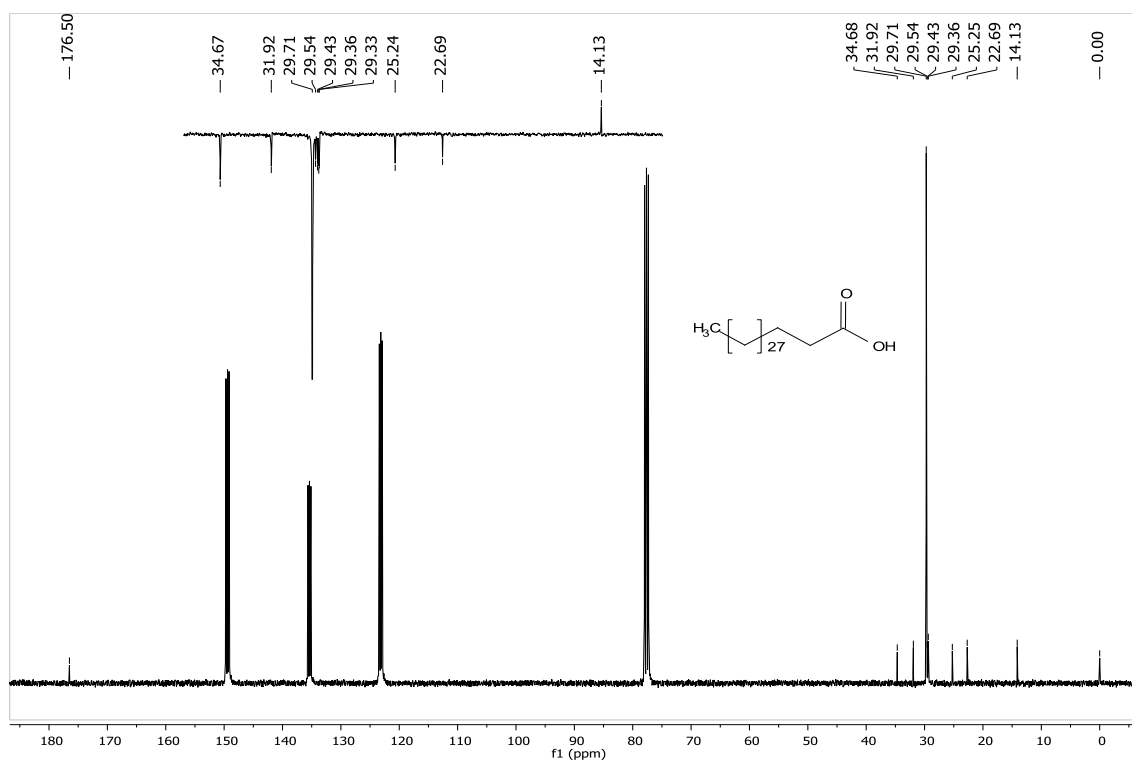


Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C subspectro DEPT-135 (100 MHz) de PV8 em $\text{CDCl}_3 + \text{Piridina-d}_5$.

1.2.9 – PV9: Ácido hexadecanoico (ácido palmítico)

PV9 (3,3 mg) foi isolado do ECIF e apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão de 63-64 °C.

No espectro na região do IV (Figura 38), de PV9 observam-se bandas de absorção em 2915-2848 cm^{-1} características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, evidenciando a natureza alifática da substância. Banda em 1705 cm^{-1} característica de estiramento de ligação dupla CO de ácido carboxílico, 1472 e 1462 característica de deformação angular de ligação CH de cadeia longa. As bandas em 729 e 719 cm^{-1} foram atribuídas à deformação de $(\text{CH}_2)_n$ de cadeia com “n” maior que quatro.

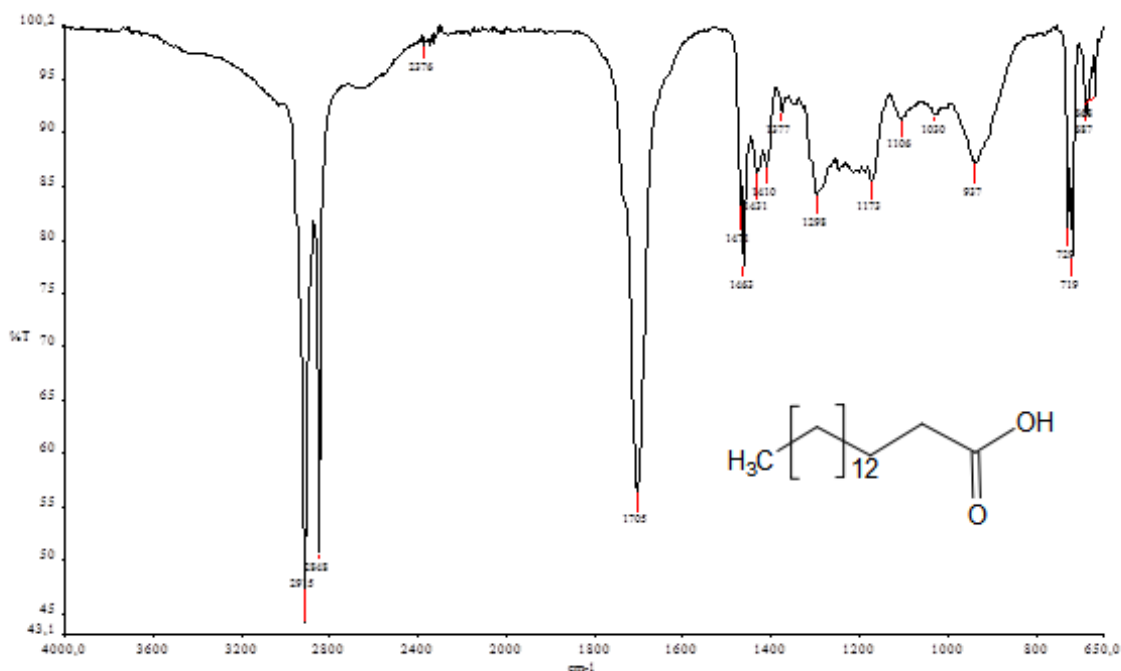


Figura 38: Espectro na região do IV de PV9 (ATR).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 39, pág. 63) de PV9 foi possível observar um tripleto em δ_H 2,35 (t, $J = 7,4$ Hz) atribuído aos átomos de hidrogênio ligados ao átomo de carbono α , um multipletto na região δ_H 1,60-1,67 referente ao hidrogênio ligado ao átomo de carbono β e outro tripleto em δ_H 0,88 (t, $J = 6,4$ Hz) que se refere aos átomos de hidrogênio do grupo metila terminal. O sinal intenso em δ_C 1,26 foi atribuído aos grupos metilênicos da cadeia longa do ácido graxo.

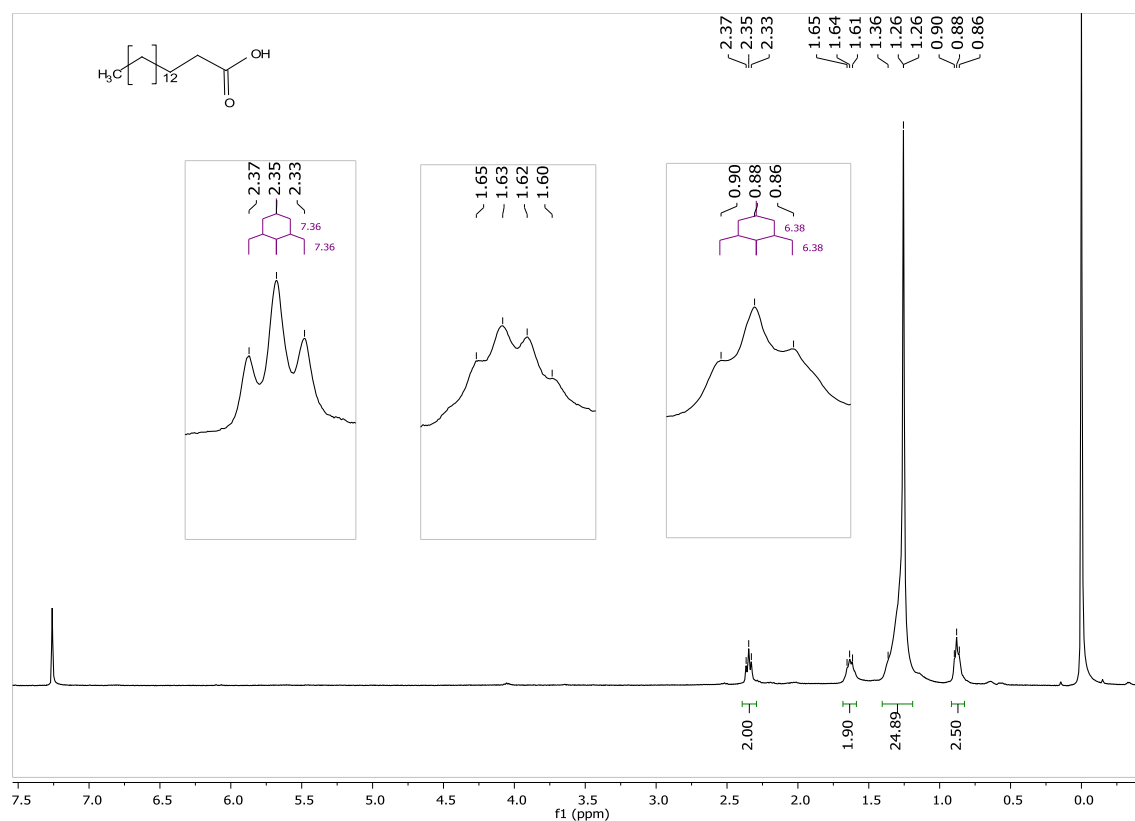


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) PV9 em CDCl_3 .

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 40, pág. 64) e subespectro DEPT-135, foi possível observar 11 sinais. O sinal em δ_{C} 14,12 foi atribuído ao átomo de carbono metílico, os sinais entre δ_{C} 22,70 e 33,71 foram atribuídos aos grupos metilênicos do composto e o sinal, em δ_{C} 177,99, foi atribuído ao átomo de carbono da carboxila.

A análise dos espectros no RMN de ^1H e ^{13}C , a comparação com os valores de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela 21, pág.142) (GUNSTONE *et al.*, 1976), juntamente com integração dos sinais dos átomos de hidrogênio permitiram sugerir PV9 como sendo ácido hexadecanoico (ácido palmítico) ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$).

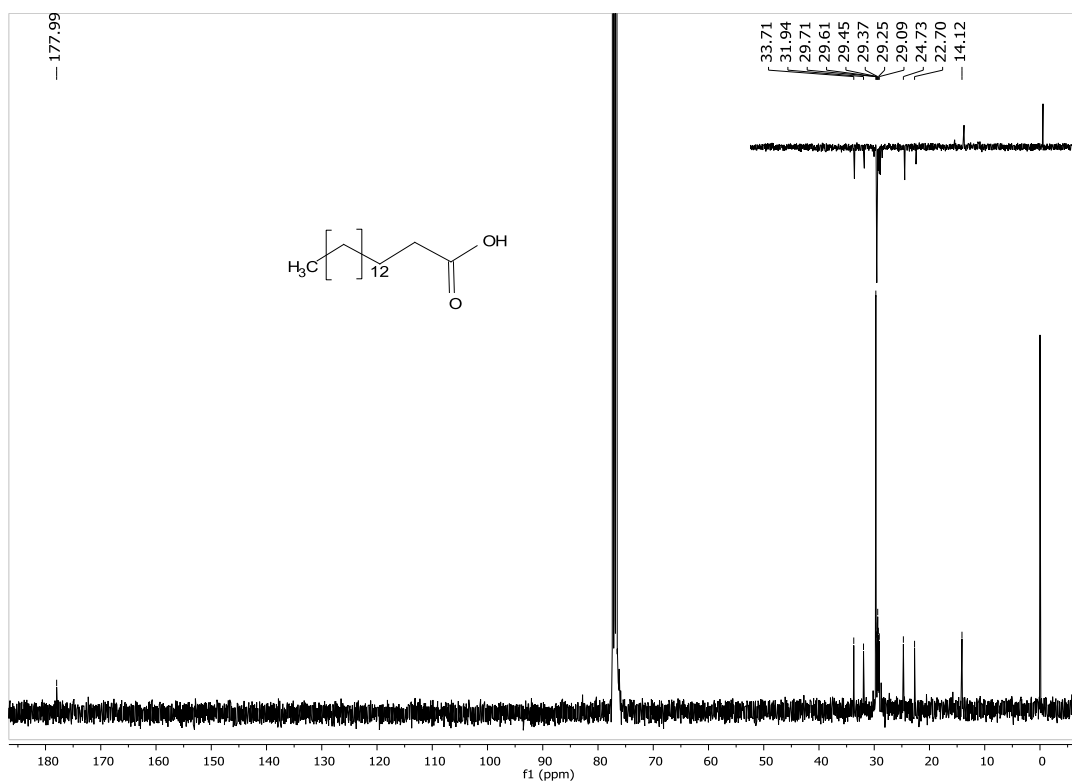


Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 (100 MHz) de PV9 em CDCl_3 .

1.2.10 – PV10: Ácido heptadecanoico (ácido margárico)

PV10 (7,8 mg) foi isolado do ECIF e apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão de 60-62 °C.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 41) de PV10 foram observados um tripleto em δ_H 2,35 (t, $J= 7,4$ Hz) atribuído aos átomos de hidrogênio ligados ao átomo de carbono α , um multipletto em δ_H 1,67 referente aos átomos de hidrogênio ligados ao átomo de carbono β e outro tripleto em δ_H 0,88 (t, $J= 6,3$ Hz) referente aos átomos de hidrogênio do grupo metila terminal. O sinal muito intenso em δ 1,26 foi atribuído aos grupos metilênicos da cadeia carbônica longa do ácido graxo.

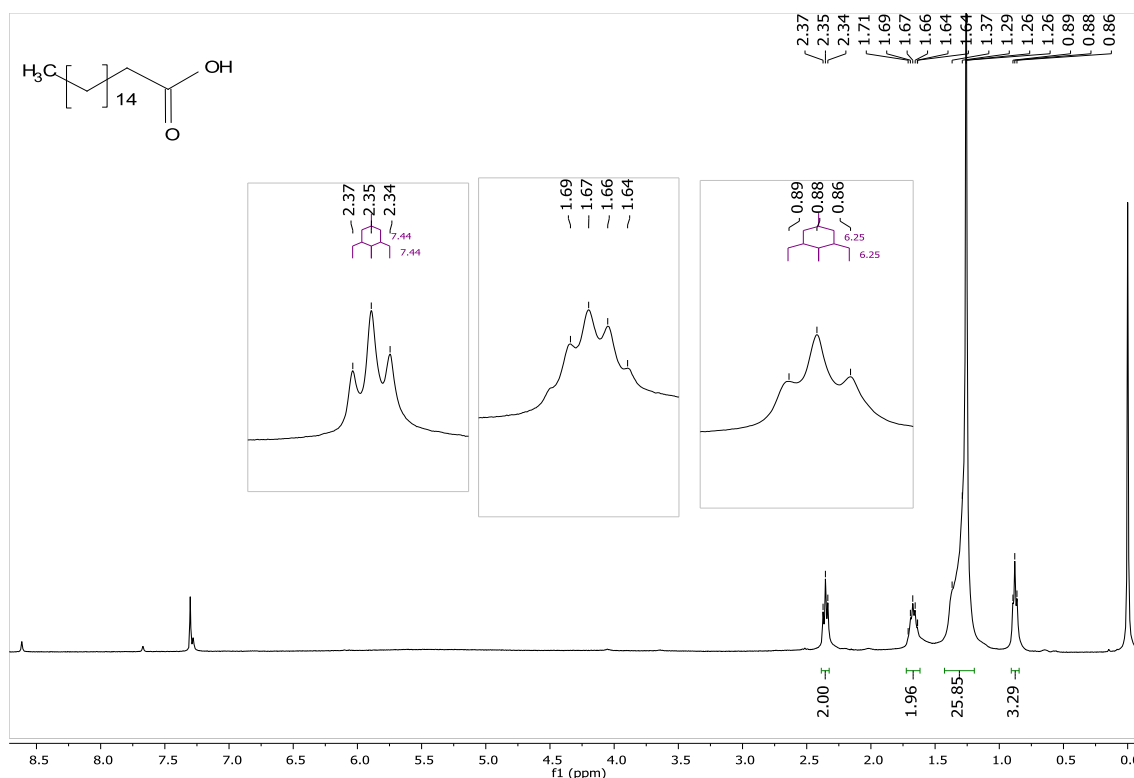


Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) PV10 em $\text{CDCl}_3 + \text{Piridina-d}_5$.

No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figura 42, pág.66) foi possível observar 11 sinais, sendo o sinal em δ_C 14,12, referente ao carbono metílico, sinais entre δ_C 22,70 e 34,64 relacionados aos grupos metilênicos do composto e um sinal em δ_C 176,69, referente à carbonila.

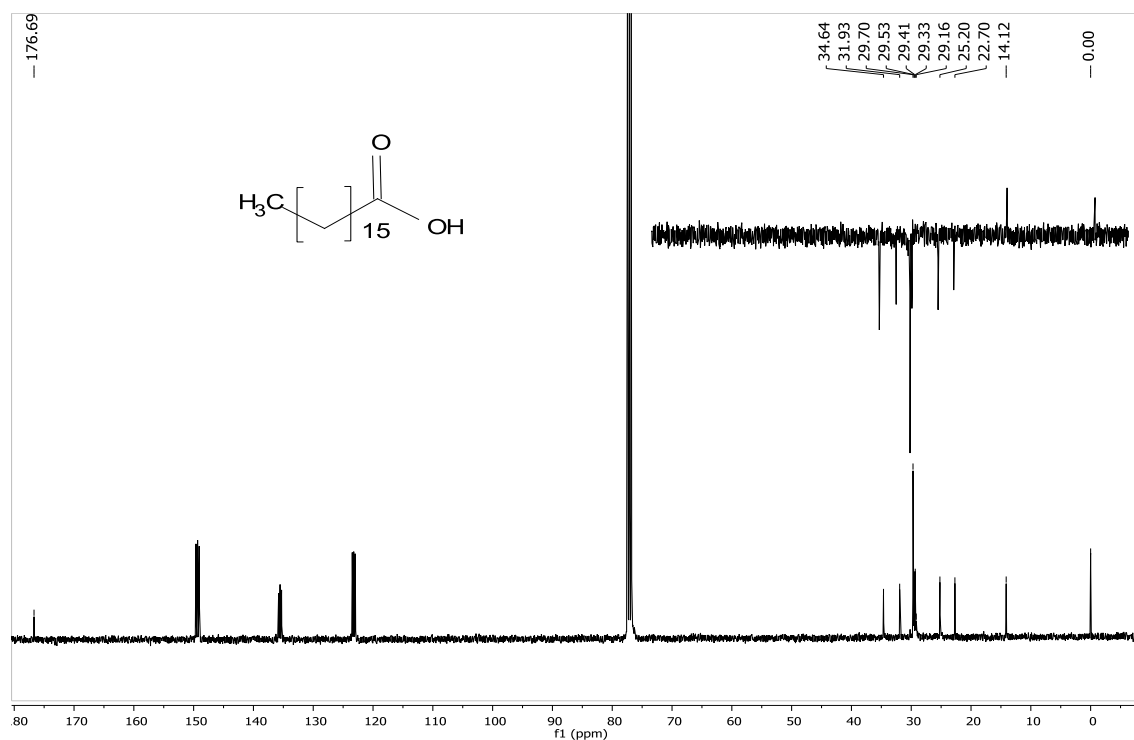


Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) PV10 em $\text{CDCl}_3 + \text{Piridina-d}_5$.

A análise dos espectros no RMN de ^1H e ^{13}C , a comparação com os valores de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela 22, pág. 142) (GUNSTONE *et al.*, 1976), e levando em conta a integração dos átomos de hidrogênio no espectro de RMN de ^1H , permitiram sugerir que PV10 seja ácido heptadecanoico ($\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$).

1.2.11 – PV11: Mistura de ácido ursólico e oleanólico

PV11 (4,5 mg) foi obtida a partir de ECIF, apresentou-se como um sólido amorfo branco.

O espectro de RMN de ^1H obtido para PV11 (Figura 43) apresenta a maioria dos sinais com deslocamentos químicos entre δ_H 0,70 e δ_H 2,05, característicos de substância de natureza triterpênica. Os sinais largos em δ_H 5,28 e 5,25 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H12 do ácido oleanólico e ursólico respectivamente. O sinal em δ_H 3,20-3,24 foi atribuído ao átomo de hidrogênio H3. O sinal em δ_H 2,80-2,84 foi atribuído ao H18 do ácido oleanólico e em δ_H 2,17-2,20 ao H18 do ácido ursólico.

Observou-se, também, a presença de um ácido graxo, evidenciado por um tripleto em δ_H 2,34 (t, $J = 7,5$ Hz) característico de hidrogênio ligado ao átomo de carbono α -carboxílico e um multipeto, de mesma intensidade, na região δ_H 1,60-1,66 característico de hidrogênio ligado ao átomo de carbono β -carboxílico.

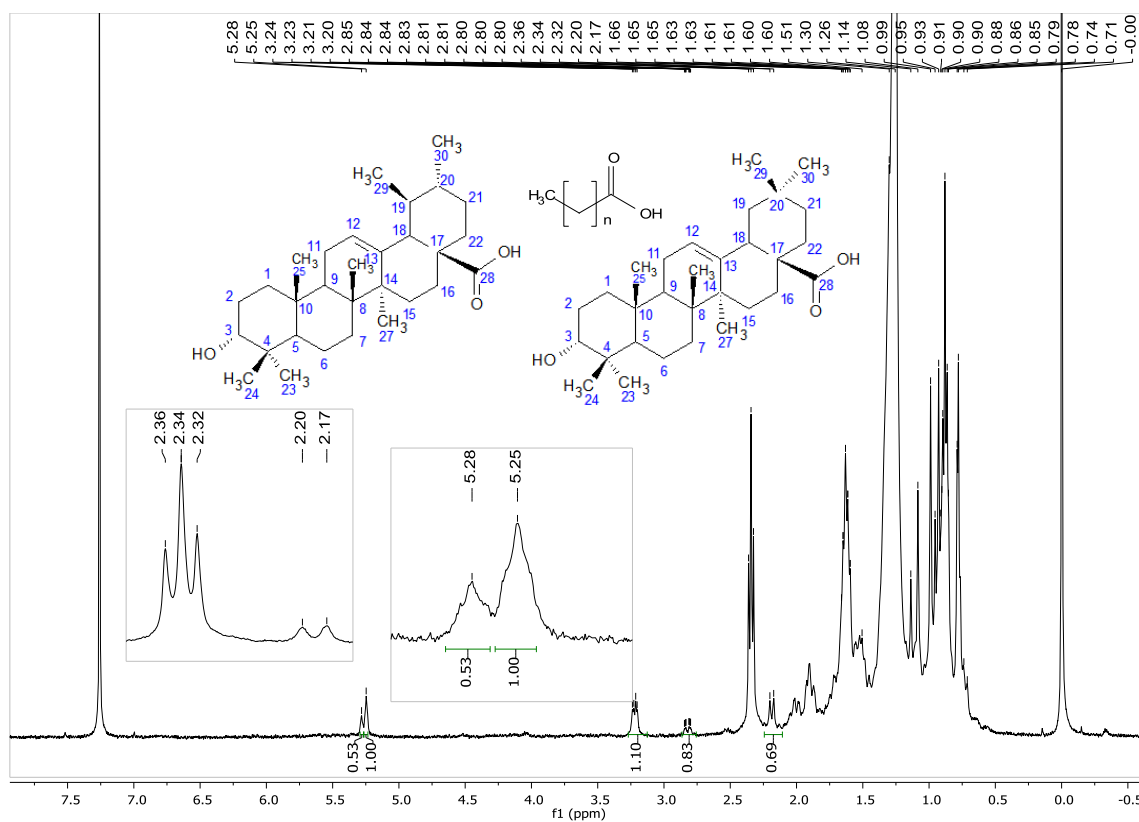


Figura 43: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) PV11 em CDCl_3 .

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 44) obtido para PV11 foi possível identificar o sinal em δ_{C} 182,88, referente à carboxila dos triterpenos, e o sinal em δ_{C} 178,59, atribuído à carboxila do ácido graxo contaminante da amostra. A partir do subespectro DEPT-135 (Figura 45, pág. 69) foi possível identificar três carbonos olefínicos com deslocamentos químicos em δ_{C} 144,78 (C), δ_{C} 137,9 (C) e δ_{C} 125,90 (CH). Os valores de deslocamentos químicos são semelhantes àqueles dos carbonos olefínicos dos ácidos oleanólico e ursólico, respectivamente.

Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para PV11, que permitiram sua identificação, e os valores relatados na literatura (VALADARES, 2009) para a mistura de ácido ursólico e oleanólico estão listados nas Tabela 23, pág.143 e Tabela 24, pág. 144.

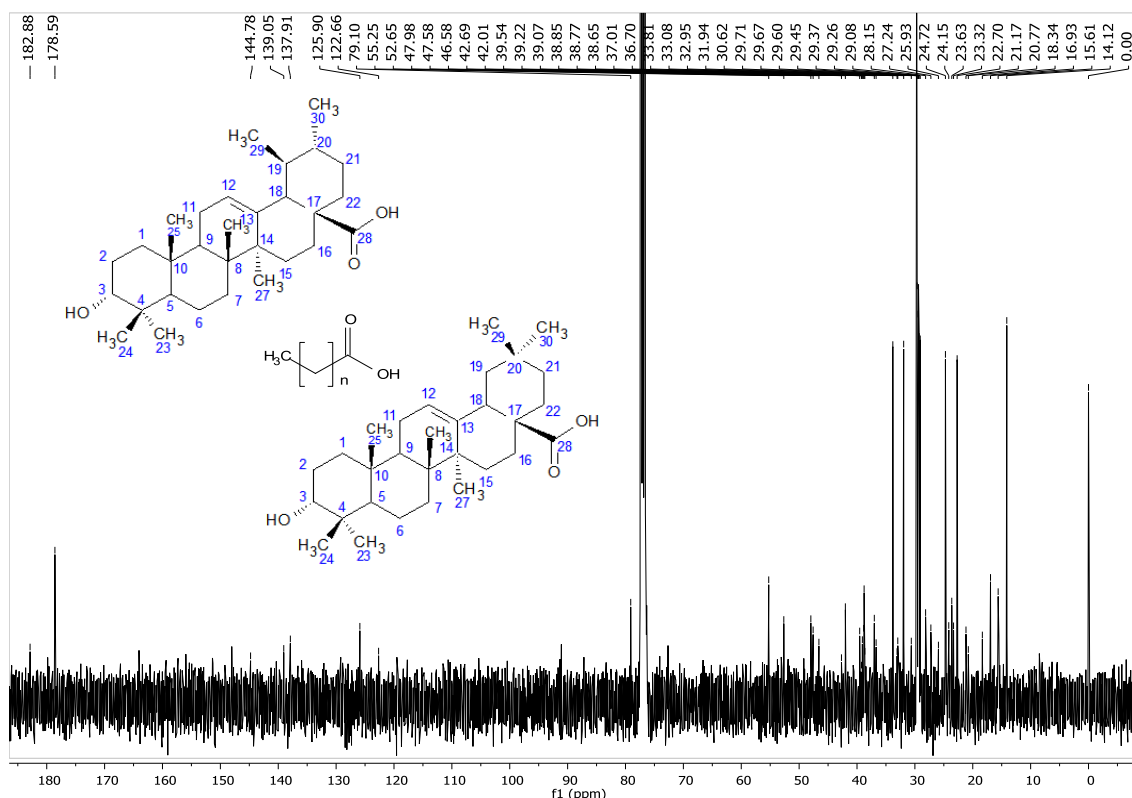


Figura 44: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PV11 em CDCl_3 .

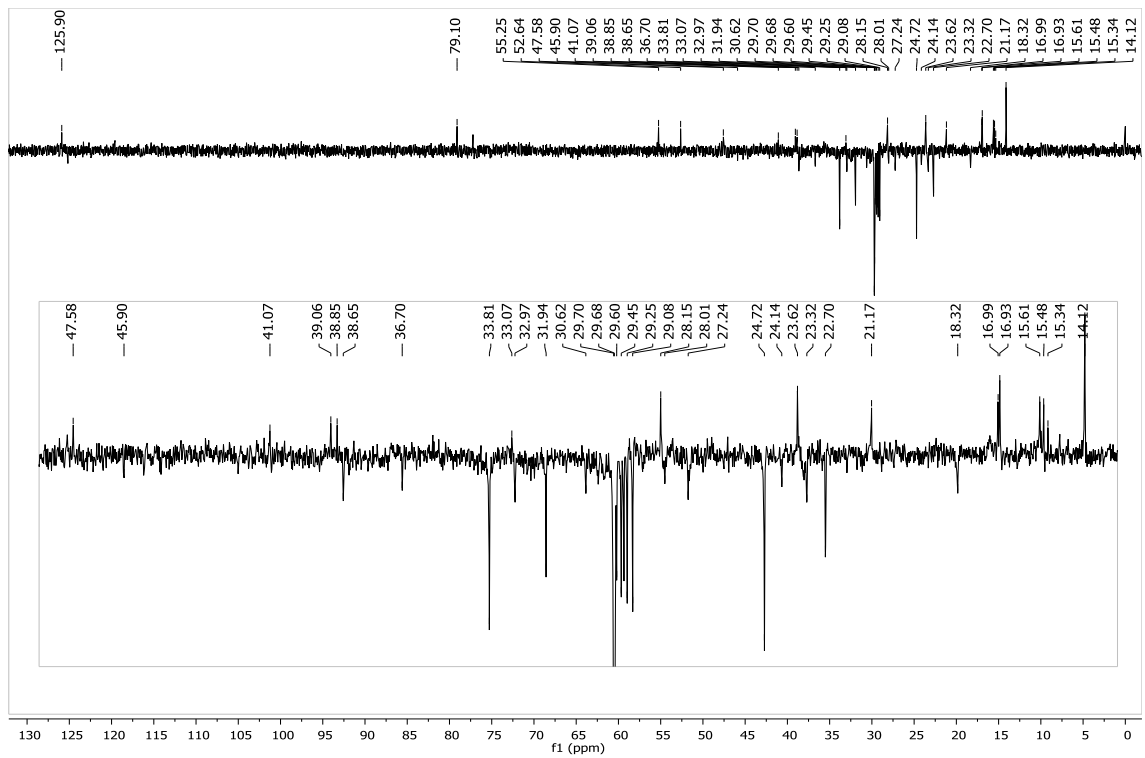


Figura 45: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de PV11 em CDCl₃.

1.2.12 – PV12: 1-Palmitil-glicerol (monopalmitina)

PV12 (5,5 mg) foi obtida a partir de ECIF, apresentou-se como um sólido ceroso.

No espectro no IV (Figura 46) obtido da amostra são observadas bandas em 3472 cm^{-1} , referente à ligação de grupo hidroxila e em 2928 e 2852 cm^{-1} características de estiramento da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos. A natureza alifática pode ser confirmada, também, pela presença de bandas de deformação angular de baixa intensidade dos grupos C-H referentes à alcanos alifáticos em 1464 cm^{-1} e uma banda de deformação angular de CH_2 em 722 cm^{-1} . Adicionalmente, observam-se uma banda intensa em 1742 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C=O de éster, e uma em 1168 cm^{-1} , referente à ligação C-O, concordantes para a ligação éster presente na estrutura geral de um monoacilglicerol.

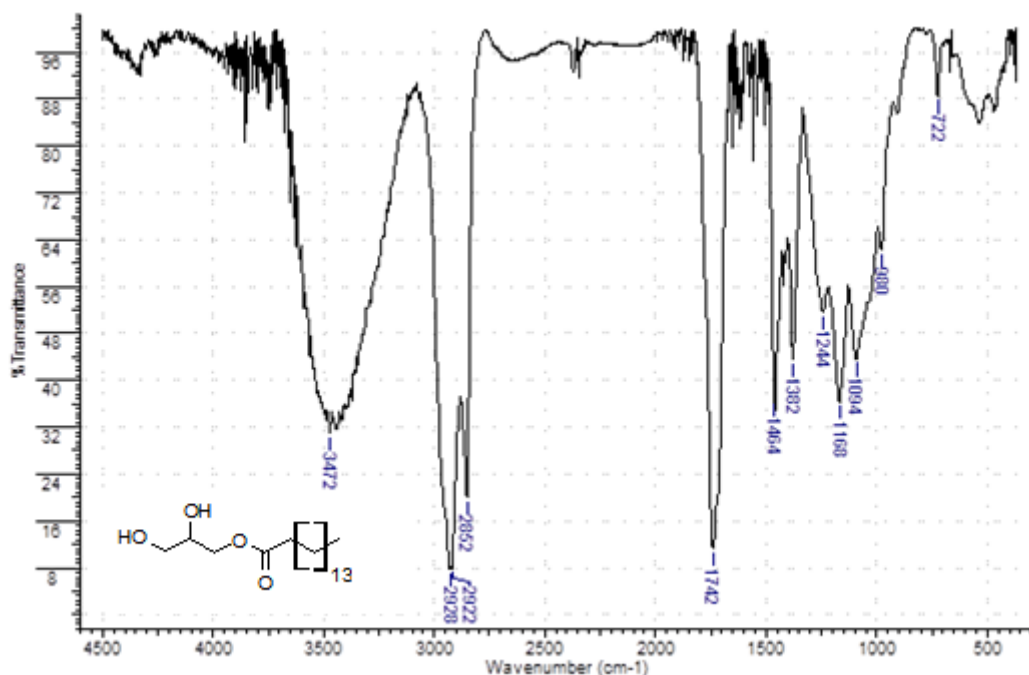


Figura 46: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV12 (KBr).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 47, pág. 71) obtido para PV12 observa-se que cada um dos cinco hidrogênios na porção glicerol proporciona um sinal distinto. Os dois dupletos duplos em δ_H 4,13 – 4,17 (dd, $J = 11,6$ e $6,1$ Hz) e 4,19 – 4,23 (dd, $J = 11,6$ e $4,6$ Hz) foram atribuídos aos átomos de hidrogênio do carbono 1. Os dois

dupletos duplos em δ_H 3,59-3,62 (dd, $J = 11,4$ e $5,8$ Hz) e 3,68-3,72 (dd, $J = 11,5$ e $3,9$ Hz) foram atribuídos aos dois átomos de hidrogênio ligados ao átomo de carbono 3. O multiplete em δ_H 3,91-3,95 foi atribuído ao átomo de hidrogênio ligados ao átomo de carbono 2. O triplete em δ_H 2,35 (t, $J = 7,4$ Hz) foi atribuído à sobreposição dos sinais dos átomos de hidrogênio ligados ao carbono 5 e dos átomos de hidrogênio das hidroxilas, dando este sinal um valor de integração 4. O triplete em δ_H 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz) foi atribuído aos átomos de hidrogênio do grupo metila (MARCEL *et al.*, 1995).

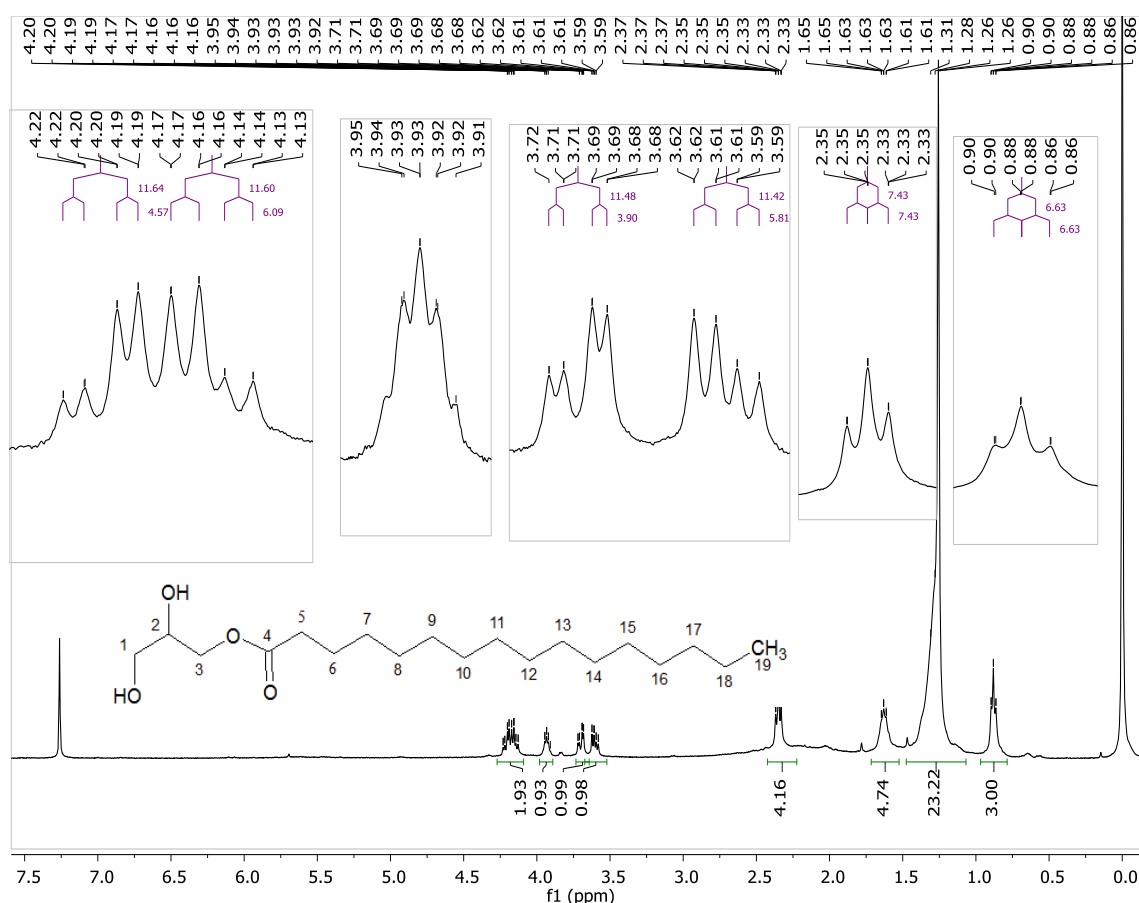


Figura 47: Espectro de RMN de 1H obtido para PV12 (400 MHz, $CDCl_3$).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 48, pág. 72) o sinal em δ_C 174,37 foi atribuído à carbonila do éster. No subespectro DEPT-135 (Figura 49, pág. 72) obtido foi possível atribuir os sinais em δ_C 65,19 e 63,36 aos átomos de carbono hidroxilados metilênicos (CH_2) e o sinal em δ_C 70,31 ao átomo de carbono metínico (CH). Os dados de RMN de ^{13}C de PV12 foram comparados com os dados da

literatura (GUNSTONE, 1991), para 1-palmitil-glicerol e estão apresentados na Tabela 25, pág. 145.

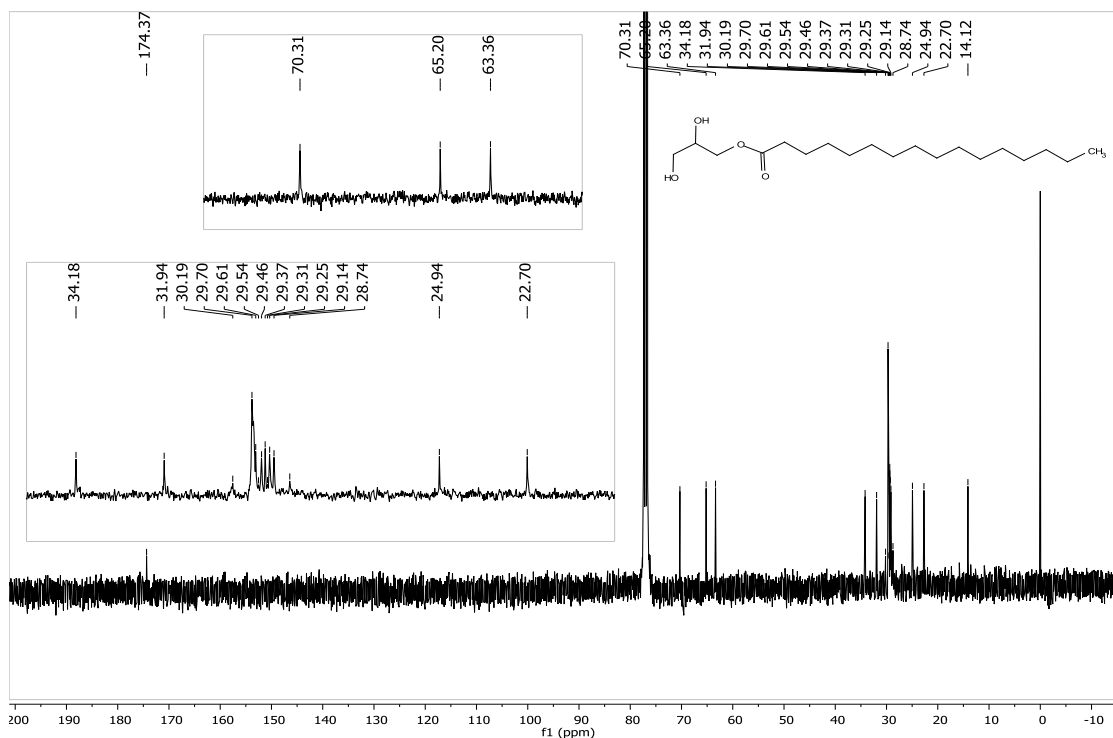


Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV12 (100 MHz, CDCl_3).

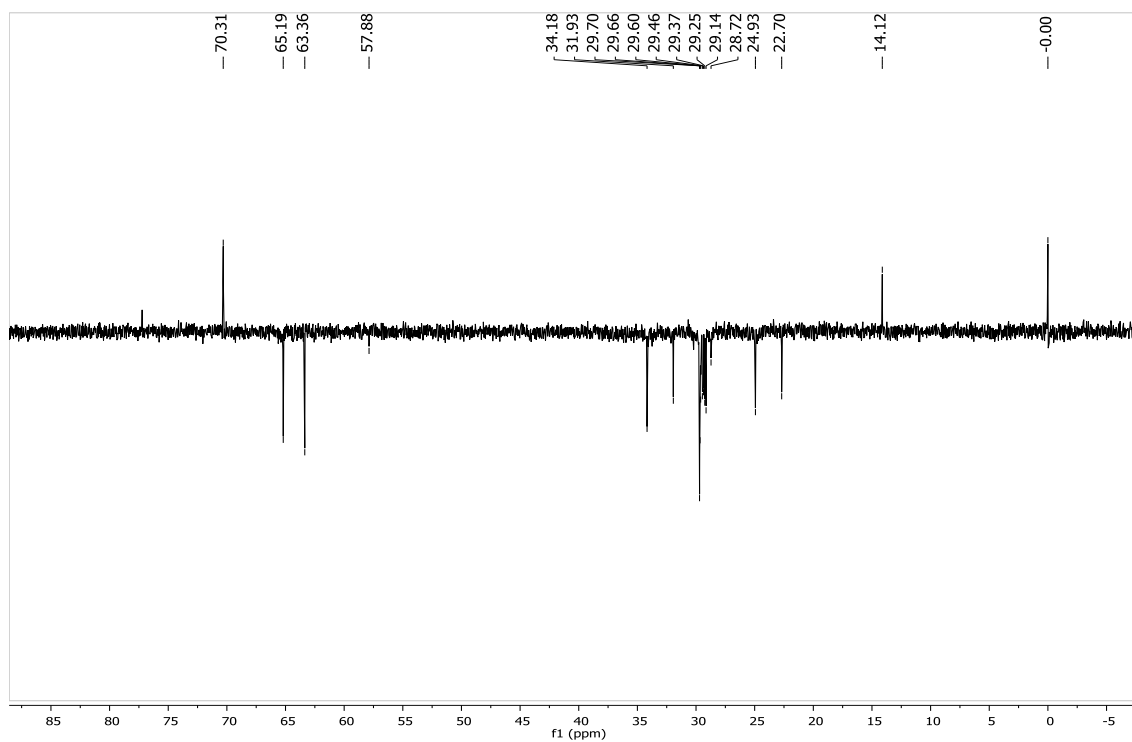


Figura 49: Subespectro DEPT-135 obtido para PV12 (100 MHz, CDCl_3).

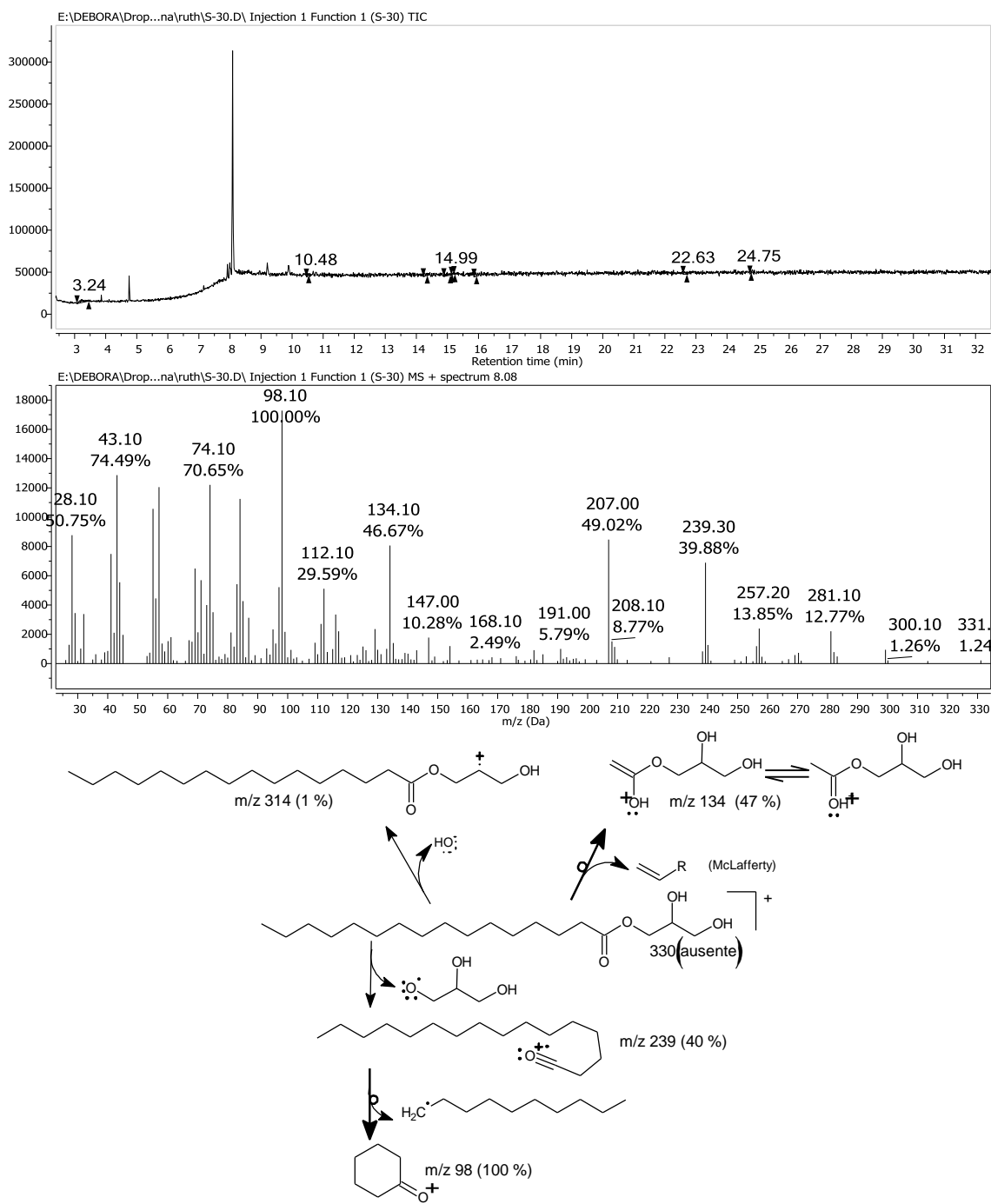


Figura 50: Cromatograma e espectro de massas de PV11, obtidos por GC-EM e possíveis caminhos de fragmentação.

O espectro de massas (GC-EM) reforça a identificação da estrutura do composto. O pico em m/z 331,1 (1%) foi atribuído a $[M+1]^{\pm}$, o pico em m/z 239 (40%) refere-se ao fragmento do íon acílio $[RCO]^{\pm}$, o pico em m/z 98 (pico base) refere-se a um fragmento originado de um rearranjo do íon acílio, conforme proposto na Figura 50. Estas fragmentações são comuns em monoacilgliceróis (SCHULTEN *et al.*, 1987), como por exemplo, na monopalmitina.

1.2.13 – PV13: Mistura de β -sistosterol e estigmasterol glicosilado

A mistura (29,1mg) dos esteroides glicosilados (PV13), 3-O- β -D-glicosil- β -sistosterol e 3-O- β -glicosil-estigmasterol, foi obtida a partir da fração insolúvel, proveniente da marcha química realizada com EMeF. PV13 foi isolado como um sólido branco, amorfo, pouco solúvel em CHCl_3 .

No espectro na região do IV (Figura 51) é possível observar banda de absorção em 3400 cm^{-1} característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, bandas em $2960\text{--}2852\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, e em 1466 e 1368 cm^{-1} características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos. Também foram observadas duas bandas fortes em 1074 e 1023 cm^{-1} características de estiramento da ligação CO de álcool.

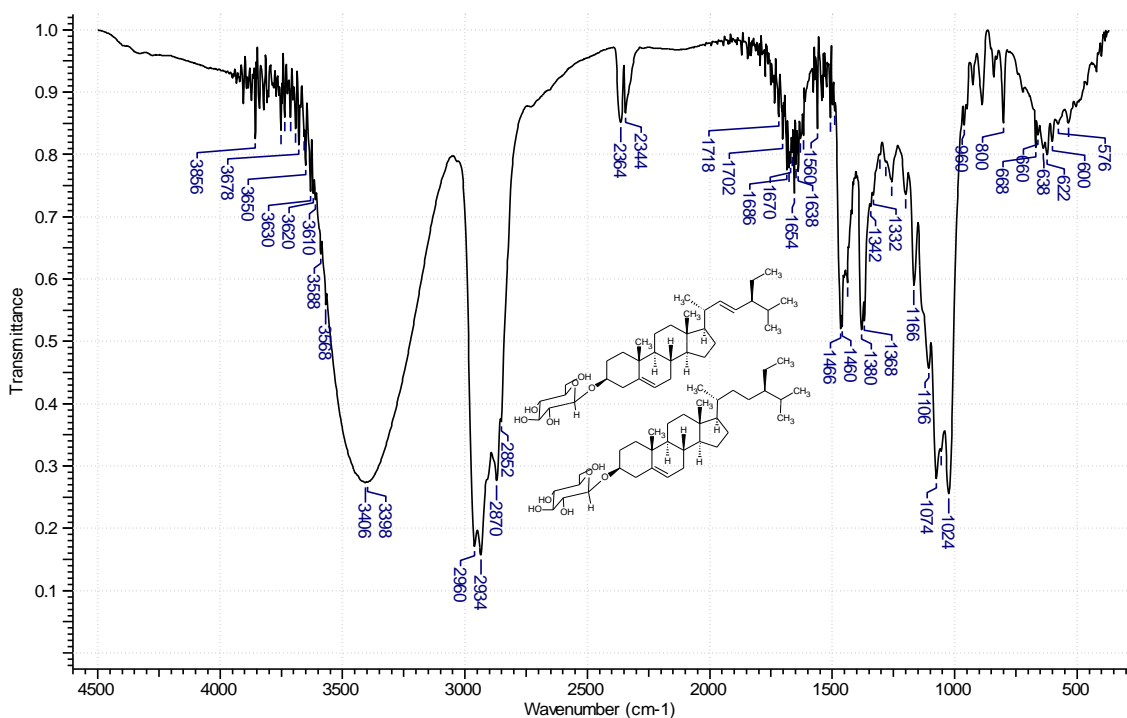


Figura 51: Espectro na região do IV de PV13 (KBr).

No espectro de RMN de ^1H obtido para PV13 (Figura 52, pág. 75) são observados sinais múltiplos na região entre, δ_H 0,66-2,40 correspondentes aos sinais dos átomos de hidrogênio metílicos, metilênicos e metínicos, típicos de esqueleto de esteroide. Foi observado um sinal largo em δ_H 5,30 e um multipletto em δ_H 5,01-5,22

atribuídos aos átomos de hidrogênio olefínicos H6 da mistura de esteroides e H22 e H23 do estigmasterol. Os sinais em δ_H 4,58–3,60 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio das moléculas de glicose.

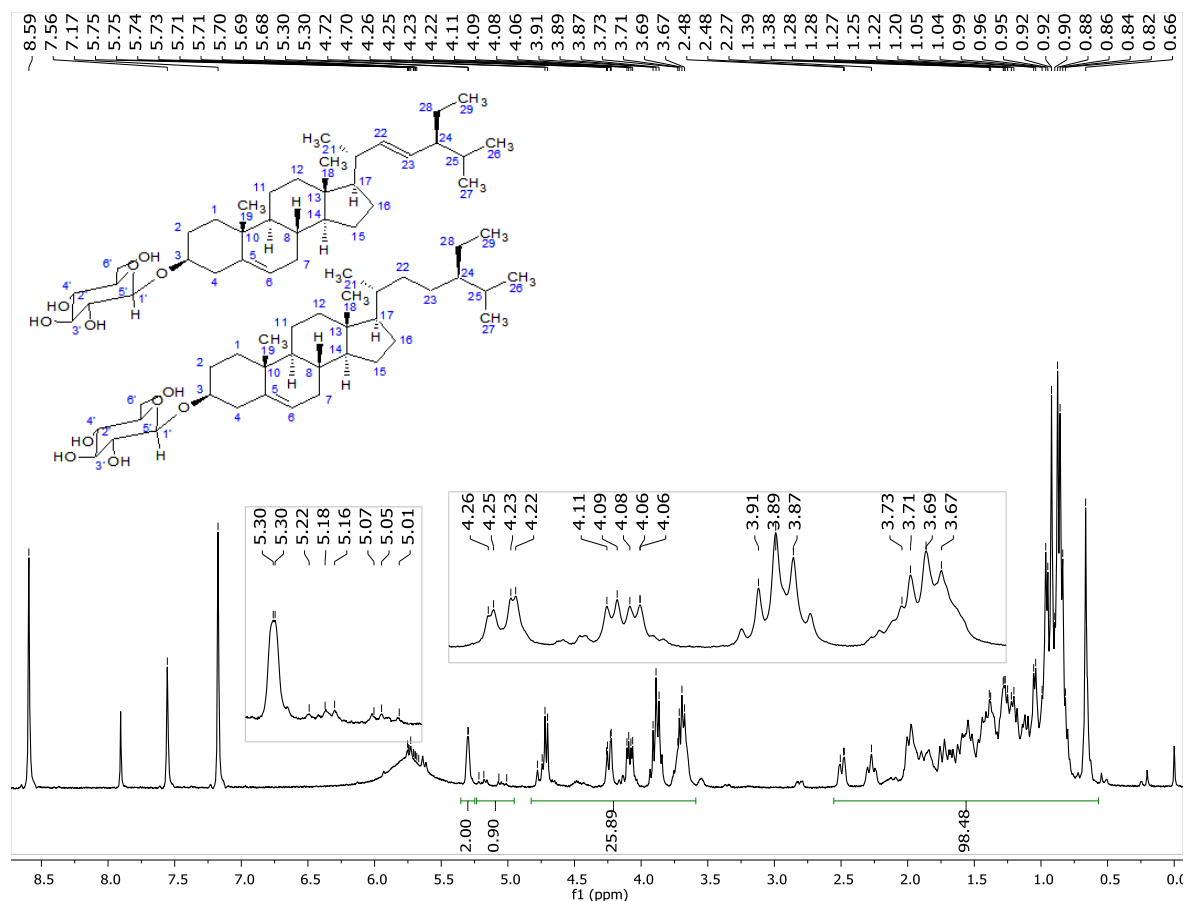


Figura 52: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PV13 em CDCl_3 +Piridina- d_5 .

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 53, pág. 76) e subespectro DEPT-135 (Figura 54, pág. 76) são observados um sinal em δ_C 78,15, atribuído ao C3, sinais em δ_C 140,52 e 121,65, atribuídos aos carbonos olefínicos C5 e C6, e sinais em δ_C 102,90 e 102,01, atribuídos aos átomos de carbono anoméricos (C1') do estigmasterol e β -sitosterol glicosilados, respectivamente.

Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para PV13, que permitiram sua identificação, e os valores relatados na literatura para β -sitosterol glicosilado (SILVA, 2014) e estigmasterol glicosilado (EL-ASKARY, 2005) estão listados nas Tabela 26, pág. 145.

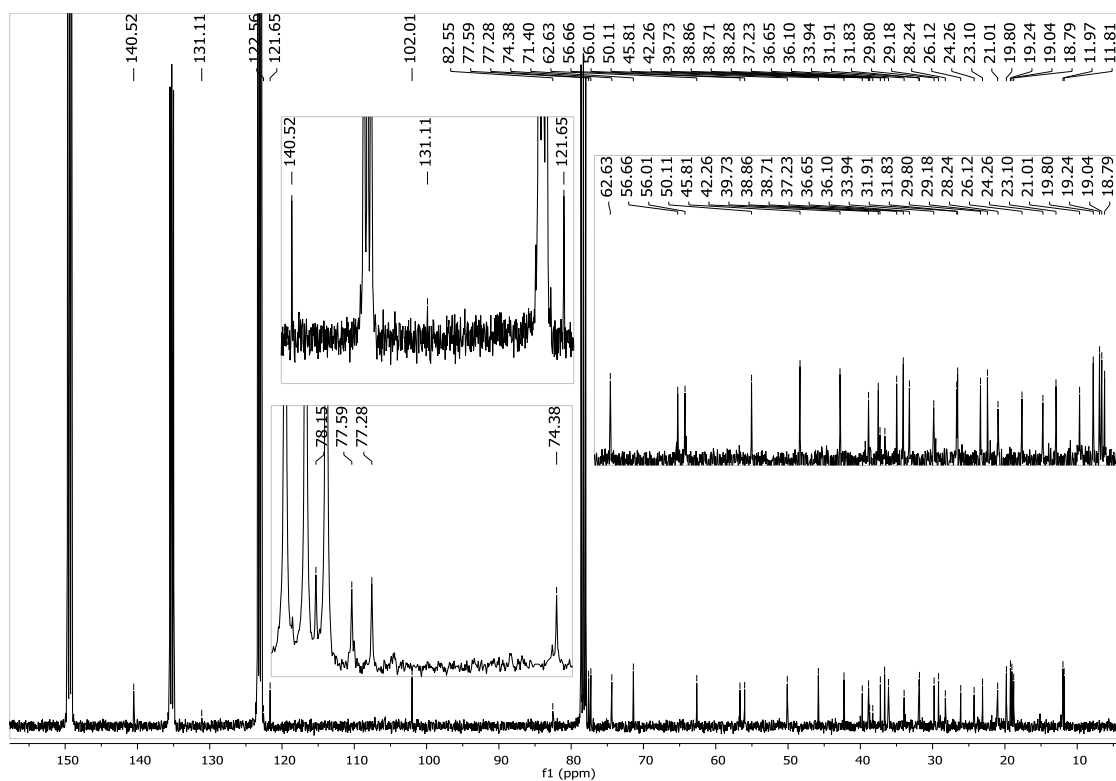


Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PV13 em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

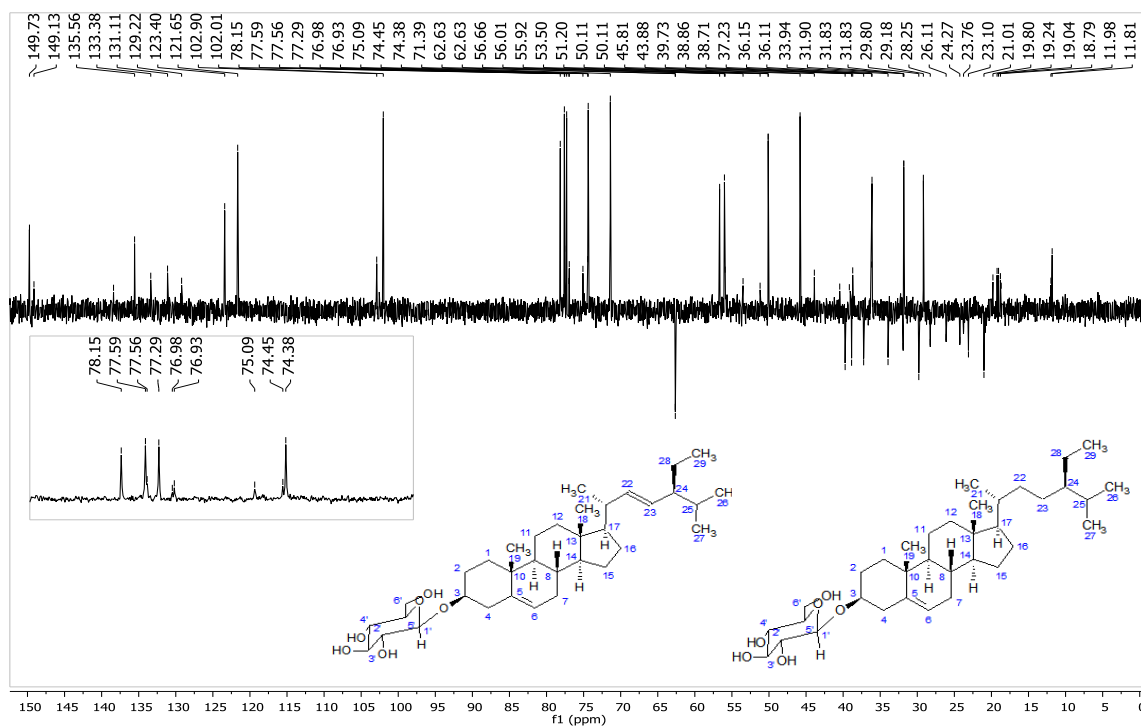


Figura 54: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de PV13 em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

1.2.14 – PV14: N,N-Dimetiltriptamina

PV14 foi obtida a partir do EMeF, em ambas as metodologias utilizadas, CC e extração ácido base. Neste último foi possível obter PV14 dos extratos clorofórmicos ácido (ECIAc), neutro (ECINt) e alcalino (ECIAlc).

PV14 apresentou-se como um sólido amarelo claro, ceroso, solúvel em metanol. A análise por CCD deste sólido, em eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ e atmosfera de amônia, evidenciou a existência de uma mancha de cor vermelho tijolo em revelador reagente de Dragendorff, e em revelador, solução de vanilina perclórica, apresentou uma mancha avermelhada que descorava com o tempo ficando roxo escura após 48 horas (Figura 55).

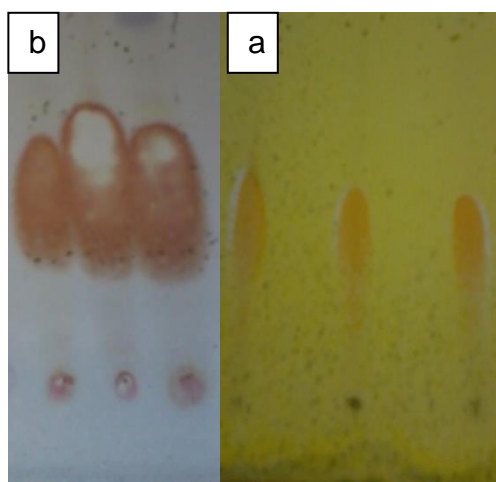


Figura 55: Fotos das cromatoplas obtidas por CCD analítica, de PV14. Fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3) em atmosfera de amônia; (a) revelação com solução de vanilina perclórica e (b) reagente de Dragendorff.

No espectro no IV (Figura 56) obtido da amostra observam-se bandas em $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$, típicas de estiramento N-H em amina secundária de anel indólico, bandas em $3140\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento C-H de anel aromático, bandas em 1456 e 1422 cm^{-1} características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos. Observam-se, também, bandas em 750 , 744 cm^{-1} características de deformação angular de ligação C-H em anel aromático orto-substituído.

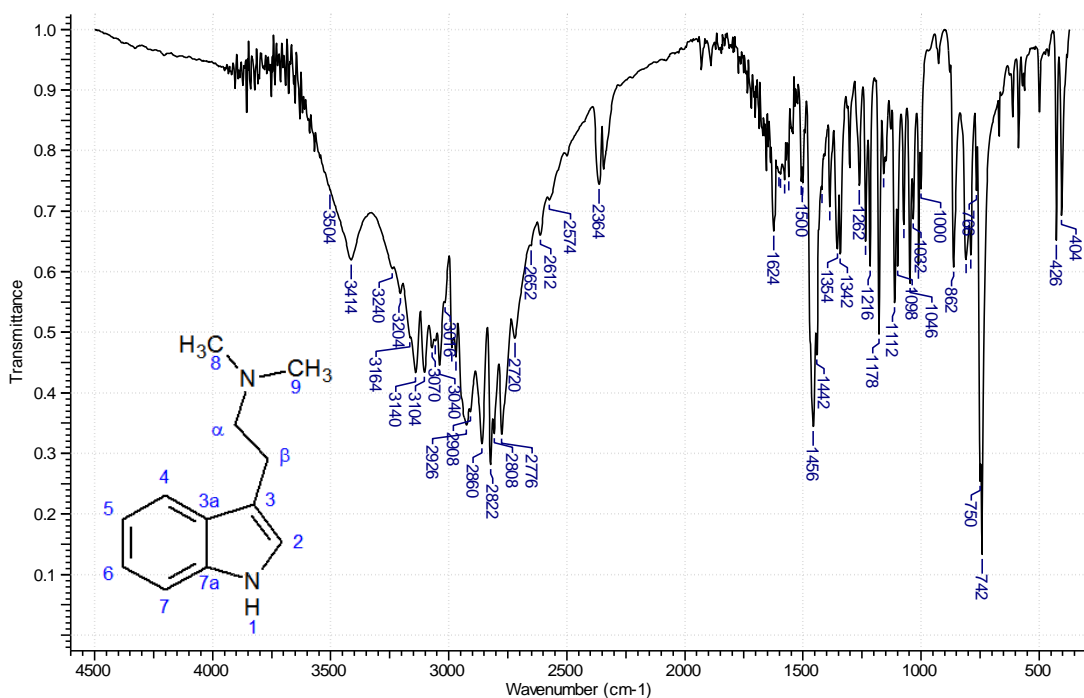


Figura 56: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV14 (KBr).

No espectro de RMN de ¹H (Figura 57, pág. 79) obtido para PV14 observam-se um sinal largo em δ_H 2,39, referente aos átomos de hidrogênio metílicos (6 H), dois multipletos entre δ_H 2,50-2,93 correspondentes aos dois grupos metilênicos, um multipletto entre δ_H 6,92-7,09 correspondente aos átomos de hidrogênio 2, 5, e 6 do anel indólico, e dois dupletos em δ_H 7,29 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H) e 7,49 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H) correspondentes aos átomos de hidrogênio 4 e 7 deste anel.

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 58, pág. 79) e no subespectro DEPT-135 (Figura 59, pág. 80), é possível observar sinais entre δ_C 112,25 a 138,15 atribuídos aos deslocamentos químicos, característicos dos átomos de carbono do anel indólico, sinais em δ_C 24,16 e 61,33 atribuídos aos deslocamentos químicos dos grupos metilênicos, e um sinal intenso, em δ_C 45,29, atribuído ao deslocamento químico dos grupos metila.

Os dados de RMN de ¹³C de PV14 foram comparados com os dados da literatura (GAUJAC *et al.*, 2013), para N,N-dimetiltriptamina (DMT) (Tabela 27, pág. 147) e foram similares.

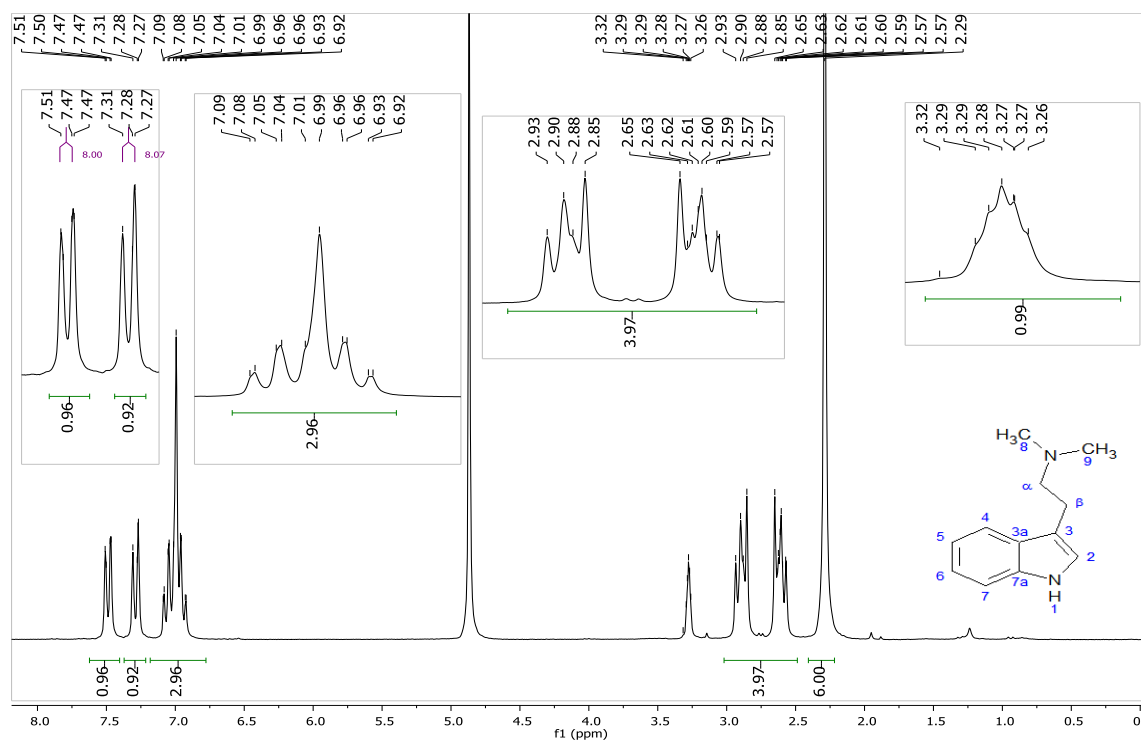


Figura 57: Espectro de RMN de ^1H obtido para PV14 (50 MHz, CD_3OD).

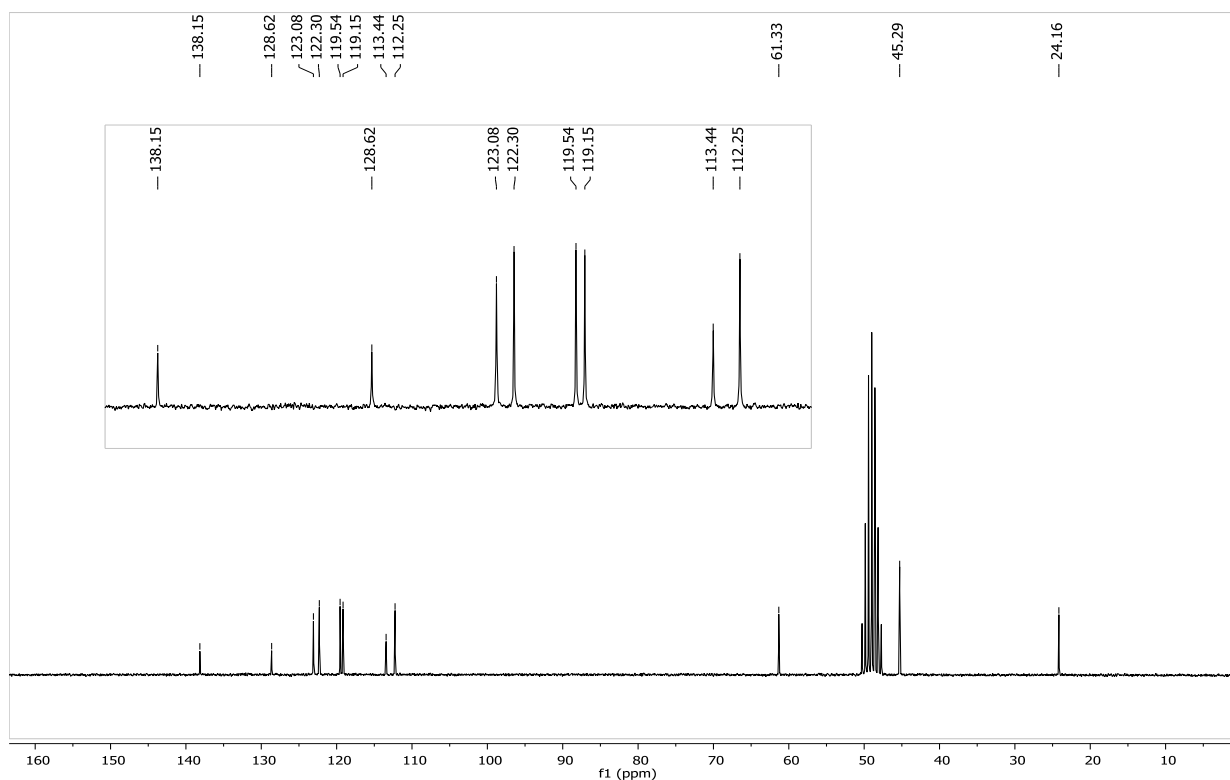


Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV14 (50 MHz, CD_3OD).

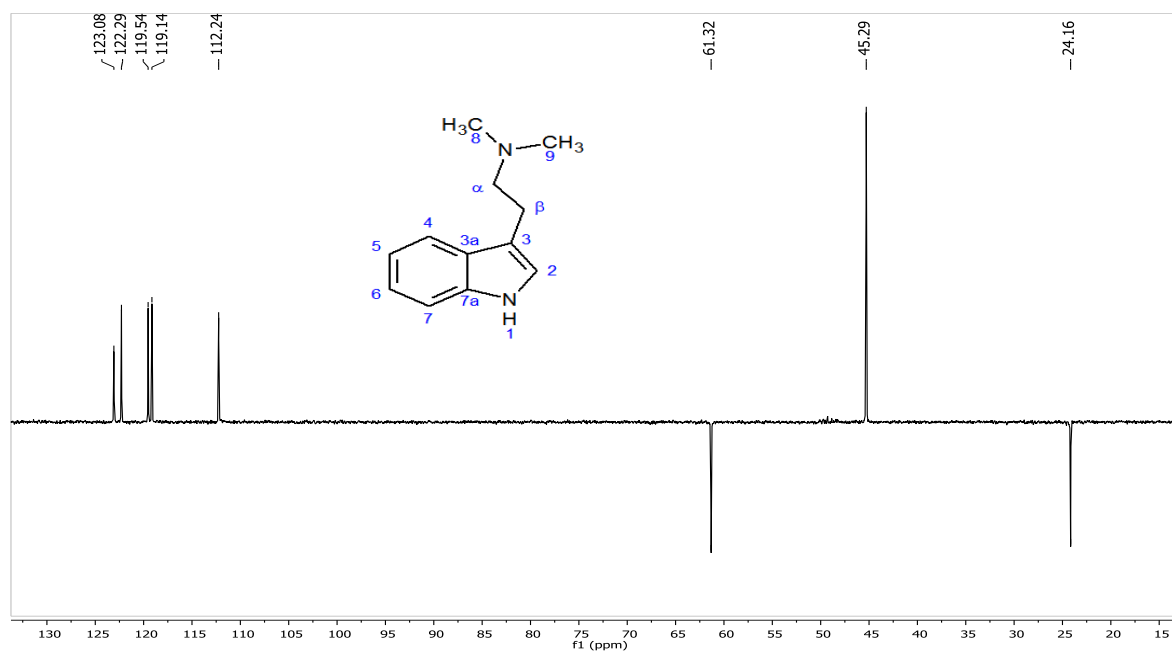


Figura 59: Subespectro DEPT-135 obtido para PV14 (50 MHz, CD₃OD).

A identificação do DMT foi confirmada pelo espectro de massas de alta resolução obtido por LCMS-ESI-IT-TOF (Figura 60). A presença do íon em m/z 189,1359 confirmou a estrutura do composto com erro de 14,28 ppm para a fórmula molecular calculada (189,1386). Esse íon refere-se à massa do composto com um hidrogênio a mais $[M+H]^+$.

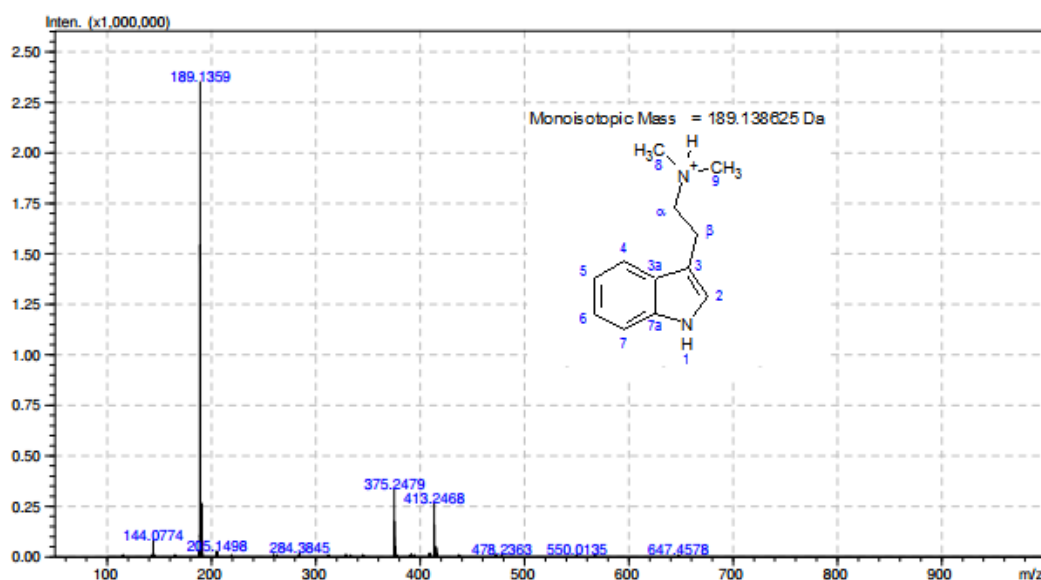


Figura 60: Espectro de massas de alta resolução, EM-ESI-IT-TOF, obtido para PV14.

1.2.15 – PV15: N-Metiltriptamina

PV15 foi obtida a partir do EMeF, em ambas as metodologias utilizadas, CC e extração ácido base. Neste último foi possível obter PV15 do ECIAC. A substância foi obtida, primeiramente, em mistura com a N,N-dimetiltriptamina (PV14, identificada por comparação com padrão) apresentando duas manchas principais em CCD, com o mesmo perfil de revelação e com boa separação (Figura 61). Para sua separação fez-se CCD preparativa (Figura 62) em sílica gel 60, tendo como fase móvel a mistura $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3) em atmosfera de amônia.

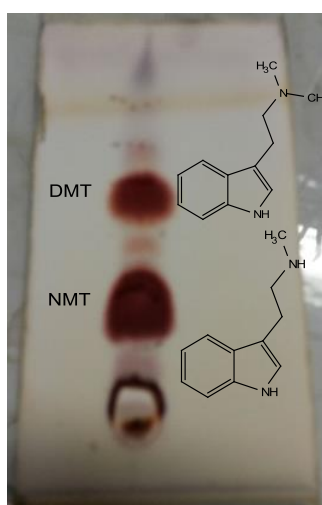


Figura 61: Foto de cromatoplaça obtida por CCD analítica, da fração AG60 a 64. Fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3) em atmosfera de amônia; revelação com solução de vanilina perclórica.



Figura 62: Foto da cromatoplaça obtida por CCD preparativa, da amostra AG60 a 64. Fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3) em atmosfera de amônia; revelação luz UV.

Após purificação, PV15 apresentou-se como um sólido castanho claro, ceroso, solúvel em metanol. A análise por CCD deste sólido, em eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ e atmosfera de amônia, evidenciou a existência de uma mancha vermelho tijolo em revelador reagente de Dragendorff (Figura 63), e em revelador solução de vanilina perclórica, apresentou uma mancha avermelhada que descorava com o tempo ficando roxo escura após 48 horas, padrão semelhante à PV14.

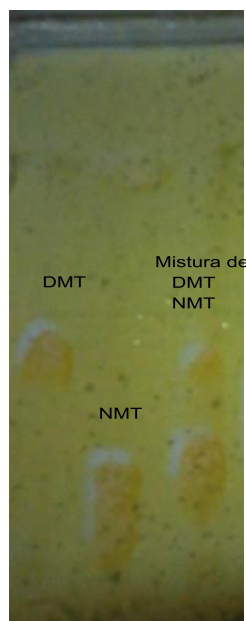


Figura 63: Foto da cromatoplaça obtida por CCD analítica, da fração AG60 a 64 após purificação por CCD preparativa. Fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3) em atmosfera de amônia; revelação com reagente de Dragendorff.

No espectro no IV (Figura 64) obtido da amostra observam-se bandas em 3407 cm^{-1} , típicas de estiramento N-H de amina secundária de anel indólico, em $3180\text{-}3054\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento C-H de anel aromático, em 2929 cm^{-1} características de estiramento de ligação CH de carbono sp^3 . Observa-se, também, banda em 737 cm^{-1} característica de deformação angular da ligação C-H de H adjacentes em anel aromático orto-substituído.

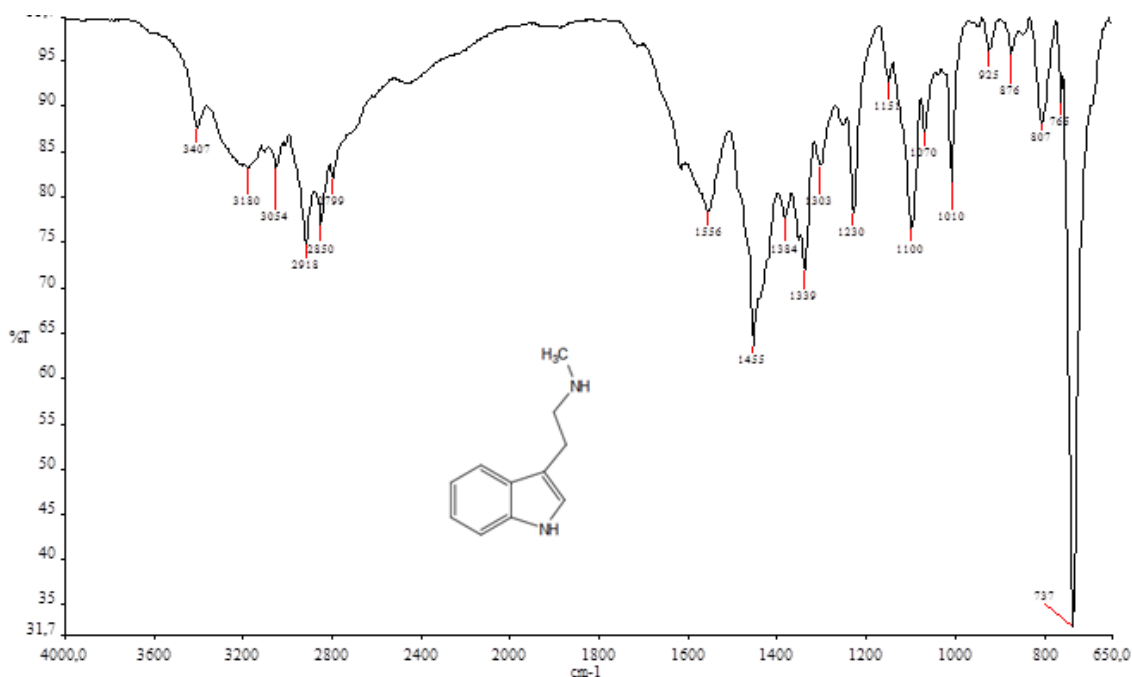


Figura 64: Espectro de absorção na região do IV obtido para PV15 (ATR).

A identificação do NMT foi reforçada pelo espectro de massas de alta resolução obtido por LCMS-ESI-IT-TOF (Figura 65). A presença do íon em m/z 175,1214 é coerente com a estrutura proposta do composto, com erro de 8,57 ppm para a fórmula molecular calculada (175,1229). Esse íon refere-se à massa do composto com um hidrogênio a mais [M+H].

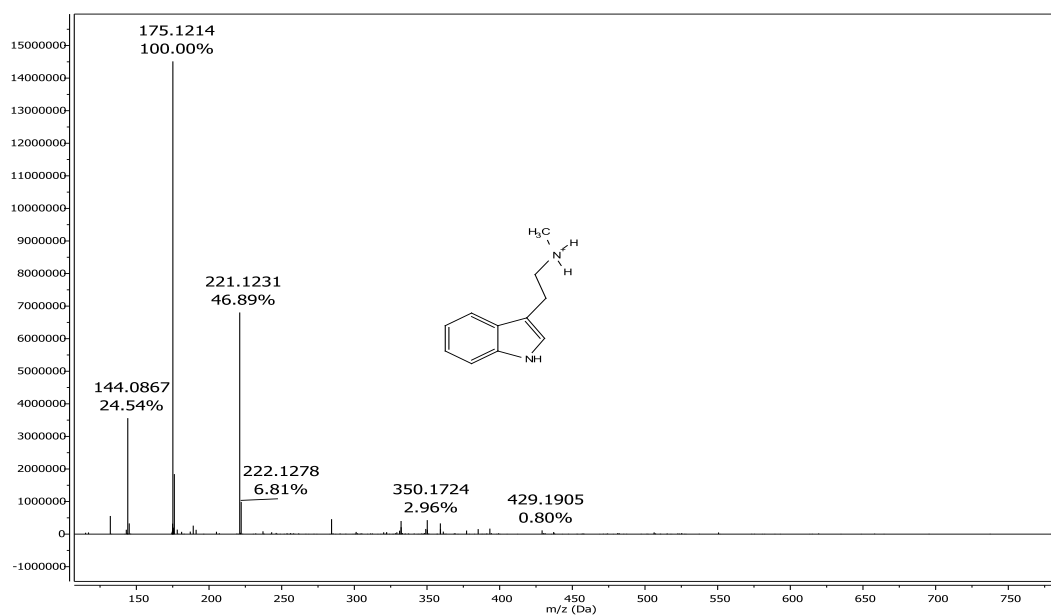


Figura 65: Espectro de espectro de massas de alta resolução, EM-ESI-IT-TOF, obtido para PV15.

1.2.16 – PV16: 4-*Epi*-metilquinato

PV16 (11,2 mg) foi obtida a partir da CC do EMeF. PV16 apresentou-se como sólido cristalino, em forma de agulhas, solúvel em metanol, com temperatura de fusão na faixa entre 159-161 °C.

No espectro no IV (Figura 66) obtido da amostra é possível observar bandas em 3446, 3408 e 3366, cm^{-1} características de estiramento de ligação OH. Também são observadas bandas em 2924 e 2958 cm^{-1} características de estiramento assimétrico da ligação CH de carbono sp^3 , e bandas em 1436 e 1370 cm^{-1} características de deformação angular no plano de ligação simples CH, e bandas características de estiramento de ligação C-O de álcool terciário em 1144 cm^{-1} e secundário em 1118-1078 cm^{-1} . Também foi observada banda em 1736 cm^{-1} característica de estiramento de ligação C-O da carbonila de éster.

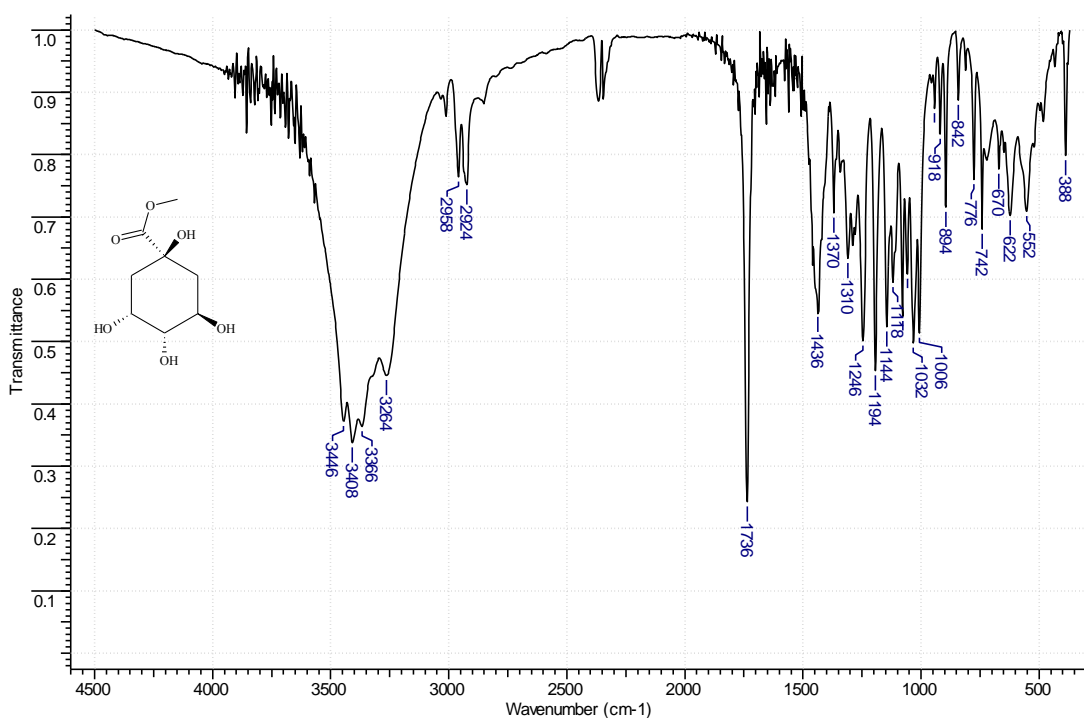


Figura 66: Espectro na região do IV de PV16 (KBr)

No espectro de RMN de ^1H (Figura 67, pág. 85) obtido para PV16, em CD_3OD são observados dois dupletos duplos, um em δ_H 1,66 - 1,71 (dd, 1H, H2e, $J = 13,7$ e 5,1 Hz) e outro em δ_H 1,81 - 1,85 (dd, 1H, H6e, $J = 13,4$ e 2,9 Hz), um multipletto entre δ_H 2,28 - 2,37, referente aos átomos de hidrogênio H6a e H2a, um dupletto

duplo em δ_H 3,72 - 3,75 (dd, 1H, $J = 5,7$ e $3,0$ Hz), referente ao átomo de hidrogênio H4, um simpleto δ_H em 3,77, referente aos três átomos de hidrogênio da metoxila. Foi possível observar, também, um multiplete entre 4,01 – 4,05 (1H), referente ao sinal do átomo de hidrogênio H3, e um multiplete entre 4,12 – 4,16 (1H), referente ao sinal do átomo de hidrogênio H5.

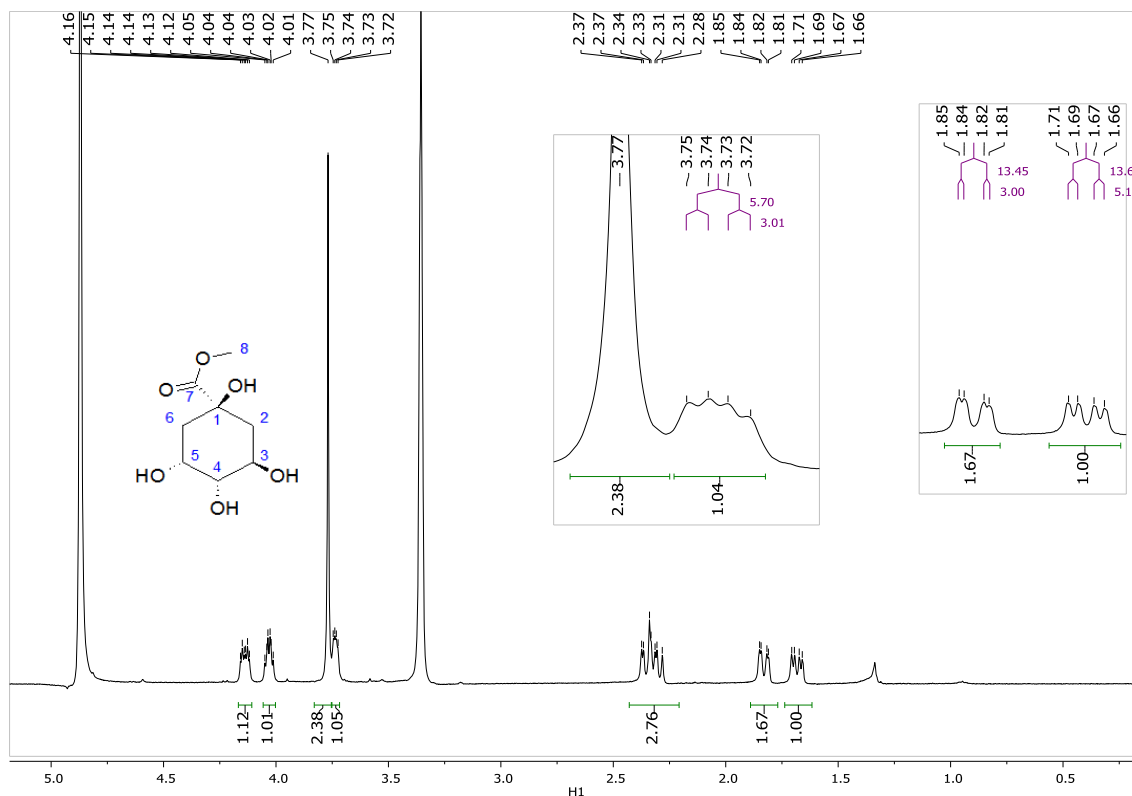


Figura 67: Espectro de RMN de ^1H obtido para PV16 (400 MHz, CD_3OD).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 68, pág. 86) é possível observar oito sinais que, a partir do subespectro DEPT-135, foram classificados como sendo três átomos de carbono metínicos, dois metilênicos, um metílico, e dois não hidrogenados, sendo um destes, em δ_H 176,12, referente a uma carbonila.

As atribuições dos dados espectrais de RMN de ^{13}C e de ^1H obtidos para PV16 e valores referenciados na literatura (ARMESTO *et al.*, 2006) para 4-*epi*-metilquinato estão listadas nas Tabela 8, pág. 90 e Tabela 9, pág. 91, e foram bem similares.

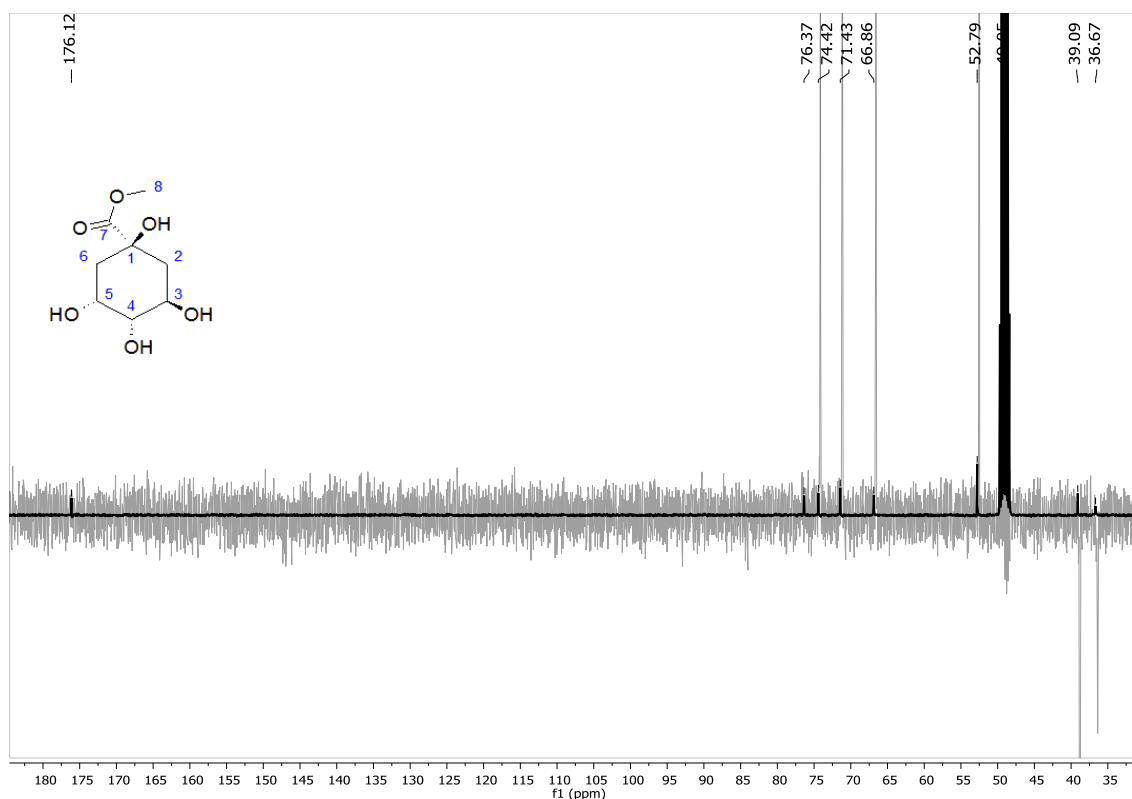


Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (em preto) e subespectro DEPT-135 (em cinza) obtido para PV16 (100 MHz, CD_3OD).

Para confirmação da estrutura química do composto, foi realizada uma análise detalhada dos espectros em duas dimensões (2D) heteronucleares (^1H , ^{13}C) HSQC e HMBC, e homonucleares (^1H , ^1H) COSY, para atribuição dos sinais de hidrogênio, e NOESY, para obtenção de informações sobre a estereoquímica de PV16.

No mapa de contornos HSQC pode-se confirmar a atribuição dos sinais dos respectivos espectros de 1D, já que foi possível observar acoplamentos carbono/hidrogênio a uma ligação. Os sinais dos átomos de hidrogênio H2e e H2a em δ_{H} 1,68 e 2,37, respectivamente, apresentam correlações com o sinal do átomo de carbono C2 em δ_{C} 36,67. Os sinais de H6e e H6a em δ_{H} 1,83 e 2,28 apresentam correlações com o sinal de C6 em δ_{C} 39,09, o sinal de H8 em δ_{H} 3,77 apresenta correlação com o sinal de C8 em δ_{C} 52,79, o sinal de H5 em δ_{H} 4,14 correlaciona com C5 em δ_{C} 66,86, o sinal de H3 em δ_{H} 4,03 correlaciona com o sinal de C3 em δ_{C} 71,43, e o sinal de H4 em δ_{H} 3,74 correlaciona com o sinal de C4 em δ_{C} 74,42 (C4) (Figura 69, pág. 87).

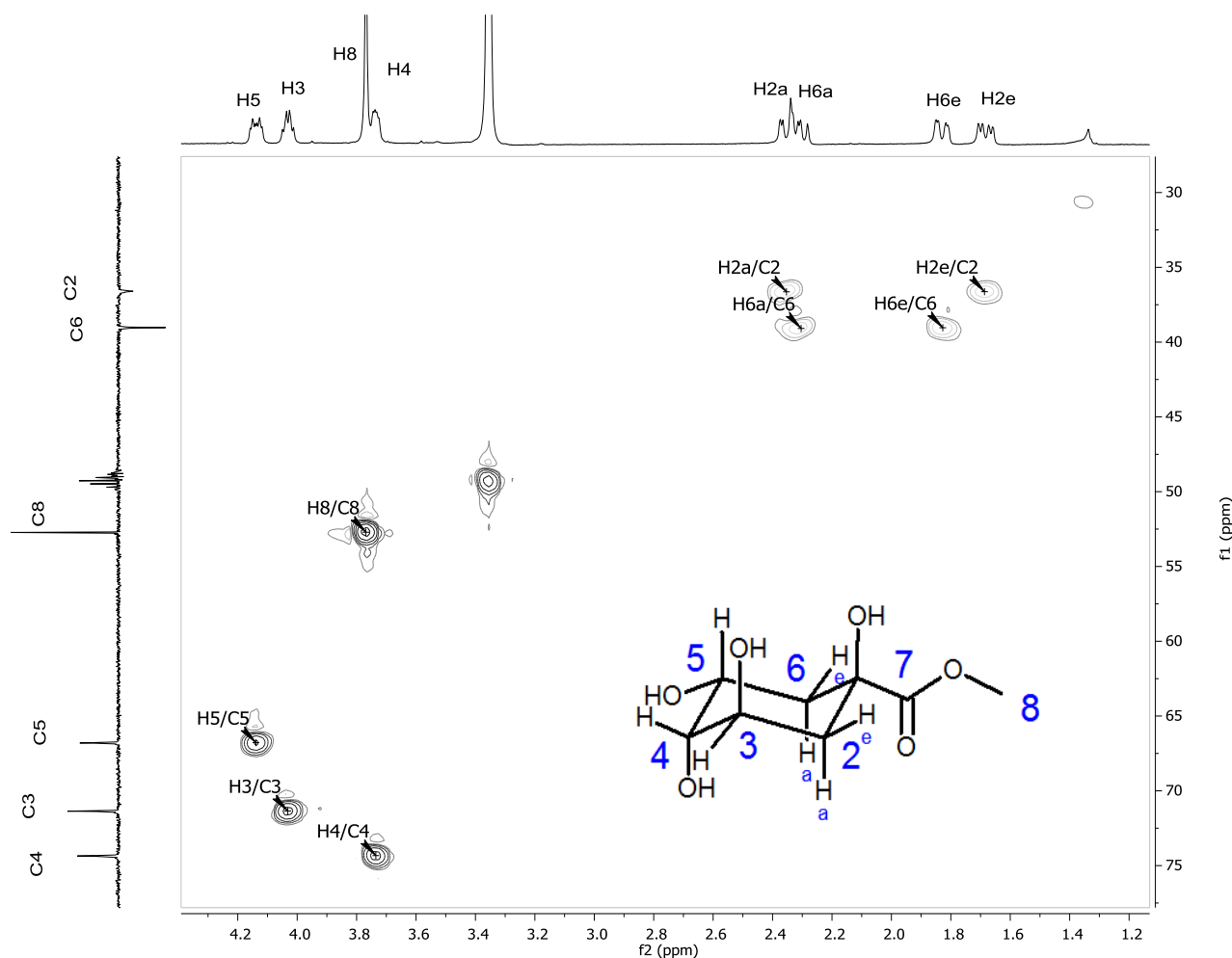


Figura 69: Mapa de contornos HSQC (400 MHz) de PV16 em CD_3OD .

No mapa de contornos HMBC observam-se correlações dos sinais dos átomos de hidrogênio H2e e H2a, em δ_H 1,68 e 2,37, com os sinais dos átomos de carbono C6 em δ_C 39,09, C3 em δ_C 71,43, C1 em δ_C 76,37 e C7 em δ_C 176,12 (Figura 70, pág. 88).

Observam-se, também, correlações dos sinais dos átomos de hidrogênio H6e e H6a, em δ_H 1,83 e 2,28, com os sinais dos átomos de carbono C2 em δ_C 36,67, C5 em δ_C 66,86, C1 em δ_C 76,37 e C7 em δ_C 176,12 (Figura 70).

O átomo de hidrogênio H4 em δ_H 3,74 apresentou correlação com o átomo de carbono C3 em δ_C 71,43, e o sinal do átomos de hidrogênio de H8 apresentou correlação com C7 em δ_C 176,12. O átomo de hidrogênio H3 em δ_H 4,03 apresentou correlação com o átomos de carbono C2 em δ_C 36,67, C5 em δ_C 66,86, C4 em δ_C 74,42 e C1 em δ_C 76,37.

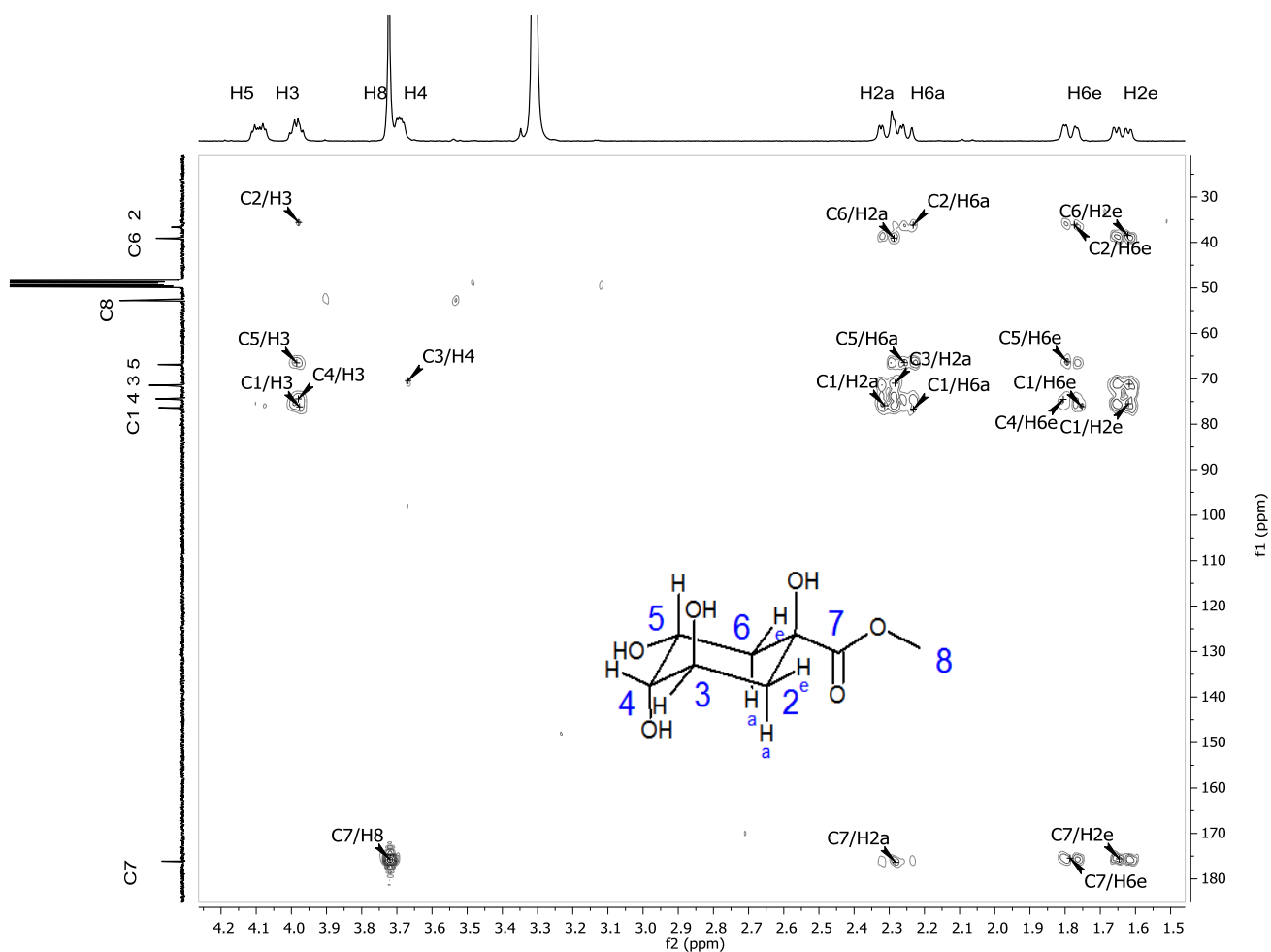


Figura 70: Mapa de contornos HMBC (400 MHz) de PV16 em CD_3OD .

No mapa de contornos COSY (Figura 71, pág. 89), o sinal do átomo de hidrogênio H2e em δ_H 1,68 apresenta correlações com os sinais de H2a em δ_H 2,37 e H3 em δ_H 4,03. O sinal de H2a em δ_H 2,37 apresenta correlações com os sinais de H6a em δ_H 2,28, H2e em δ_H 1,68 e H3 em δ_H 4,03.

O sinal do átomo de hidrogênio H6e em δ_H 1,83 apresenta correlações com os sinais de H6a em δ_H 2,28 e H5 em δ_H 4,14. Sinal de H6a em δ_H 2,28 apresenta correlações com os sinais de H6e em δ_H 1,83 e H5 em δ_H 4,14.

O sinal do átomo de hidrogênio H4 em δ_H 3,74 apresenta correlações com os sinais de H3 em δ_H 4,03 e H5 em δ_H 4,14.

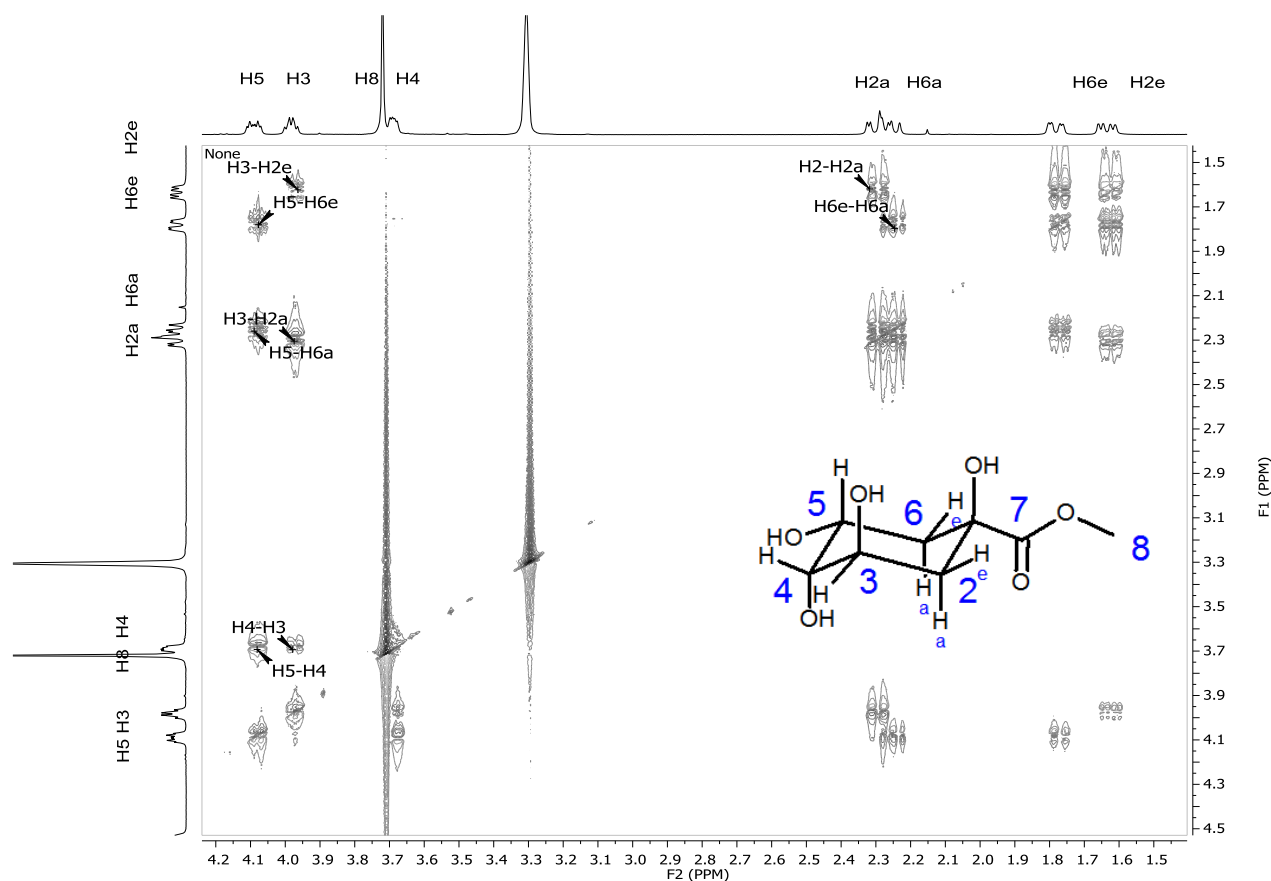


Figura 71: Mapa de contornos COSY (400 MHz) de PV16 em CD_3OD .

No mapa de contornos NOESY o sinal do átomo de hidrogênio H2e em δ_H 1,68 apresenta correlações com os sinais de H2a em δ_H 2,37 e de H3 em δ_H 4,03. O sinal de H2a em δ_H 2,37 apresenta correlações com os sinais de H3 em δ_H 4,03 (Figura 72, pág. 90). O sinal do átomo de hidrogênio H6e em δ_H 1,83 apresenta correlações com os sinais de H6a em δ_H 2,28 e de H5 em δ_H 4,14. O sinal do átomo de hidrogênio H4 em δ_H 3,74 apresenta correlações com os sinais de H3 em δ_H 4,03 e de H5 em δ_H 4,14..

No mapa de contornos COSY, também é observada mancha de correlação de H6a em δ_H 2,28 com H5 em δ_H 4,14. Essa correlação não seria possível na conformação mais estável, visto que nessa posição os átomos de hidrogênio H5 e H6a estão em posição antiperiplanar. São observadas, também, manchas de correlação de H2e (δ_H 1,68) e H6e (δ_H 1,83) com H4 (δ_H 3,74), essa correlação também não seria possível na conformação mais estável, visto que esses átomos encontram-se muito distantes uns dos outros. A partir dessas observações, foi possível afirmar que, em solução, existe o equilíbrio com a conformação menos estável em que H6 axial vai para a posição equatorial, o que possibilita a correlação

com H5. E H2 e H6, na posição equatorial, vão para a posição axial, o que possibilita a interação 1,3 diaxial com H4.

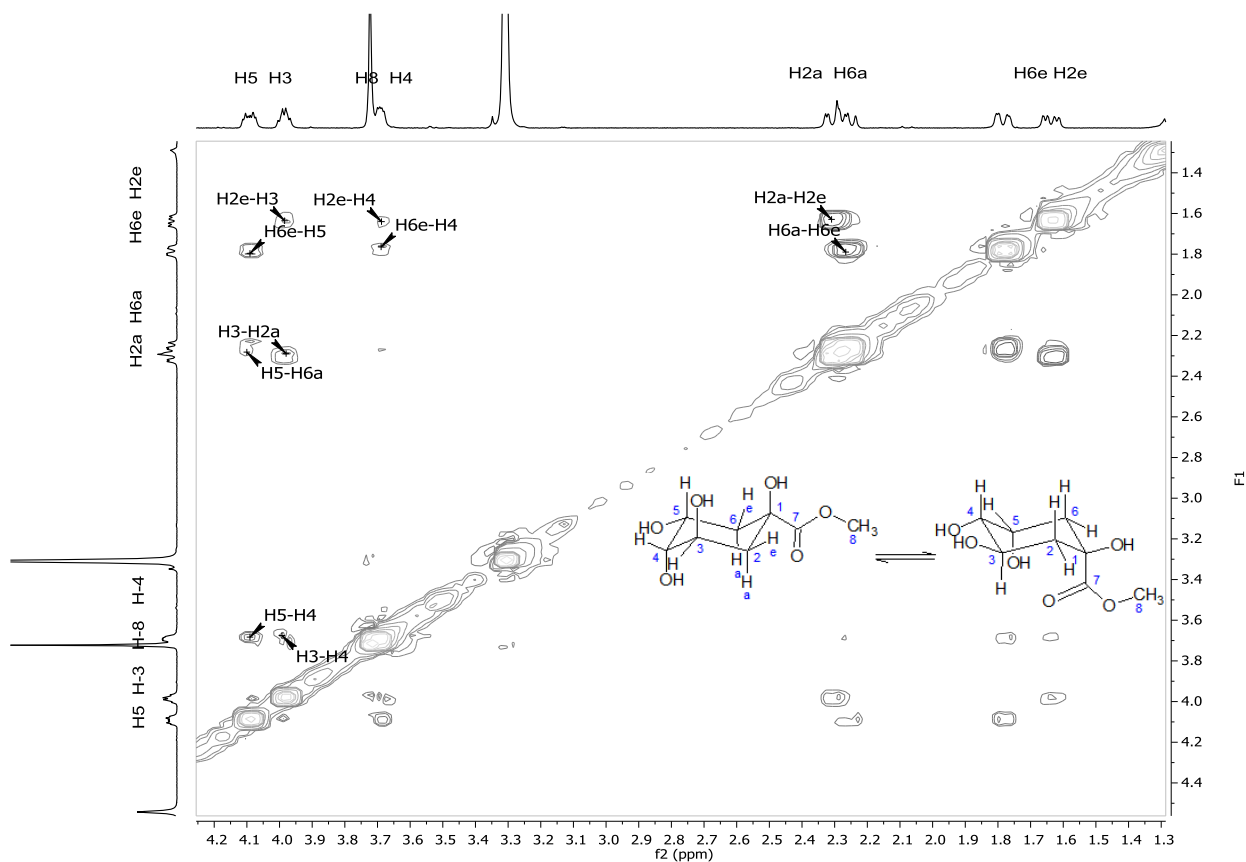
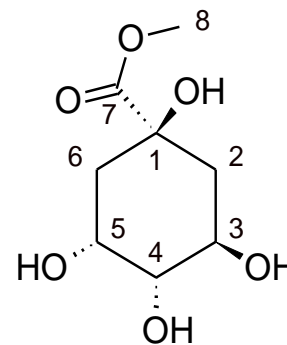


Figura 72: Mapa de contornos NOESY (400 MHz) de PV16 em CD₃OD.

As análises dos mapas de contornos HSQC, HMBC, COSY e NOESY permitiram atribuir todos os deslocamentos químicos de H e C para PV16, bem como definir sua estereoquímica.

Tabela 8: Comparação dos dados de RMN de ¹³C de PV16 com os dados da literatura para 4-*epi*-metilquinato

Carbono	4- <i>epi</i> -metilquinato δ (ppm)*	PV16 δ_c (ppm)**
C1	76,2	76,37
C2	36,7	36,67
C3	71,2	71,43
C4	74,4	74,42
C5	66,8	66,86
C6	39,0	39,09
C7	176,0	176,12
C8	52,7	52,79



*Fonte: ARMESTO *et al.*, 2006. 300 MHz, CD₃OD. **100 MHz, CD₃OD.

Tabela 9: Comparação dos dados de RMN de ^1H de PV16 com os dados da literatura para 4-*epi*-metilquinato

Hidrogênio	PV16			4- <i>epi</i> -metilquinato		
	δ_H (ppm)*	J (Hz)	Integração	δ_H (ppm)	J (Hz)	Integração
H _{2e}	1,68	dd, 13,7 e 5,1	1	1,84	dd, 13,6 e 5,4	1
H _{2a}	2,37	m		2,50	dd, 13,6 e 3,7	
H ₃	4,03	m	1	4,17	ddd, 5,4, ~ 5,4, 3,8	1
H ₄	3,74	dd, 5,4 e 2,8	1	3,86	dd, 5,4 e 3,7	1
H ₅	4,14	m	1	4,27	ddd, 8,8, ~ 3,7, ~ 3,7	1
H _{6e}	1,83	dd, 13,4 e 2,9	1	1,97	dd, 13,1 e 3,7	1
H _{6a}	2,28	m		2,47	dd, 13,1 e 8,8	
H ₈	3,77	s	3	3,91	s	3

*Fonte: ARMESTO *et al.*, 2006. 300 MHz, CD₃OD.

Esse composto foi submetido à análise por espectrometria de massas de alta resolução por LCMS-ESI-IT-TOF (Figura 73), e no espectro a presença do íon em m/z 229,0687 Da, confirmou a estrutura do composto com erro de 0,43 ppm para a fórmula molecular calculada (229,0688). Esse íon refere-se à massa do composto com um átomo de sódio a mais $[\text{M}+\text{Na}]^+$, e o íon em m/z 435,1471 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (ARMESTO *et al.*, 2006).

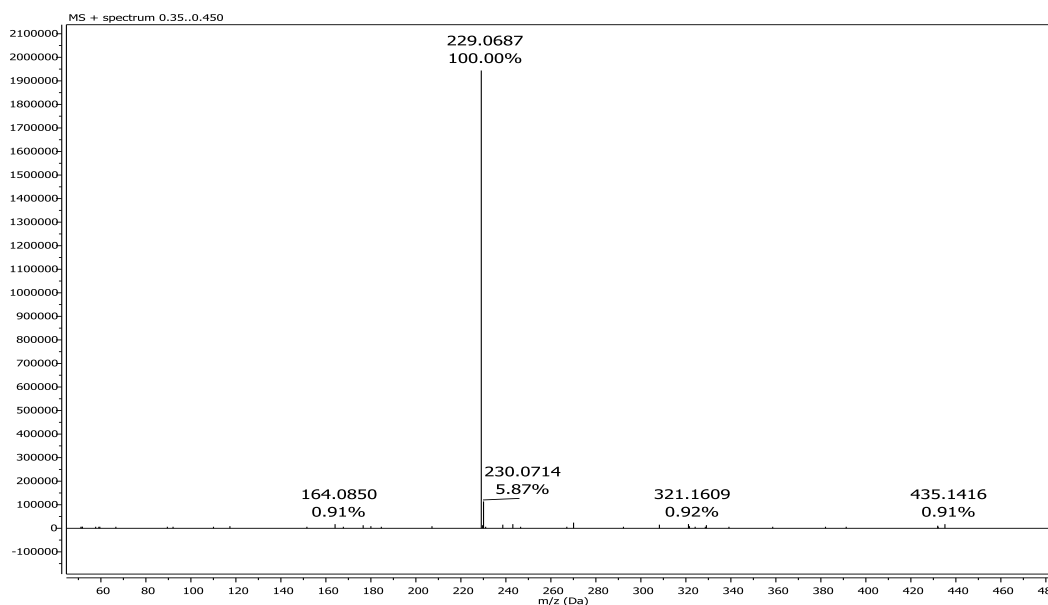


Figura 73: Espectro de massas de alta resolução, EM-ESI-IT-TOF, obtido para PV16.

1.2.17 – PV17: Tetradecanoato de metila

PV17 (41,4 mg) foi obtido a partir do fracionamento da CC do EMeF, apresentou-se como um líquido viscoso, amarelo claro.

No espectro no IV (Figura 74) observam-se bandas de absorção em 2926-2854 cm^{-1} características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, evidenciando a natureza alifática da substância. A natureza alifática pode ser confirmada, também, pela presença de bandas de deformação angular de baixa intensidade dos grupos C-H referentes à cadeia alifática em 1466 cm^{-1} e uma banda de deformação angular de CH_2 em 722 cm^{-1} . Há, também, bandas de absorção em 1744 e 1172 cm^{-1} , referentes ao estiramento da carbonila e estiramento C-O-C de grupo éster, respectivamente.

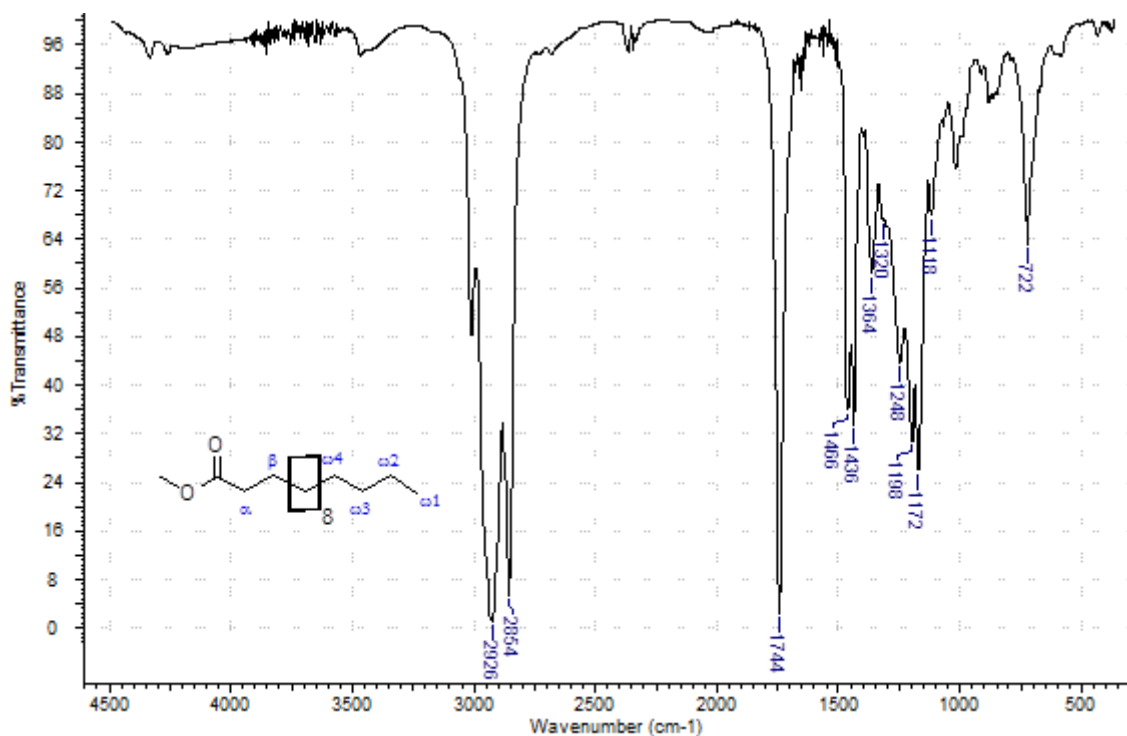


Figura 74: Espectro na região do IV de PV17 (KBr).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 75, pág. 93) de PV9 observam-se um sinal intenso em δ_{H} 3,67, atribuído aos átomos de hidrogênio da metoxila, um tripleto em δ_{H} 2,30 (t, $J = 7,5$ Hz), atribuído aos átomos de hidrogênio ligado ao átomo de carbono α , um multipletto entre δ_{H} 1,54-1,65, referente aos átomos de hidrogênio

ligado ao átomo de carbono β e outro triplete em δ_H 0,88 (t, $J = 6,3$ Hz), referente aos átomos de hidrogênio do grupo metila terminal. O sinal intenso em δ_H 1,28 foi atribuído aos grupos metilênicos da cadeia do éster.

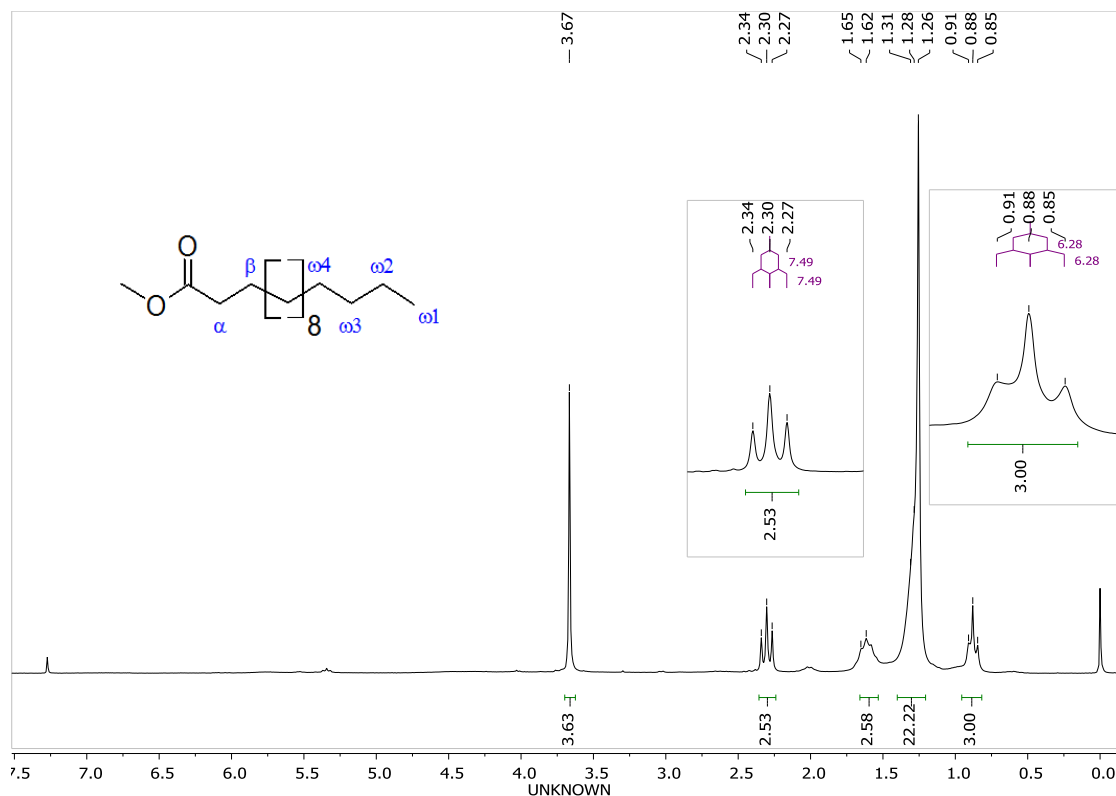


Figura 75: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) PV17 em CDCl_3 .

No espectro de RMN de ^{13}C e no subespectro DEPT-135 (Figura 76, pág. 94) foi possível observar 14 sinais, sendo o sinal em δ_C 174,43 referente à carbonila, em δ_C 51,46, referente à metoxila, em δ_C 14,13 referente ao carbono metílico e os sinais restantes entre δ_C 22,71 e 34,14 relacionados aos grupos metilênicos do composto.

A análise dos espectros no RMN de ^1H e ^{13}C e a comparação com os valores de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela 28, pág. 147) (GUNSTONE *et al.*, 1976) permitiram sugerir que PV17 seja o tetradecanoato de metila ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$).

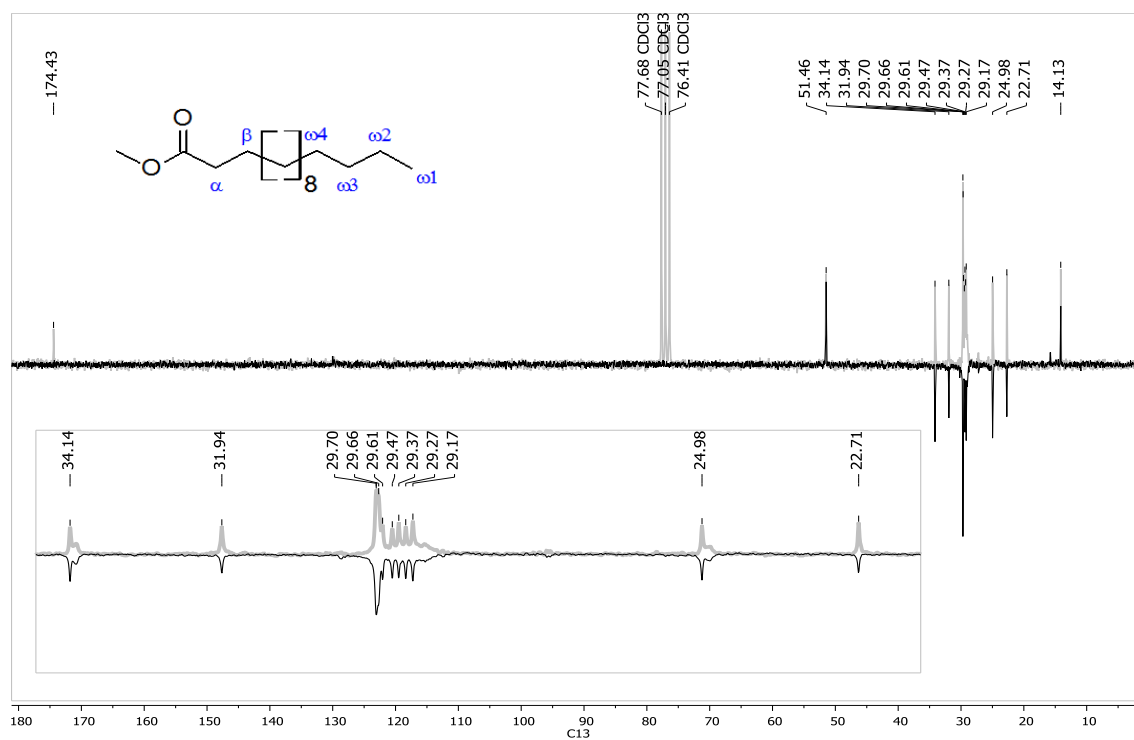


Figura 76: Espectro de RMN de ^{13}C (em cinza) e subspectro DEPT-135 (em preto), 100 MHz, de PV17 em CDCl_3 .

2 – ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

2.1 – Introdução geral

Atualmente existem muitas doenças para as quais não há cura, e o tratamento consiste em somente reduzir a perda na qualidade de vida dos portadores de tais doenças como a AIDS, doenças crônico-degenerativas como Mal de Alzheimer, *Diabetes Mellitus*, a hipertensão arterial, as artrites, as doenças cardiovasculares e insuficiência renal crônica (BARROS *et al.*, *apud* TERRA, 2007).

Além disso, há tratamentos medicamentosos que perdem sua eficácia e eficiência devido à pressão seletiva dos microrganismos, causada principalmente pelo uso indiscriminado de antibióticos e quimioterápicos, resultando no desenvolvimento de espécies resistentes (ANDRADE *et al.*, 2006). Embora existam muitos fármacos, estes não contemplam os casos citados e, portanto, faz-se necessária uma busca constante por novas moléculas bioativas.

Dentro dessas perspectivas, as plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas para serem exploradas terapeuticamente e muitos medicamentos são desenvolvidos a partir de substâncias isoladas de plantas como, por exemplo, a quinina, alcaloide obtidos da casca da quina (*Cinchona calisaya*), usado como antimalárico (CAMARGO, 1995).

Considerando-se as categorias de doenças, nas últimas décadas, a maioria (60%) dos fármacos utilizados no tratamento contra o câncer, introduzida na terapêutica têm sua origem nos produtos naturais. Dentre estes se destacam a vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®) e os análogos vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®); o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos®) e teniposídeo (Vumon®); e a camptotecina e os análogos topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®). Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (CRAGG E NEWMAN, 2009).

Diante disso, o estudo da atividade biológica de produtos naturais é importante e pode contribuir para a disponibilidade de novos medicamentos no futuro.

Os extratos e algumas substâncias isoladas de folhas de *Psychotria viridis* foram submetidos aos seguintes estudos de atividade biológica: atividade antimicrobiana, atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase e avaliação da citotoxicidade.

2.2 – Determinação da atividade antimicrobiana

2.2.1 – Introdução

Os antimicrobianos são fármacos que têm a propriedade de inibir o crescimento de microrganismos e são indicados, portanto, apenas para o tratamento de infecções microbianas sensíveis. A descoberta desses fármacos trouxe inestimáveis benefícios para a humanidade e muitas doenças consideradas incuráveis e letais no passado passaram a ser tratadas com o uso de tais medicamentos. Embora exista uma grande variedade desses medicamentos no mercado, um problema relacionado aos antimicrobianos é o processo de seleção de microrganismos resistentes (WEBER E COURVALIN, 2005), e a laboriosa pesquisa de novos fármacos.

O grande marco no tratamento das infecções microbianas ocorreu com a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928 (NICOLAOU *et al.*, 2008). Entre os anos 1940 a 1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram-positivas. Entre os anos 1960 e 1980 foram introduzidos no mercado antibióticos semissintéticos, análogos aos antibióticos naturais já existentes, eficazes para o tratamento de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos (FERNANDES, 2006).

Entre os anos 1980 a 2000 houve uma redução dramática na identificação de novos protótipos antibióticos e nesse mesmo período ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana. Para a busca de novos antibióticos, foram utilizadas principalmente ferramentas genômica e as triagens de coleções de compostos, em detrimento às triagens de produtos naturais. A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana (FERNANDES, 2006).

Buscando a identificação de novas substâncias com atividade antimicrobiana, extratos e compostos obtidos a partir de folhas de *P. viridis* foram submetidos a testes frente a microrganismos.

2.2.2 – Teste de atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados pelo grupo do Professor Dr. José Carlos de Magalhães no Laboratório do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João Del Rei. Para a realização dos experimentos foram utilizadas culturas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo as duas primeiras Gram-positivas e as três últimas Gram-negativas.

2.2.2.1 – Avaliação da atividade antimicrobiana em ensaio de microplaca

Os testes foram realizados em meio de cultura caldo *brain heart infusion* (BHI) utilizando placas de microdiluição de 96 poços e método de leitura visual. Determinou-se a menor concentração dos extratos ou compostos capaz de inibir o crescimento das bactérias objeto do estudo.

A avaliação da inibição do crescimento dos microrganismos foi feita por método colorimétrico de metabolização do sal de tetrazólio. Foi feita comparação visual, sendo a cor roxa indicativo do crescimento bacteriano e a amarela do não crescimento. Em todos os casos determinou-se a concentração inibitória mínima (MIC) de cada substância ou extrato, capaz de inibir o crescimento das bactérias testadas. A diluição seriada partiu de 1000 µg/mL, tanto do extrato quanto das substâncias puras, sendo a concentração do próximo poço sempre a metade do anterior. O controle negativo (CN) foi feito com DMSO puro e no controle positivo (CP) foi usado amicacina, sendo que em ambos fez-se uma diluição seriada, como a das substâncias testadas.

Fez-se uma triagem da atividade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *P. viridis* (EMeF), DMT e triptamina (substância precursora do DMT) (Figura 77, pág. 98).

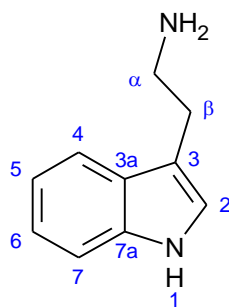


Figura 77: Estrutura química da triptamina

2.2.2.2 – Metodologia

As amostras EMeF, DMT e triptamina foram testadas quanto ao seu potencial antimicrobiano em cinco bactérias diferentes, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*.

Para se determinar a menor concentração do extrato ou compostos capaz de inibir o crescimento das bactérias objeto do estudo, foi utilizado o método de diluição em caldo recomendado pela ANVISA, seguindo protocolos disponíveis no Manual do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), com adaptações. A partir de culturas crescidas por 24 h em caldo nutriente BHI, o inóculo foi ajustado para 0,5 na escala de MacFarland e diluído 100 vezes.

Utilizou-se uma placa de microdiluição de 96 poços, em que em cada poço adicionaram-se 50 μL de uma solução de caldo nutriente e 50 μL do inóculo.

Após o inóculo, procedeu-se com período de incubação por 24 h, na estufa a 37 °C, adicionaram-se 10 μL do corante brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) em todos os poços e as placas ficaram sobre agitação em incubadora *Shaker* por 10 minutos, para a metabolização do sal de tetrazólio, a fim de se identificar visualmente onde havia metabolismo bacteriano, ou seja, onde o composto testado foi ou não capaz de inibir o crescimento microbiano. A leitura da placa com a determinação da CIM foi realizada visualmente.

As amostras que não tiveram atividade inibitória e, portanto, houve crescimento, são àqueles onde o poço foi corado em roxo. Já os poços em que permanece a cor amarela, são indicativos de capacidade de inibição do crescimento microbiano.

No teste de MIC as concentrações das substâncias a serem testadas decrescem da esquerda para direita. Nas Figura 78, Figura 79, e Figura 80, pág. 100, CC representa o controle de crescimento positivo e BM é o branco do meio.

2.2.2.3 – Discussão dos resultados

Os resultados estão apresentados na Tabela 10, pág. 100. Nas Figura 78, Figura 79, e Figura 80, pág. 100 é possível observar visualmente, em amarelo, os poços em que aconteceram as inibições.

No teste de MIC para *B. cereus*, e *S. aureus*, ambas Gram-positivas, somente a triptamina mostrou atividade antimicrobiana.

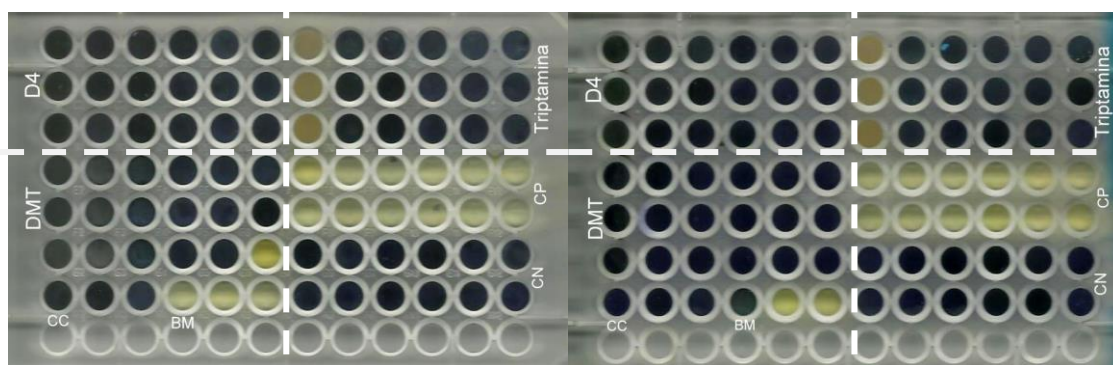


Figura 78: Teste para MIC em *B. cereus*, à esquerda, e *S. aureus*, à direita.

*D4(EMeF)

No teste de MIC para *E. coli* e *K. oxytoca*, ambas Gram-negativas, somente a triptamina mostrou atividade antimicrobiana.

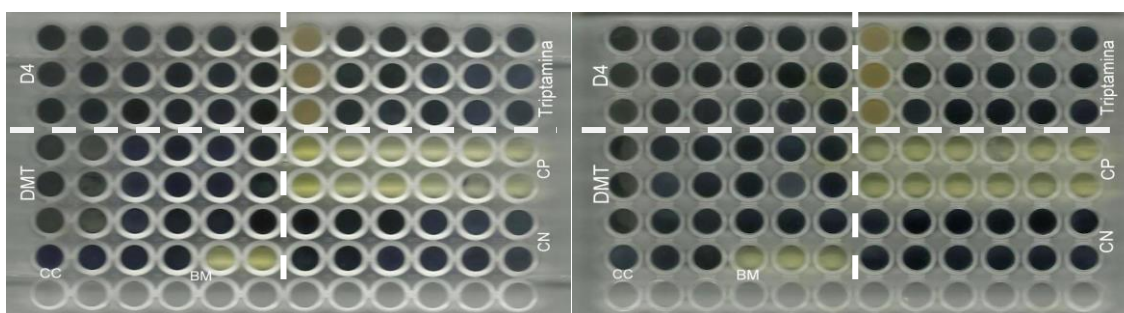


Figura 79: Teste para MIC em *E. coli*, à esquerda, e *K. oxytoca*, à direita.

*D4(EMeF)

No teste de MIC para *K. pneumoniae*, bactéria Gram-negativa, a triptamina, também, foi a única substância com ação inibitória, contudo apresentou atividade em concentrações menores.

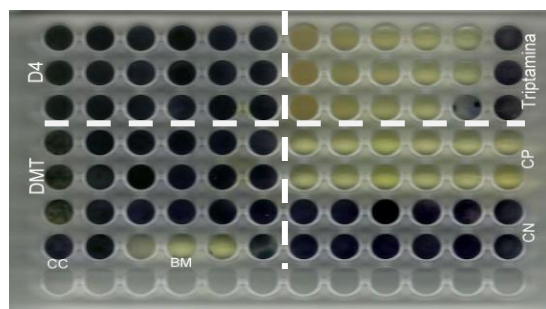


Figura 80: Teste para MIC em *K. pneumoniae*, bactéria Gram-negativa.

*D4(EMeF)

Tabela 10: Concentração inibitória mínima das substâncias testadas, em diferentes bactérias

Bactérias	EMeF	DMT	Triptamina ($\mu\text{g/mL}$)
<i>B. cereus</i>	ND	ND	500 – 1000
<i>S. aureus</i>	ND	ND	500 – 1000
<i>E. coli</i>	ND	ND	500 – 1000
<i>K. oxytoca</i>	ND	ND	500 – 1000
<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	31,25 – 62,5

ND – Nas condições experimentais, não foi detectada inibição na máxima concentração testada.

As amostras EMeF, DMT e triptamina foram testadas quanto ao seu potencial antimicrobiano em cinco bactérias diferentes, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*, contudo, nas condições experimentais utilizadas no teste, não foi detectada inibição nas concentrações testada para o extrato metanólico das folhas e DMT e somente a triptamina apresentou atividade antimicrobiana. Pode-se inferir, portanto, que a metilação da triptamina reduz a atividade antimicrobiana do composto.

2.3 – Determinação da atividade inibitória da acetilcolinesterase

2.3.1 – Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez em 1906 pelo neuropatologista Alois Alzheimer (HUEB, 2008). Essa é uma afecção neurodegenerativa progressiva e irreversível de aparecimento insidioso, que acarreta perda da memória e diversos distúrbios cognitivos. A DA pode ser de acometimento tardio, de incidência ao redor de 60 anos de idade, ocorrendo de forma esporádica, enquanto que a DA de acometimento precoce, de incidência ao redor de 40 anos, mostra recorrência familiar (SMITH, 1999).

Atualmente 35,0 milhões de pessoas no mundo apresentam a DA (PEREIRA *et al.*, 2014), e é esperado que o número de casos triplique nos próximos 40 anos (YAFFE E BARNES, 2011). No Brasil, apesar das lacunas estatísticas, estima-se que cerca de 500 mil pessoas sejam acometidas pela doença (MACHADO, 2006 *apud* RODRIGUES E GONTIJO, 2009)

A DA acarreta um declínio funcional progressivo e perda gradual da autonomia, ocasionando nos indivíduos afetados uma dependência total de outras pessoas em decorrência da deterioração das funções cognitivas e do desempenho de atividades diárias (MACHADO, 2006 *apud* RODRIGUES E GONTIJO, 2009).

A histopatologia da doença é caracterizada pela maciça perda sináptica e pela morte neuronal observada nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas (SELKOE, 2001). São observados, também, depósitos fibrilares amiloidais localizados nas paredes dos vasos sanguíneos do parênquima cerebral associados a uma variedade de diferentes tipos de placas senis, acúmulo de filamentos anormais e formação de novelos neurofibrilares, perda neuronal e sináptica, ativação de células da glia e inflamação (HARDY E SELKOE, 2002).

Baseadas nesses marcadores neuropatológicos, duas hipóteses principais foram propostas a fim de explicar a etiologia da doença. A hipótese da cascata amiloida, em que a neurodegeneração na doença de Alzheimer inicia-se com a clivagem proteolítica da proteína precursora amiloide (APP) e resulta na produção, agregação e deposição da substância β -amiloide ($A\beta$) e placas senis (SELKOE, 2001). E a hipótese colinérgica, em que disfunção do sistema colinérgico é suficiente

para produzir uma deficiência de memória em modelos animais, a qual é semelhante à doença de Alzheimer (BARTUS E EMERICH, 1999).

Cérebros de pacientes portadores da doença de Alzheimer mostraram degeneração dos neurônios colinérgicos, redução dos marcadores colinérgicos, e redução na atividade da colina acetiltransferase e a acetilcolinesterase no córtex cerebral de pacientes portadores da doença de Alzheimer (SERENIKI *et al.*, 2008) o que corrobora a importância da acetilcolina no desenvolvimento da doença.

2.3.2 – Tratamento da doença de Alzheimer

Atualmente, os tratamentos disponíveis para a DA buscam minimizar sintomas cognitivos e comportamentais, por meio de medicação e técnicas cognitivas de reabilitação, melhor estruturação do ambiente e, também, por meio de grupos informativos para pacientes e familiares (MACHADO, 2006 apud RODRIGUES E GONTIJO, 2009).

Entre os diferentes tipos de medicamentos que podem modificar a transmissão colinérgica, a única classe que apresenta eficiência no tratamento sintomático da DA são os inibidores acetilcolinesterase (SILVA, 2009). Esses medicamentos atuam alterando a função colinérgica central ao inibir as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase, responsáveis por degradar a acetilcolina, aumentando, assim, a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais. Desde a introdução desses medicamentos na prática clínica, os inibidores da AChE constituem o tratamento sintomático de escolha para a DA (SERENIKI *et al.*, 2008).

Contudo, embora os inibidores da AChE tenham demonstrado eficácia sintomática e redução na progressão da patologia, essa melhora somente ocorreu em aproximadamente 30-40 % dos pacientes portadores da DA leve a moderada (KIHARA *et al.*, 2004)

Grandes esforços têm sido realizados para a compreensão e tratamento da doença de Alzheimer, e os inibidores da AChE são fármacos importantes no tratamento da doença. A descoberta de novas substâncias com maior seletividade pela AChE e baixa toxicidade, poderia contribuir para a melhoria da qualidade de vida de pacientes que virão a desenvolver a doença, visto que a terapia atual está longe de ser satisfatória e os medicamentos disponíveis para o tratamento da DA

têm eficácia limitada o que sugere a necessidade de novas estratégias para o tratamento da doença (STANDAERT E YOUNG, 2010).

Compostos que, atuam diminuindo a quebra bioquímica da acetilcolina e teoricamente prolongam a neurotransmissão colinérgica, têm ocorrência recorrente em plantas tradicionalmente usadas para tratar falhas na memória e outros declínios cognitivos associados à terceira idade (HOUGHTON *et al.*, 2004).

Dentro dessa perspectiva, extratos e compostos isolados de *P. viridis* foram testados frente à inibição da AChE na busca de potenciais substâncias biologicamente ativas.

2.3.2 – Teste de inibição da AChE em microplaca empregando reagente de Ellman

A atividade enzimática da acetilcolinesterase foi determinada em microplacas pelo método espectrofotométrico de Ellman (1961), modificado por RHEE *et al.*, 2001, fazendo o monitoramento da produção do composto colorido em placas de 96 poços utilizando um leitor de microplacas. A hidrólise do substrato acetiltiocolina, gera como produto a tiocolina, que reage com o reagente de Ellman, produzindo ácido 2-nitro-4-tiobenzoico e ácido 2-nitro-4-mercaptotiobenzoico, que podem ser detectados a 405 nm (Figura 81, pág. 104). O ensaio em microplaca é um ensaio quantitativo e permite a avaliação da percentagem de inibição da AChE (TREVISAN *et al.*, 2003).

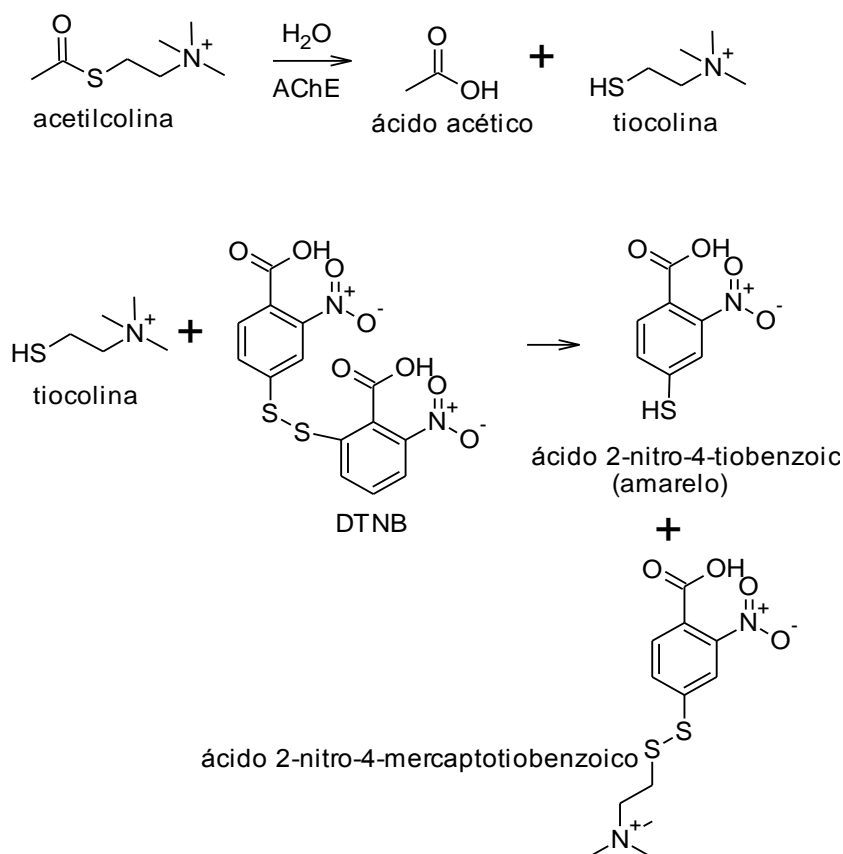


Figura 81: Sequência de reações propostas no método de Ellman.

Fonte: Barboza *et al.*, 2010.

2.3.2.1 – Metodologia

O teste foi realizado pelo grupo da Professora Dr^a Jacqueline Aparecida Takahashi no Laboratório Biotecnologia e Bioensaios, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

As amostras foram solubilizadas em DMSO a uma concentração de 10 mg/mL. Foram adicionados aos poços das microplacas 25 µL da solução de iodeto de acetilcolina 15 mM, 125 µL de DTNB 3 mM, 50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo 0,1% p/v de Albumina do Soro Bovino (BSA) e 25 µL dos extratos e das substâncias, solubilizada em DMSO, em concentração de 10 mg.mL⁻¹, correspondendo à 0,25 mg/poço. Foram feitos controles negativos com DMSO, e positivo com eserina e galantamina (10 mg/mL), como inibidores padrão. Os testes foram feitos em quintuplicata e a absorbância foi medida a cada 1 minuto, por 8 vezes a 405 nm. Após essas leituras, foram adicionados aos poços 25 µL de

acetilcolinesterase 0,226 U/mL em Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8, com BSA 0,1% p/v. As absorvâncias foram medidas novamente a cada 1 minuto, por 10 vezes, a 405 nm. O aumento da absorvância devido à hidrólise espontânea do substrato foi corrigido fazendo a subtração da média dos valores da primeira medida da média dos valores após a adição da enzima (média 2ª medida - média 1ª medida). A porcentagem de inibição foi calculada a partir da comparação da absorvância média das amostras com a absorvância média do branco.

2.3.2.2 – Discussão dos resultados

As amostras testadas, cicloartenol, EHxF, ECIF, EAcF, EMeF, DMT e mistura de estigmasterol e β -sitosterol glicosilado, apresentaram inibição da AChE. As amostras ECIF e EAcF apresentaram inibição maior que 90% (Tabela 11).

Os resultados obtidos, principalmente, para ECIF, EAcF abrem perspectivas para a realização de testes mais precisos que comprove a atividade dessas amostras frente à DA, visto que, extratos cuja inibição enzimática é maior ou igual a 50% são considerados promissores e candidatos a futuros medicamentos (TREVISAN *et al.*, 2003).

Tabela 11: Resultados do teste de inibição da enzima AChE em microplaca dos extratos e substâncias extraídas das folhas de *P. viridis*

Amostra	% Inibição média	Desvio padrão	Coefficiente de variação
Galantamina (padrão)	90,31	0,45	0,005
Eserina (padrão)	70,14	0,85	0,012
Cicloartenol	49,53	3,37	0,068
EHxF	80,34	1,33	0,017
ECIF	91,76	2,25	0,025
EAcF	91,21	3,95	0,043
EMeF	85,28	2,99	0,035
DMT	19,84	4,83	0,244
β -sitosterol e estigmasterol glicosilado	67,15	4,85	0,072

2.4 – Determinação da atividade antioxidante

2.4.1 – Introdução

O termo oxidação pode ser definido como a conversão de uma substância química em um derivado com menor número de elétrons e, portanto, é a perda de um ou mais elétrons para outra. Esse processo de transferência de elétrons também ocorre em sistemas biológicos, e embora esse seja fundamental para a sobrevivência das células, o efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, que podem causar dano oxidativo (ALVES *et al.*, 2010).

Radicais livres são produzidos continuamente e naturalmente durante ações catalíticas de enzimas, processos metabólicos celular ou pela exposição a fatores exógenos (BIANCHI *et al.*, 1999). Contudo, quando em excesso, podem gerar o estresse oxidativo (EO), que pode ser definido como as circunstâncias nas quais os radicais livres causam danos teciduais (NASCIMENTO *et al.*, 2011).

O excesso desses radicais pode ser combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou adquiridos de forma exógena (NASCIMENTO *et al.*, 2011). Os antioxidantes são substâncias com habilidade de sequestrar radicais livres, são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos e, portanto, protegem o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva e retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (ALVES *et al.*, 2010).

Quando há o desequilíbrio entre sistemas pró-oxidantes e antioxidantes e os antioxidantes produzidos pelo corpo são insuficientes para combater os radicais livres produzidos pelo organismo, este sofre ações degenerativas através do distúrbio conhecido como estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2010)

Nos últimos anos, vêm sendo considerado que o excesso de radicais livres é responsável por efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares (ALVES *et al.*, 2010) e, dessa forma, se encontram envolvidos em diversas doenças como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e *Diabetes Mellitus* tipo I (SOUSA *et al.*, 2007).

As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas (ALVES *et al.*, 2010). Assim, pesquisas têm se voltado para a descoberta de produtos naturais com atividade antioxidante e diferentes espécies vegetais vêm sendo amplamente testadas.

Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante têm aumentado consideravelmente nos últimos anos (ALVES *et al.*, 2010). Entre os métodos colorimétricos, utilizados na pesquisa de atividade antioxidante, destacam-se aqueles que relacionados à habilidade dos antioxidantes em neutralizar radicais como DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).

2.4.2 – Método do ensaio de DPPH

O teste de DPPH é um método espectrofotométrico relativamente simples, e baseia-se na capacidade “descolorante” da amostra. É um dos mais antigos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante, sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em matérias naturais. Mais tarde foi utilizado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados de alimentos (BORGES *et al.*, 2011). Uma característica desse método é que ele não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (SILVA *et al.*, 1999). O DPPH pode reagir com compostos fenólicos, bem como com ácidos aromáticos contendo apenas um grupamento (SANTOS *et al.*, 2007).

O método avalia a capacidade antioxidante de uma dada substância e baseia-se na transferência de elétrons por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar. O DPPH, de cor púrpura, absorve em um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm, é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, o teste pode ser monitorado pelo decréscimo da absorvância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres (NASCIMENTO *et al.*, 2011).

2.4.2.1 – Metodologia

O teste foi realizado no Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a coordenação da Professora Dr^a Lúcia Pinheiro Santos Pimenta.

Para o procedimento, foi preparada solução metanólica de DPPH a 0,004 % p/v.

As amostras testadas, foram solubilizadas em metanol grau HPLC a 1 mg/mL. A partir dessa solução foram realizadas diluições de forma a obter outras cinco soluções nas concentrações: 500,00; 250,00; 125,00; 62,50 e 31,25 µg/mL.

Em placas de 96 micropoços, foram adicionados 250 µL de solução metanólica de DPPH e 10 µL das cinco diferentes concentrações do extrato. Cada uma das 5 concentrações foi testada em triplicata. Foram feitos controles negativos com metanol sem adição de extrato, e positivo com butilhidroxitolueno (BHT), ácido ascórbico, rutina e o alfa-tocoferol.

As placas, testes e controle, foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz.

A solução de DPPH foi preparada no dia do experimento, mantida em ausência de luz a 4 °C. O percentual de decréscimo na absorbância foi medido para cada concentração e a capacidade de sequestrar radicais livres foi calculada com base no decréscimo da absorbância observada. As leituras foram feitas a 517 nm. A capacidade de sequestrar radicais livres foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme a Equação 1:

$$\% \text{ inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{EXTR}})/A_{\text{DPPH}}) * 100 \quad (1)$$

em que A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{EXTR} é a absorbância da amostra em solução, calculado pela diferença com seu branco ($A_{\text{EXTR}} = A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Branco}}$).

Foram submetidos ao teste de atividade antioxidante a N,N-dimetiltriptamina, os extratos clorofórmico (ECIF), metanólico (EMeF) e em acetato de etila (EAcf) das folhas de *P. viridis*.

2.4.2.2 – Discussão dos resultados

Os resultados do teste antioxidante e a comparação dos valores encontrados para os extratos e padrões são ilustrados nas Figura 82, Figura 83 pág. 110, e Figura 84 pág. 110.

O extrato metanólico (EMeF) apresentou atividade antioxidante (expressa como inibição de oxidação do radical) superior a 85% partir da concentração de 125,00 $\mu\text{g/mL}$. Esse resultado indica uma capacidade de inibição considerável. A N,N-dimetiltriptamina, apresentou baixa atividade antioxidante em relação ao EMeF (Figura 82).

Os extratos clorofórmico e em acetato de etila não apresentaram atividade antioxidante nas concentrações testadas (Figura 83 pág. 110, e Figura 84 pág. 110).

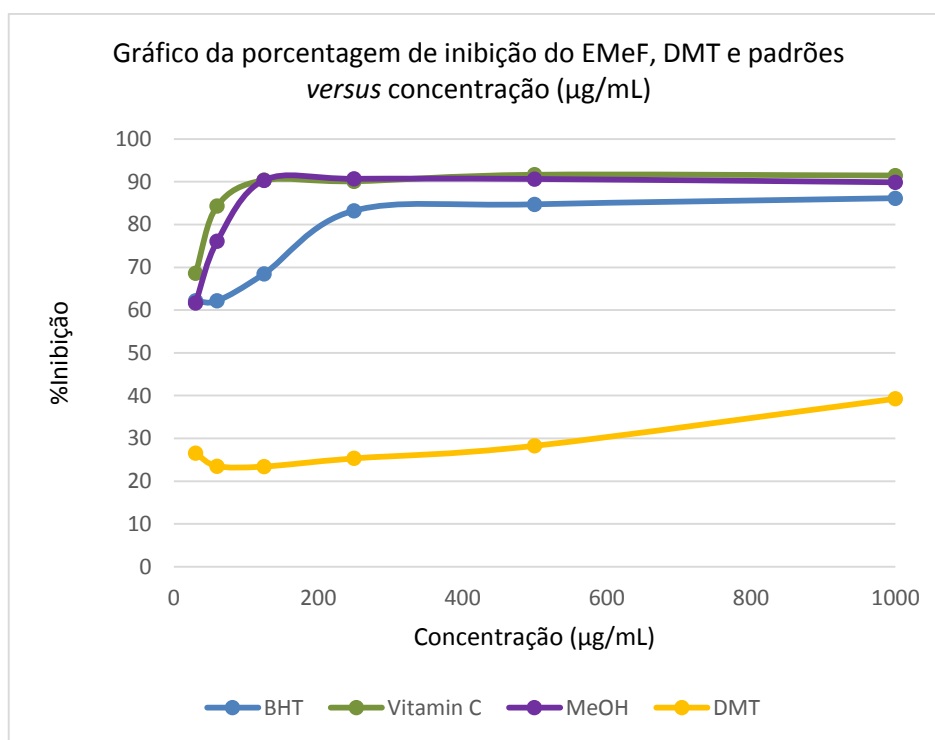


Figura 82: Gráfico da porcentagem de inibição do EMeF, DMT e padrões *versus* concentração ($\mu\text{g/mL}$).

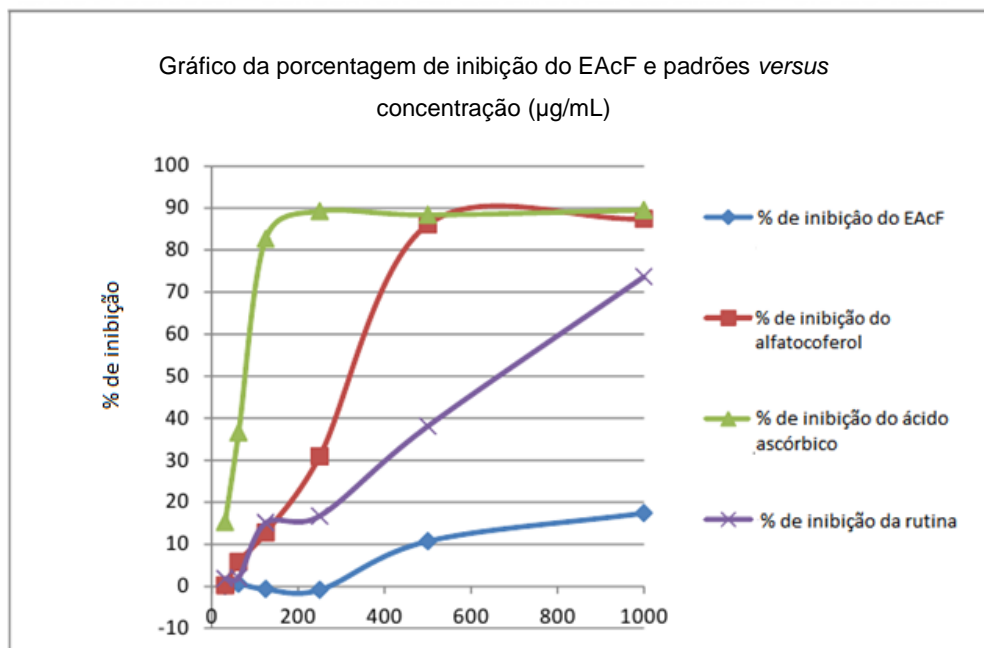


Figura 83: Gráfico da porcentagem de inibição do EAcF e padrões *versus* concentração ($\mu\text{g/mL}$).

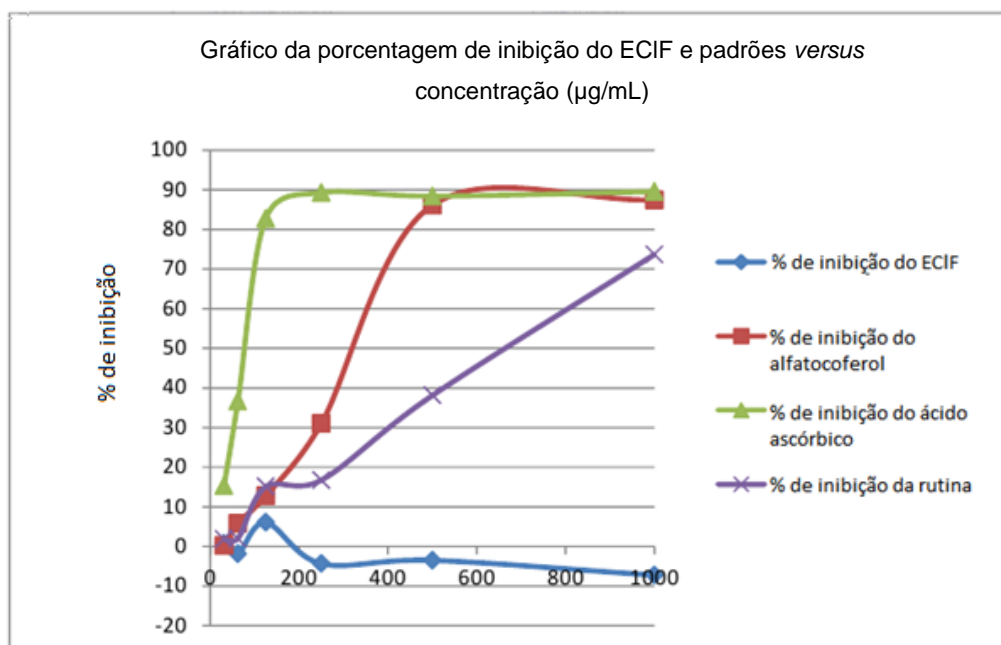


Figura 84: Gráfico da porcentagem de inibição do ECIF e padrões *versus* concentração ($\mu\text{g/mL}$).

2.5 – Avaliação da citotoxicidade

2.5.1 – introdução

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Estas células dividem-se rapidamente e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INCA, 2009). Essa é uma doença crônica não transmissível (DCNT), é a segunda maior causa de morte na maior parte dos países desenvolvidos, precedida apenas pelas doenças cardiovasculares (DCV) (Figura 85), uma tendência que também tem sido observada em alguns países em desenvolvimento (WHO, 2009).

No Brasil, houve, entre 1996 e 2007, uma diminuição da mortalidade devido à DCNT, principalmente em decorrência da redução na mortalidade por DCV, contudo, com relação ao câncer não há redução expressiva desses índices (SCHMIDT *et al.*, 2011), sendo que a mortalidade por câncer de mama e próstata tem crescido em todo país (SCHMIDT *et al.*, 2011).

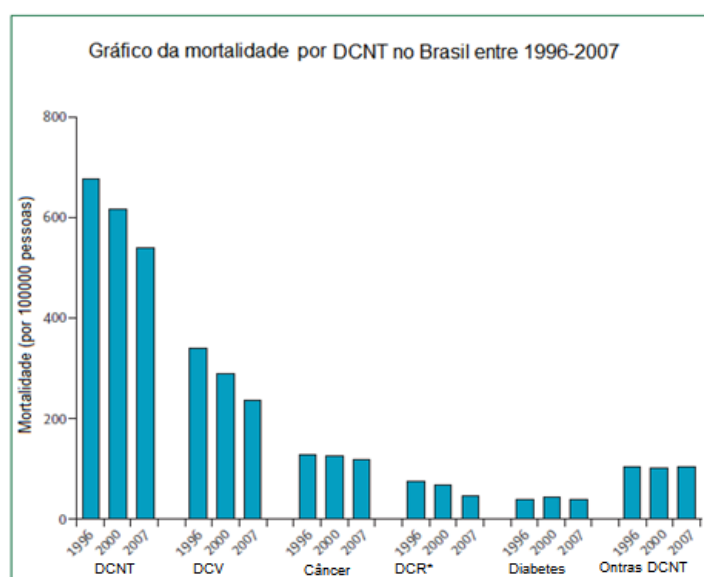


Figura 85: Gráfico da mortalidade por DCNT no Brasil entre 1996-2007.

*DCR (Doenças crônicas respiratórias)

Fonte: (SCHMIDT *et al.*, 2011)

Em 2005, no país, foram contabilizadas 1,6 milhões de consultas oncológicas ambulatoriais, 423 mil internações por câncer, sendo tratados mensalmente 128 mil pacientes por quimioterapia e 98 mil pacientes por radioterapia (INCA, 2006), e foram aprovados, pelo SUS, cerca de 1,5 milhões de procedimentos quimioterápicos em todo Brasil, quantia de aproximadamente R\$ 900 milhões.

Atualmente, a quimioterapia é uma das principais modalidades utilizadas no tratamento do câncer (INCA, 2008), e consiste na utilização de compostos químicos, chamados agentes quimioterápicos, que atuam de diferentes formas detendo a multiplicação celular. Esses agentes utilizados no tratamento do câncer podem ser sintéticos, semissintéticos ou naturais (GOODMAN E GILMAN, 2005).

Embora os avanços verificados nas últimas décadas, na área da quimioterapia antineoplásica, tenham facilitado consideravelmente a aplicação de outros tipos de tratamento do câncer e permitido maior número de curas (INCA, 2006), a maior parte desses medicamentos estão longe da idealidade. Um agente quimioterápico ideal deveria agir seletivamente, isto é, promover a morte ou inibir o crescimento das células neoplásicas, deixando as células normais intactas (ARÊAS, 2007). Entretanto esses agentes provocam danos no DNA, tanto de células tumorais, como também de células normais, levando a morte de células de alto potencial replicativo, resultando nos indesejáveis efeitos colaterais associados (PEDRAZA-FARINA, 2006). Muitas vezes, devido a estes efeitos os medicamentos quimioterápicos utilizados na clínica não são bem tolerados pelos pacientes (ARÊAS, 2007). Assim, apesar de existirem um grande número de tais agentes quimioterápicos, a eficiência destes para o tratamento do câncer ainda está distante de ser alcançada. Vários fatores como: a heterogeneidade da doença que compreende cerca de 100 tipos de cânceres e a resistência intrínseca ou adquirida aos quimioterápicos, depois de pouco tempo de tratamento, dificultam o uso de apenas uma classe de medicamento (COZZI *et al.*, 2004)

Portanto, o desenvolvimento de drogas antitumorais é um campo repleto de desafios e boas perspectivas.

2.5.2 – Quimioterápicos antineoplásicos naturais

Mais de 60% dos medicamentos utilizados para o tratamento do câncer, atualmente disponíveis na terapêutica, apresentam alguma relação com produtos naturais (SOUSA, 2012).

Os quimioterápicos etoposídeo, teniposídeo, vincristina, vimblastina, e taxol são exemplos clássicos de fármacos, utilizados no tratamento do câncer, descobertos a partir de plantas. Essas substâncias foram introduzidas ao longo dos últimos vinte anos no tratamento do câncer, reforçando o interesse de indústrias farmacêuticas em produtos de origem natural (VIEGAS *et al.*, 2006).

O etoposídeo e o teniposídeo são podofilinas semissintéticas obtidas a partir da podofilotoxina, uma lignana ariltetralínica presentes em espécies do gênero *Podophyllum*, tais como *P. peltatum* e *P. emodii*, utilizadas pelas populações nativas da América e da Ásia no tratamento do câncer de pele e verrugas (Figura 86). Essas podofilinas semissintéticas são atualmente utilizadas no tratamento de carcinoma testicular refratário em pacientes já submetidos a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, carcinoma de pulmão de células pequenas, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin (MEDRADO *et al.*, 2014)

A vincristina e vimblastina, alcaloides presentes na *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, conhecida, também, como Vinca, utilizada pela população de Madagascar no tratamento de *Diabetes Mellitus* (Figura 87, pág. 114). Atualmente, esses alcaloides são de grande utilidade no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil.

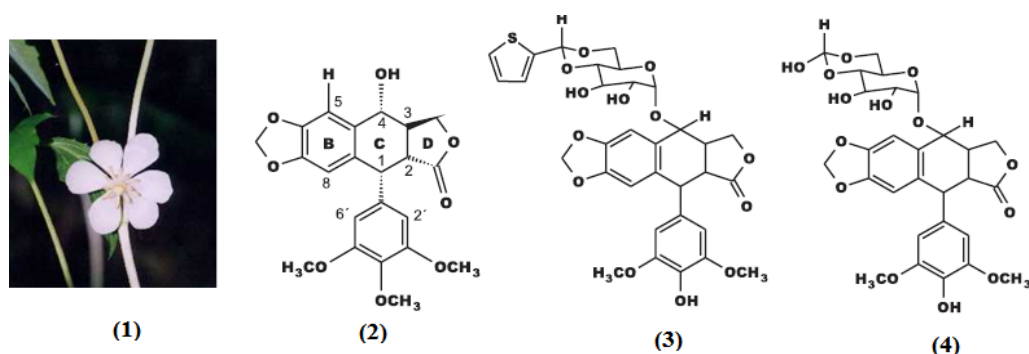


Figura 86: Foto de um exemplar de *Podophyllum peltatum* L. (1*) e estruturas químicas da lignana ariltetralínica podofilotoxina (2**), a partir da qual foram obtidos o etoposídeo (3**) e o teniposídeo (4).

Fonte: *USDA-NRCS PLANTS Database, hosted by. Photo by Jennifer Anderson, courtesy of Smithsonian Institution; **BRANDÃO *et al.*, 2010.

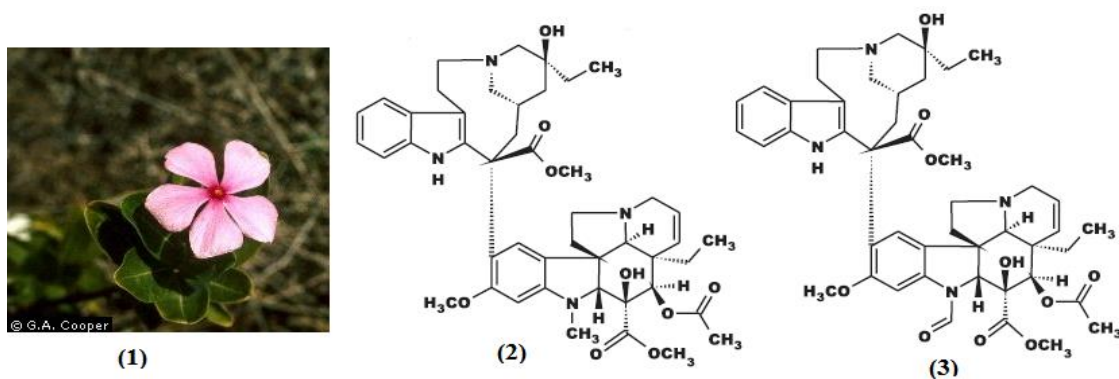


Figura 87: Foto de um exemplar de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (1*) e estruturas químicas dos alcaloides, vimblastina (2**) e vincristina (3**).

Fonte: *USDA-NRCS PLANTS Database, hosted by. Photo by G.A. Cooper, courtesy of Smithsonian Institution; **BRANDÃO *et al.*, 2010.

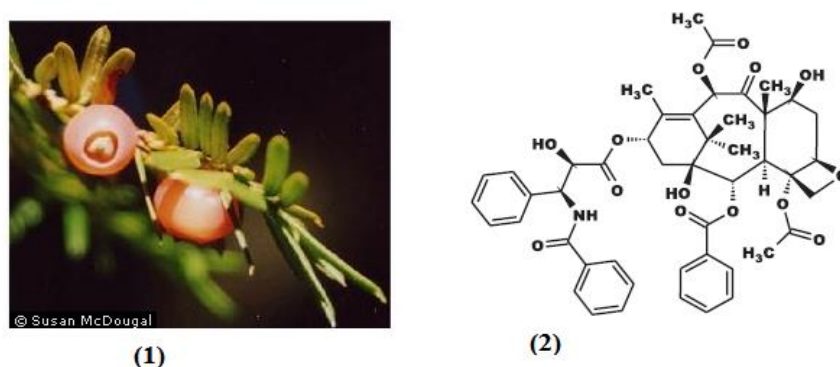


Figura 88: Foto de um exemplar de *Taxus brevifolia* Nutt (1*) e estrutura química do paclitaxel (2**)

Fonte: *USDA-NRCS PLANTS Database, hosted by. Photo by Susan McDougall, courtesy of Smithsonian Institution; **BRANDÃO *et al.*, 2010.

Encorajados por essas descobertas o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) realizou um programa de *screening*, para agentes antineoplásicos provenientes de vegetais. Foram avaliadas 35.000 amostras de vegetais entre 1960 e 1982. O resultado mais importante foi em 1971 com descoberta do paclitaxel, isolado da casca do teixo (*Taxusbaccata* L. e *Taxusbrevifolia* Nutt.). Estudos clínicos revelaram que essa substância foi capaz de regredir o câncer de mama e de ovário resistentes à terapia tradicional (BRANDÃO *et al.*, 2010) (Figura 88). Entretanto, apesar dos bons resultados clínicos, havia grandes desafios relacionados à obtenção de quantidades

satisfatórias da substância, que foram contornados com semi-síntese a partir do 10-desacetilbacatina-III, isolado das folhas da árvore *Taxusbaccata* em grande quantidade e apresenta o esqueleto básico do paclitaxel (SOUZA, 2012).

Assim, a descoberta de novos fármacos a partir de produtos naturais apresenta grande potencial. Uma vez que, metabólitos secundários são elaborados dentro de sistemas vivos e podem mostrar maior afinidade por receptores biológicos do que compostos sintetizados aleatoriamente (SOUZA, 2012). A descoberta de novas classes de fármacos é extremamente importante, principalmente para doenças para as quais os tratamentos ainda não são adequados, tais como: AIDS, doença de Alzheimer e diversos tipos de câncer.

2.5.3 – O ensaio do MTT

O ensaio do MTT é um teste de competência metabólica baseado na avaliação do desempenho mitocondrial, que depende da conversão do corante amarelo, brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), para o formazan, roxo, pela succinatodesidrogenase presente na mitocôndria de células vivas (MOSMANN, 1983) (Figura 89).

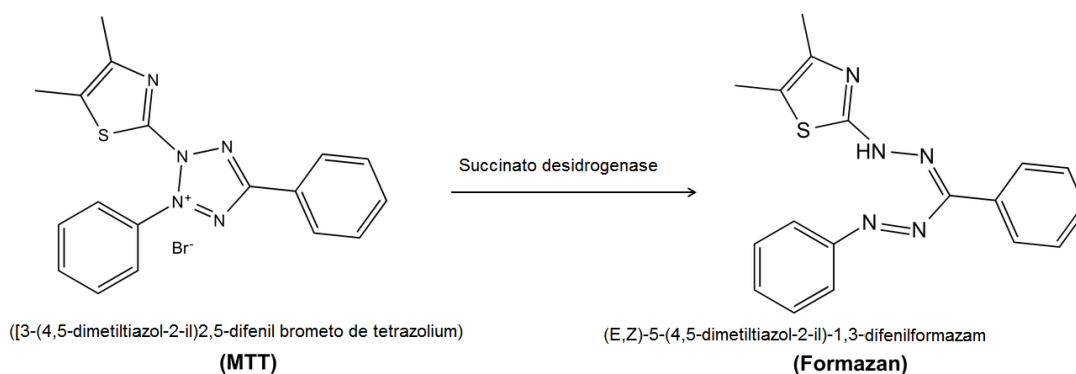


Figura 89: Conversão do corante MTT amarelo, para o formazan roxo, pela succinato desidrogenase presente na mitocôndria de células vivas

Fonte: MOSMANN, 1983.

A conversão pode ser diretamente relacionada com o número de células viáveis (vivas) pois, a redução do corante ocorre somente quando as enzimas redutoras da mitocôndria estão ativas.

A eficácia do agente a ser testado em promover a morte de células, pode ser deduzida ao se comparar a quantidade de formazan (roxo) produzida pelas células expostas ao agente, com a quantidade de formazan produzido por células controle não expostas.

As soluções de MTT solubilizadas em meios de cultura ou soluções salinas equilibradas, sem vermelho de fenol, são de cor amarelada. Desidrogenases mitocondriais de células viáveis ao clivar o anel de tetrazólio amarelo, originam cristais formazan de cor roxa, insolúveis em soluções aquosas e solúveis em isopropanol acidificado. A absorção da solução púrpura resultante é medida espectrofotometricamente. Um aumento no número de células resulta em um aumento na quantidade de formazan formado e um aumento na absorvância (PROVOST, 2007).

O teste de MTT é útil para a medição do crescimento celular em resposta a mitogénos, estímulos antigénicos, fatores de crescimento e outros reagentes que promovam o crescimento celular, os estudos de citotoxicidade, e na derivação de curvas de crescimento celular (PROVOST, 2007).

Os ensaios de citotoxicidade celular realizados tiveram como objetivo testar a atividade biológica dos EMeF, EAcf e DMT, ao avaliar a seu efeito sobre a viabilidade de células normais e tumorais.

2.5.3.1 – Metodologia

O teste foi realizado em colaboração com a doutoranda Ariadne Duarte Braga, pertencente ao Laboratório de Substâncias Antitumorais do ICB, UFMG, sob coordenação da Prof^a Dr^a Miriam Teresa Paz Lopes.

Para o teste foram utilizadas as linhagens celulares tumorais de melanoma murinho (B16-F10), cedidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (SP, Brasil) e células de carcinoma de mama murinho (4T1), adquiridas na ATCC (*American Type Culture Collection*). Ambas linhagens possuem alto potencial de colonização pulmonar (linhagens metastáticas)

Utilizaram-se, também, as linhagens celulares normais de fibroblastos de rim de hamster chinês (BHK-21) e células de ovário de hamster chinês (CHO) cedidas pelo Centro Pan-americano de Febre Aftosa (CPAFA), Rio de Janeiro.

As linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640 a 10 % (v/v) de FBS e mantidas em frascos de cultivo em estufa incubadora em condições de 5 % (v/v) de CO₂ e 37 °C. Ao atingirem aproximadamente 90 % de confluência, procedeu-se à tripsinização das linhagens. Removido o meio de cultivo, as células foram lavadas com 2,0 mL de PBS/EDTA pH 7,4. Aspirando-o logo em seguida, colocou-se 0,5 mL de solução ATV (solução de tripsina 0,2 % e versene 0,02 %). A tripsina foi inativada após completo desprendimento das células com 1,5 mL do meio RPMI 1640 a 10 % (v/v) de FBS. Obteve-se, então, uma suspensão celular que, após contagem, foi ajustada à densidade celular apropriada para a realização dos ensaios experimentais. A viabilidade celular foi determinada pela exclusão de células coradas com solução de azul de tripano.

Para a determinação da citotoxicidade dos diferentes extratos obtidos frente às linhagens celulares normais e tumorais, foi preparada uma suspensão celular conforme descrito e, em seguida, foram semeadas 2×10^3 células/100 µL/cavidade em placas de poliestireno de 96 cavidades. As culturas celulares foram mantidas em estufa por 24 h, garantido a adesão celular à superfície das cavidades e após esse período foram expostas por 72 h à concentrações crescentes dos extratos e/ou do DMT (20 - 200 µg/mL), utilizando-se como controle de viabilidade celular máxima, células expostas apenas a meio RPMI 1640 a 10 % (v/v) de FBS. Após esse período, os efeitos citotóxicos foram medidos por meio da adição de 10,0 µL de uma solução de sal de tetrazólio (5 mg/mL) em cada cavidade, 4 h antes de se realizar a leitura espectrofotométrica, a 540 nm. Previamente à leitura, os cristais de sal de tetrazólio foram dissolvidos com 100,0 µL de DMSO (DENIZOT E LANG, 1986).

As médias aritméticas dos valores de densidades óticas (D.O.) obtidos pelo método de MTT foram utilizadas para construção do gráfico D.O. *versus* log da concentração. Foi realizada a regressão não-linear da curva para a determinação da concentração letal para 50 % (IC-50), utilizando-se o Programa estatístico GraphPadPrism 5.

2.5.3.2 – Discussão dos resultados

O EMeF apresentou atividade inibidora da proliferação celular e/ou foi capaz de promover a morte das duas linhagens tumorais testadas, quando comparado ao controle (células expostas ao RPMI a 10 % FBS). Para as linhagens B16F10 e 4TI,

houve redução da viabilidade celular com valores de $IC_{50} = 86,64$ e $98,20 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 90).

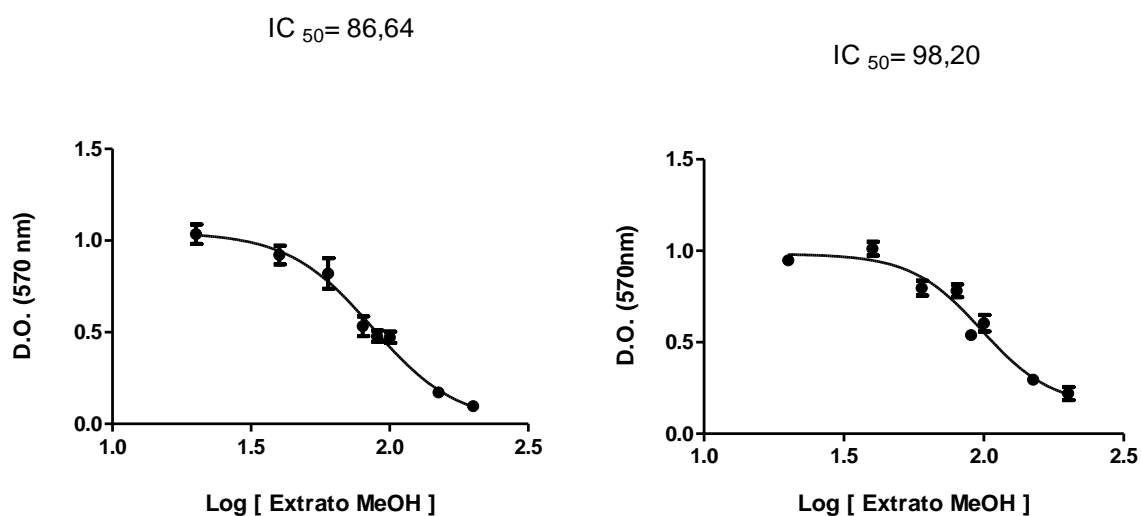


Figura 90: Avaliação da viabilidade de células tumorais, B16F10 (à esquerda) e 4T1 (à direita), após tratamento com EMeF.

Para as linhagens normais BHK e CHO, o EMeF não apresentou capacidade inibidora sobre a proliferação celular, não afetando, portanto, a viabilidade das mesmas (Figura 91).

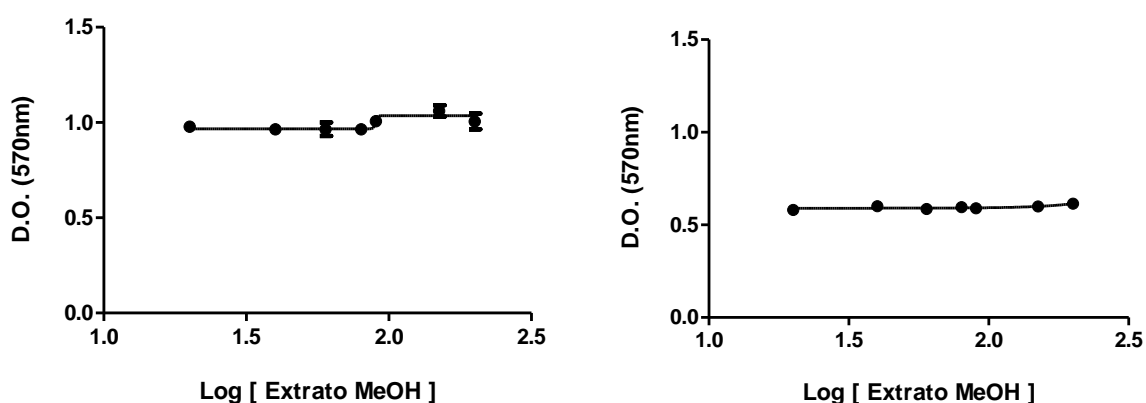


Figura 91: Avaliação da viabilidade de células normais BHK (à esquerda) e CHO (à direita), após tratamento com EMeF.

O EAcF foi capaz de induzir a morte e/ou inibir a proliferação das duas linhagens tumorais testadas, quando comparada ao controle (RPMI a 10% FBS). Para as linhagens B16F10 e 4T1, houve redução da viabilidade celular com valores de $IC_{50} = 204,5$ (obtido por extrapolação) e $119,60 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 92).

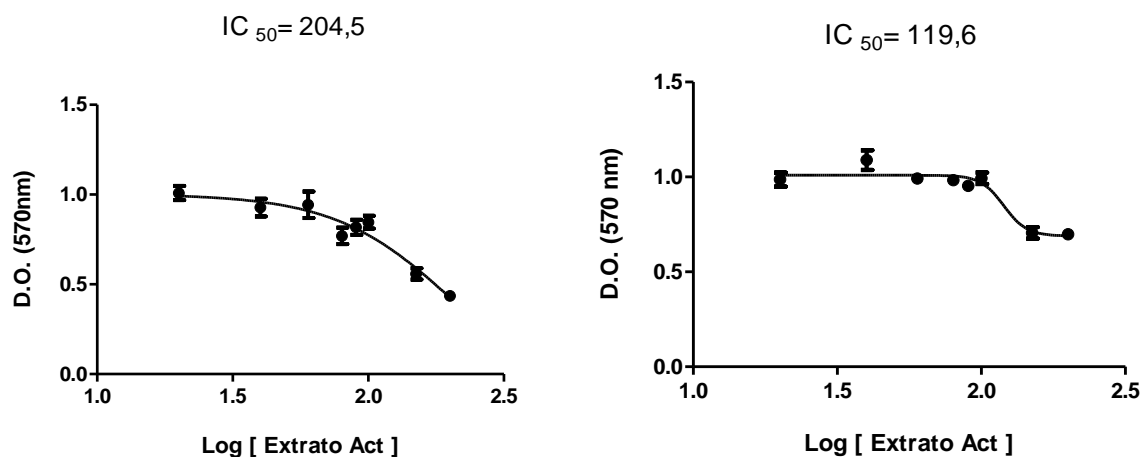


Figura 92: Avaliação da viabilidade de células tumorais, B16F10 (à esquerda) e 4T1 (à direita), após tratamento com EAcF.

Para as linhagens normais BHK e CHO, o EAcF não apresentou capacidade inibidora sobre a proliferação celular, não afetando, portanto, a viabilidade das mesmas (Figura 93).

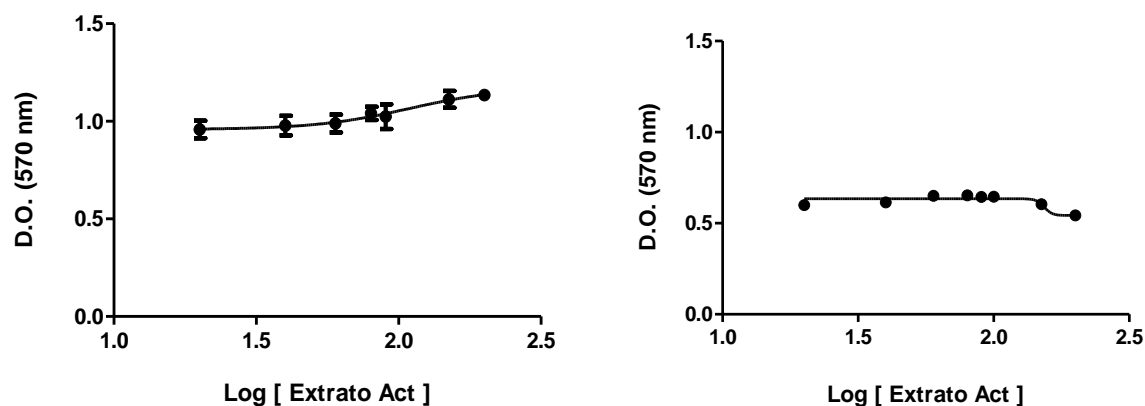


Figura 93: Avaliação da viabilidade de células normais BHK (à esquerda) e CHO (à direita), após tratamento com EAcF.

O DMT, assim como os extratos, apresentou capacidade de induzir a morte e/ou de inibir a proliferação das duas linhagens tumorais testadas, quando comparada ao controle (RPMI a 10% FBS). Para as linhagens B16F10 e 4T1, houve redução da viabilidade celular com valores de $IC_{50} = 81,25$ e $80,64$, respectivamente (Figura 94). Os dados para células normais ainda não foram obtidos.

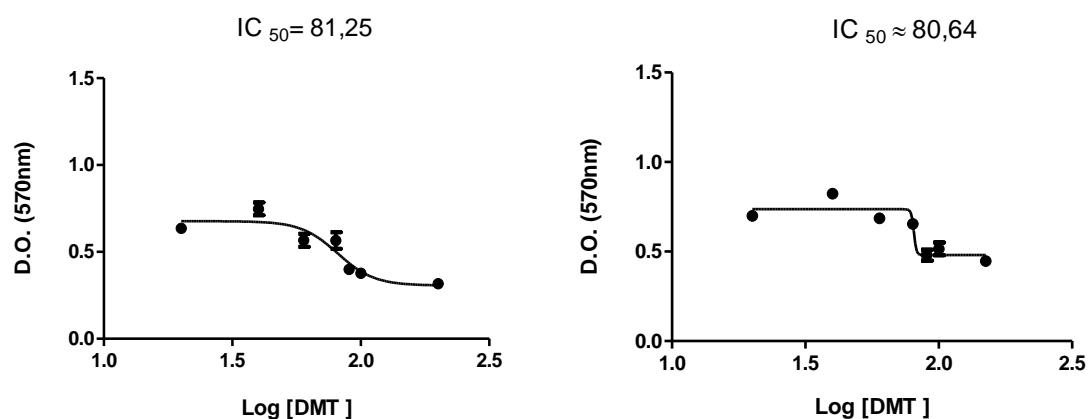


Figura 94: Avaliação da viabilidade de células tumorais, B16F10 (à esquerda) e 4T1 (à direita), após tratamento com DMT.

Os resultados obtidos, para EMeF, EAcF e DMT, abrem perspectivas para a realização de testes mais precisos para demonstrar por quais vias tais substâncias estariam reduzindo a viabilidade de células tumorais. É importante ressaltar que os extratos não reduziram a viabilidade de células normais, de forma contrária, há uma tendência ao estímulo da proliferação das mesmas. Atividade que será avaliada, posteriormente, como continuidade deste trabalho.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico dos extratos hexânico (EHxF), clorofórmico (ECIF), e metanólico (EMeF) das folhas de *Psychotria viridis* (Rubiaceae). Foi também avaliado o potencial quanto a algumas atividades biológicas de alguns dos extratos obtidos, constituintes e misturas isoladas.

O estudo do extrato hexânico resultou no isolamento e caracterização de três esteroides, um pertencente à classe dos cicloartanos (24-metilenocicloartenol), dois pertencentes à classe dos stigmastanos (β -sitosterol e estigmasterol). Um triéster de glicerol, o triterpeno esqualeno e uma mistura de hidrocarbonetos (C-25 a C-31).

O estudo do extrato clorofórmico resultou no isolamento e caracterização de um aldeído de cadeia longa (nonacosanal), um álcool de cadeia longa (nonacosanol), três ácidos graxos (ácido henatriacontanoico, hexadecanoico e heptadecanoico), uma mistura de dois triterpenos pentacíclicos (ácido ursólico e oleanólico), além de um éster de glicerol (monopalmitina).

O estudo do extrato metanólico resultou no isolamento e caracterização de uma mistura dos esteroides glicosilados (3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol e 3-O- β -glicosil-estigmasterol), dois alcaloides indólicos (N,N-dimetiltriptamina e N-metiltriptamina), além de um derivado do ácido quínico (4-*epi*-metil-quinato) e um metil éster (tetradecanoato de metila).

Todas as substâncias foram identificadas principalmente pela técnica de RMN de ^1H e ^{13}C .

As folhas de *P. viridis* mostraram-se rica em substâncias graxas e DMT. Este alcaloide foi o composto majoritário do extrato metanólico. Este fato é importante já que esta espécie é considerada como uma importante fonte deste alcaloide.

As atividades biológicas avaliadas para os extratos e para as substâncias isoladas foram: ação antimicrobiana (antibacteriana), capacidade inibitória da enzima acetilcolinesterase e determinação da citotoxicidade e viabilidade celular.

No teste antimicrobiano, fez-se uma triagem da atividade do extrato metanólico obtidos das folhas de *P. viridis* (EMeF), DMT e triptamina, quanto ao seu potencial antimicrobiano em cinco bactérias diferentes, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*,

K. oxytoca e *K. pneumoniae*. Contudo, nas condições testadas, somente a triptamina, apresentou atividade antimicrobiana, o que leva-se a inferir que a metilação da amina primária, leva à diminuição da atividade antimicrobiana.

Nos testes de inibição da AChE, os extratos: EHxF, ECIF, EAcF e EMeF; e os compostos isolados: cicloartenol, DMT e a mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilados foram testados frente à inibição da AChE e apresentaram inibição da AChE, sendo que as amostras ECIF e EAcF apresentaram inibição maior que 90%, o que abre perspectivas para a realização de testes mais precisos para comprovar a atividade dessas substâncias frente à doença de Alzheimer.

Para a determinação da atividade antioxidante, foram testados o DMT, os extratos ECIF, EMeF EAcF. O EMeF apresentou atividade antioxidante superior a 85 % partir da concentração de 125,00 $\mu\text{g/mL}$. Esse resultado indica uma capacidade de inibição considerável. No DMT e demais extratos não foi possível observar atividade antioxidante.

No teste de viabilidade celular foram testados os EMeF, EAcF e DMT, de forma a determinar a citotoxicidade desses sobre células tumorais, B16F10 e 4T1, e normais, BHK e CHO. Todas as amostras apresentaram, em relação ao controle, capacidade de diminuição da viabilidade nas duas linhagens tumorais testadas. Para as linhagens normais testadas, não houve inibição do crescimento, causada pelos extratos e, portanto, estes não afetaram a viabilidade das células.

A continuidade dos estudos, de outros extratos de outras partes da planta, aponta a possibilidade de identificar novos metabólitos secundários com atividade biológica. Os resultados obtidos tanto fitoquímicos quanto dos testes biológicos justificam a continuidade dos estudos em espécies da família Rubiaceae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M.Z. 2003. Plantas medicinais. 2 ed. Salvador, EDUFBA. **2003**. 221 p.

Alves, A. R.; Silva, M. J. P.; O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. *Rev. Esc. Enfermagem.*, 37(4), 85-91, **2003**.

Alves, C. Q.; David, J. M.; David, J P.; Bahia, M. V.; Aguiar, R. M .Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quím. Nova.*, 33(10), 2202-2210. **2010**.

Andrade, D.; Leopoldo, V. C.; Haas, V. J. Ocorrência de Bactérias Multiresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. *Rev. Bras. Ter. Intensiva.*, 1, 27-33, **2006**.

Aranha, C.; Travaine, G.; Correa, M.A. Aspectos botânicos e taxonômicos das plantas *Banisteriopsis sp* e *Psychotria sp*. 1º Congresso em Saúde. Centro de Estudos Médicos - UDV. São Paulo. **1991**.

Arêas, P. C. F. “Avaliação da atividade antitumoral de naftoquinonas” . Dissertação de mestrado. Instituto de Biologia. Universidade Federal Fluminense RJ. **2007**.

Arias, T D. Glosario de Medicamentos: Desarrol o Evaluación y Uso. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C.: OPS. **1999**. 333 p.

Armesto, N.; Fernández, S.; Ferrero, M.; Gotor, V. Influence of intramolecular hydrogen bonds in the enzyme-catalyzed regioselective acylation of quinic and shikimic acid derivatives. *Tetrahedron*, 62, 5401–5410, **2006**.

Ayatollahi, A. M.; Ghanadian, M.; Afsharypuor, S.; Mesaik, M. A.; Abdalla, O. M.; Shahlaei, M.; Mostafavi, H. Cycloartanes from *Euphorbia aellenii* Rech. f. and their Antiproliferative Activity. *Iran J. Pharm. Res.*, 10(1), 105–112, **2011**.

Barbosa, K. B. F.; Costall, N. M. B.; Alfenas, R. C. G.; De Paula, S. O.; Minim V. P.

R.; Bressan, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.*, 23(4), 629-643, **2010**.

Barboza, H. T. G.; Soares, A. G.; Fonseca, M. J. O.; Costa, J. B. N.; Sarquis, M. I. M. Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase de compostos organofosforados com potencial ação fungicida na cultura de mamão (*Carica papaya* L.). Documentos / Embrapa Agroindústria de Alimentos, **2010**.

Barreiro, E. J. Dos fármacos aos medicamentos. *Cader. Temátic, de Quím. Nova na Escola*, 3, 3-4, **2001**.

Bartus, R. T.; Emerich, D. F. Cholinergic markers in Alzheimer disease. *J. Am. Med. Assoc.*, 282, 2208–2209, **1999**.

Bertolote, J. M., De Girolamo, G. Essential drugs in psychiatry. Division of Mental Health World Health Organization, Geneva. **1993**. 82 p.

Bates, S. H.; Jones, R. B.; Bailey, C. J. Insulin-like effect of pinitol. *Br. J. Pharmacol.*, 130, 1944-1948, **2000**.

Bianchi M. L. P.; Antunes, L. M. G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. de Nutr.*, 12(2), 123-130, **1999**.

Blackledge, R.D.; Taylor, C. M. *Psychotria Viridis* - A Botanical Source of Dimethyltryptamine (DMT). *Microgram Journ.*, 1, 18–22, **2003**.

Borges L. L.; Lúcio T. C.; Gil, E. S.; Barbosa E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopedia Biosfera*, 7, 1-18, **2011**.

Brandão, H. N.; David, J. P.; Couto, R. D.; Nascimento, J. A. P.; David, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quim. Nova*, 33, 1359-1369, **2010**.

Breakefield, X. O.; Castiglione, C. M.; Edelstein, S. B. Monoamine oxidase activity decreased in cells lacking hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity. *Science*, 192, 1018-1020, **1976**.

Callaway, J.C. A proposed mechanism for the visions of dream sleep. *Med. Hypotheses.*, 26, 119-124, **1988**.

Callaway, J.C.; Airaksinen, M.M.; McKenna, D.J.; Brito, C.S.; Grob, C.S. Platelet serotonin uptake sites increased in drinkers of ayahuasca. *Psychopharmacology*, 116, 385-387, **1994**.

Callaway, J.C.; Grob, C.S. Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: a potential combination for severe adverse interactions. *J. Psychoactiv. Drugs*, 30(4), 367-369, **1998**.

Camargo, E. P. A malária encenada no grande teatro social. *Estud. av.*, 9, 211-228, **1995**.

Camargo, M. T. L. A. Amansa-senhor: a arma dos escravos contra seus senhores. *Rev. Pós Ciências Sociais*, 4, 31-42, **2007**.

Camargo, M. T. L. A. Os poderes das plantas sagradas numa abordagem etnofarmacobotânica. *Rev. do Mus. de Arqueo. e Etnol.*, 16, 395-410, **2006**.

Camargo, M. T. L. A. Plantas Medicinais e de Rituais Afro-brasileiros II,. 1 ed. São Paulo: Ícone. **1998**. 232 p.

Cataldo Neto, A. C.; Gauer, G. C.; Furtado, N. R. Psiquiatria para estudantes de medicina. 1 ed. Porto Alegre, EDIPUCRS, **2003**. 945p.

Chan-Blanco, Y.; Vaillan, F.; Perez, A. M.; Reynes, M.; Brillouet, J.; Brat, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *J. Food Comp. Anal.*, 19, 645-654, **2006**.

Chin, Y. H.; Balunas, M. J.; Chai, H. B.; Kinghorn, A. D. Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*, 8, 239-253, **2006**.

Cordell, G. A.; Quinn-Beattie, M. L.; Farnsworth, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother. Res.*, 15, 183-205, **2001**.

Corrêa A.D., Siqueira-Batista, R, Quintas L. E. Plantas Medicinais do Cultivo à

terapêutica. Petrópolis: Ed. Vozes. **1998**. 246 p.

Cozzi, A.; Corsi, B.; Levi, S.; Santambrogio, P.; Biasiotto, G.; Arosio, P. Analysis of the bio-logical functions of H- and L-ferritins in HeLa cells by transfection with siRNAs and cDNAs: Evidence for a proliferative role of L-ferritin. *Blood*. 103, 2377-83, **2004**.

Cragg, G. M.; Newman D. J. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev.*, 8, 313-331, **2009**.

De Pascual, T.; Urones, J.G.; Marcos, I.S.; Basabe, P.; Sexmero, M; Fernández, R. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *J. Phytochem.*, 26, 1767-1776. **1987**.

Delprete, P.G. Rubiaceae. In: Smith, N.P. et al. (eds.). Flowering plant families of the American tropics. Princeton University Press, New York Botanical Garden Press. 328-333. **2004**. 594 p.

Delprete, P.G.; Jardim, J.G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia.*, 63, 101-128. **2012**.

Denizot, F.; Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival-modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*. 89, 271-277. **1986**.

Dunstan, C. A.; Noreen, Y.; Serrano, G.; Cox, P. A.; Perera, P.; Bohlin, L. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assay. *J. Ethnopharmacol*, 57, 35-56, **1997**.

El-Askary, H.I. Terpenoids from *Cleome droserifolia* (Forssk.) Del. *Molecules*. 10, 971-977, **2005**.

Faria, E. O. "*Estudo Fitoquímico das folhas da Espécie Psychotria prunifolia (Kunth) Steyererm (Rubiaceae)*". Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Federal de Goiás. Goiania GO. **2009**.

Farzin, D.; Mansouri, N. Antidepressant-like effect of harmaline and other β -carbolines in the mouse forced swim test. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 16, 324-328,

2006.

Fernandes, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? *Nat. Biotechnol.*, 24, 1497-1503, **2006.**

Fortunato, J. J.; "Efeitos comportamentais e neuroquímicos da harmina em modelos animais de depressão", Tese Doutorado. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre RS, **2009.**

Garrido, R. G.; Sabino, B. D. Ayahuasca: entre o legal e o cultural. *Saúde Ética Justiça*, 14, 44-53, **2009.**

Gaujac, A.; Martinez, S. T.; Gomes, A. A.; Andrade, S. J.; Pinto, A. C.; David, J. M.; Navickiene, S.; Andrade, J. B. Application of analytical methods for the structural characterization and purity assessment of N,N-dimethyltryptamine, a potent psychedelic agent isolated from *Mimosa tenuiflora* inner barks. *Microchem. J.*, 109, 78–83, **2013.**

Gomes, P. B. "Avaliação dos efeitos centrais e antinociceptivos das frações isoladas da raiz de *Petiveria alliacea* L. (TIPI) em camundongos". Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza CE, **2006.**

Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10 ed. São Paulo: McGrawHill, **2005.** 1615p.

Goulart, M. O. F.; Sant'Ana, A. E. G.; Lima, R. A.; Cavalcante, S. H.; Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B. *Quim. Nova.*, 16, 95–100, **1993.**

Govaerts, R.; Frodin, D.G.; Ruhsam, M.; Bridson, D.M. & Davis, A.P. World checklist & bibliography of Rubiaceae. The Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. 2007. Disponível em: <http://apps.kew.org/wcsp/compilersReviewers.do>. Acesso em: 15 jan. 2015.

Groisman, A. Saúde, risco e uso religioso em disputas pelo status legal do uso da ayahuasca: implicações e desdobramentos de processos judiciais ocorridos nos estados unidos. *Antropologia em primeira mão*, 139, 5-19, **2013**.

Gunstone, F.D. ^{13}C -NMR studies of mono-, di- and triacylglycerols leading to qualitative and semiquantitative information about mixtures of these glycerol esters. *Chem. Phys. Lipids*, 58, 219-224, **1991**.

Gunstone, F.D.; Pollard, M.R.; Scrimgeour, C.M.; Gilman, N.W.; Holland, B.C. ^{13}C Nuclear magnetic resonance studies of acetylenic acids. *Chem. Phys. Lipids.*, 17, 1-13, **1976**.

Hardy, J.; Selkoe D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.*, 297(5580), 353-356. **2002**.

Houghton, P. J.; Agbedahunsi, J. M.; Adegbulugbe, A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochem.*, 65, 2893-2896. **2004**.

Hueb, T. O. Doença de Alzheimer. *Rev. Bras. de Med.* 65, 90-95, **2008**.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). A situação do câncer no Brasil. 2006. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo>. Acesso em: 15 jan. 2015.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). O que é o câncer? 2009. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322 Acesso em: 15 jan. 2015.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Quimioterapia. 2008. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br>. Acesso em: 15 jan. 2015.

Khan, M.R.; Kihara, M.; Omoloso, A.D. Antimicrobial activity of *Psychotria microlabastra*. *Fitoterap.* 72, 818-821, **2001**.

Kihara, T.; Sawada, H.; Nakamizo, T.; Kanki, R.; Yamashita, H.; Maelicke, A. Galantamine modulates nicotinic receptor and blocks abeta-enhanced glutamate toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325, 976-982, **2004**.

Libot, F.; Miet, C.; Kunesh, N.; Poisson, J. E. Rubiacées d'Océanie: alcaloïdes de *Psychotria oleoides* de Nouvelle-Calédonie et de *Calicodendron milnei* du Vanuatu (Nouvelles-Hébrides). *J. Nat Prod.*, 50, 468-473, **1987**.

Lima, L. B. "Triagem da atividade antioxidante e anticolinesterásica de extratos naturais: seleção e estudo químico biomonitorado de *Streptomyces sp.* e de *Psychotria carthagenensis*". Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto SP. **2011**.

Locher, C. P.; Burch, M. T.; Mower, H. F.; Berestecky, J.; Davis, H.; van Poel, B.; Lasure, A.; Berghe, D. A. V.; Vlietinck, A. J.; Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 49, 23-32, **1995**.

Luna, L.E. Shamanism among the mestizo population of the Peruvian Amazon. *J. Ethnopharmacol.*, 11, 123-33, **1986**.

Marcel, S.F.; Jie, L. K.; Lam, C.C. ¹H-Nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of saturated, acetylenic and ethylene triacylglycerols. *Chem. Phys. Lipids*, 77, 155-171, **1995**.

Matos, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: UFC, **1988**, 129p.

Medrado, H. H. S.; Davida, J. M.; Juceni P. D.; Brandão, H. N. Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados. *Quim. Nova*, 01, 1-16, 2014.

Melatti, J. C. Índios do Brasil. 1 ed. São Paulo: Edusp, **2007**. 304 p.

Moraes, A. P. "Alcaloides indólicos das partes aéreas de *psychotria sp.*(rubiaceae) e síntese de tiohidantoínas e tioureias derivadas de aminoácidos e do R-(+)-limoneno" Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Federal de Goiás. Goiânia GO. **2013**.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to

proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63, **1983**.

Nakano, V., Sheila A. Nishiyama, Mario J. Avila-Campos. Beta-lactamases: Sua importância na resistência bacteriana. Disponível em: http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=47%3Abeta-lactamases-sua-importancia-na-resistencia-bacteriana&catid=13%3Atemas-de-interesse&Itemid=57&lang=br. Acesso em: 18 jan. 2015.

Nascimento, J. C.; Lage, L. F. O.; Camargos, R. C. D.; Amaral, J. C.; Costa, L. M.; Sousa, A. N; Oliveira, F. Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. *Rev. Bras. Farm.*, 92(4), 327-332, **2011**.

Nepokroeff, M.; Bremer, B.; Systma, K. J.; Reorganizacion of the genus *Psychotria* and tribe *Psychotrieae* (Rubiaceae) Inferred from ITS and rbcL Dequece Data. *Syst. Bot.*, 24, 5-27, **1999**.

Nicolaou, K. C.; Montagnon, T.; *Molecules that Changed the World*. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH, **2008**. 385 p

Nodari, R.O.; Guerra, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. P. 11-24. In: C.M.O. Simões et al. (eds.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS/ UFSC. **1999**.

Oliveira, D. M. "Estudo Químico, Farmacológico e Aplicação de Métodos Computacionais na Elucidação Estrutural de Constituintes Químicos de Folhas de *Maytenus acanthophylla* REISSEK (CELASTRACEAE)". Tese de Doutorado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte MG. **2012**.

Pedraza-Farina, L. G. Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis. *Yale J. Biol. Med.*, 79, 95-103, **2006**.

Pereira, J. L.; Downes, A.; Gorgulho, A.; Patel, V.; Malkasian, D.; De Salles, A. Alzheimer's disease: The role for neurosurgery. *Surg. Neurol. Int.*, 55, 385-390. **2014**.

Pinto, A.; Junior, V F. V.; Maciel, M. A. M. Plantas Medicinais: Cura Segura? *Quím. Nova.* 28 (3), 519-528, **2005**.

Pires, A. P. S.; Oliveira, C. D. R.,; Yonamine, M. Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*,31(1), 15-23, **2010**.

Porto, D. D.; Henriques A, T.; Fett-Neto, A. G. Bioactive Alkaloids from South American Psychotria and Related Species. *Open Bioact. Compd. J.*, 2, 29- 36, **2009**.

Provost, J. Proliferation Assay: MTT Protocol. Minnesota State University Department of Chemistry. Disponível em: [http:// web.mnstate.edu/provost/mtt%20proliferation%20assay%20protocol.pdf](http://web.mnstate.edu/provost/mtt%20proliferation%20assay%20protocol.pdf). Acesso em: 18 jan. 2015.

Řezanka, T.; Sigler, K.; Identification of very long chain unsaturated fatty acids from Ximenia oil by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography–mass spectroscopy. *Phytochem.*, 68 (6), 925–934, **2007**.

Rhee, I. K.; Meent, M. van de; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatogr.*, 915(2), 217-223, **2001**.

Rodrigues, E.; Carlini, E. A. Plants with possible psychoactive effects used by the Krahô Indians, Brazil. *Rev. Bras. Psiquiatria.* 28 (4), 277-82, **2006**.

Rodrigues, E.; Carlini, E. A. Possíveis efeitos sobre o sistema nervoso central de plantas utilizadas por duas culturas brasileiras (quilombolas e índios). *Arq. Bras. Fitomed. Cientif.*, 1 (3), 147-154, **2003**.

Rodrigues, M. P. B.; Gontijo, D. T. Doença de Alzheimer: uma análise da produção científica publicada em periódicos brasileiros no período de 2002 a 2007. *Revista Estud. interdiscipl. envelhec.* 14(1), 25-43, **2009**.

Santos, M. H.; Batista, B. L.; Duarte, S. M. S.; Abreu, Celeste M. P.; Gouvêa, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). *Quim. Nova.*, 30, 604-610, **2007**.

Schmidt, M. I.; Duncan, B. B.; Silva, G. A.; Menezes, A. M.; Monteiro, C. A.; Barreto, S. M.; Chor, D.; Menezes, P. R. Health in Brazil. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet.*, 377, 1949–1961, **2011**.

Schulten, H.R.; Murray, K. E.; Simmleit, N. Natural Waxes Investigated by Soft Ionization Mass Spectrometry. *Z. Naturforsch.* 42, 178-190, **1987**.

Selkoe, D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.*, 81, 741-766, **2001**.

Sereniki, A.; Vital, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul*, 30, 0-0, **2008**.

Silva, F. A. M.; Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A.; Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quím. Nova.*, 22, 94-103, **1999**.

Silva, F. C. "Estudo fitoquímico de galhos e raízes de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae), obtenção de derivados do lupeol e avaliação de atividades biológicas". Tese de doutorado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte MG. **2014**.

Silva, M. S. S. "Alcaloides de Plantas da Família Amaryllidaceae: Isolamento Caracterização e Testes de Inibição de Acetilcolinesterase". Tese de doutorado. Departamento de Química Orgânica. Universidade Estadual de Campinas. Campinas SP. **2009**.

Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira, G. M. J.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova.* 30, 351-355, **2007**.

Sousa, G. F.; "Estudo fitoquímico do extrato hexânico e da atividade biológica de constituintes das folhas de *Maytenus robusta* (Celastraceae)". *Dissertação de Mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte MG. 2012.*

Smith, M. A. C. Doença de Alzheimer. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 21, 03-07, **1999.**

Standaert, D. G.; Young, A. B. Treatment of central nervous system degenerative disorders. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. cap. 22. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12ª ed. Editora McGraw-Hill., **2010.**

Steyermark, J.A. Rubiaceae. In: Lasser, T. & Steyermark, J.A. Flora de Venezuela. Caracas: Fieldiana, Bot, **1974.** 2070p.

Teixeira, D. C.; Quinteiro, M. M. C.; Baptista, A. A; Silva, J. G. Uso e manejo de plantas ritualísticas na comunidade do santo daime em Galdinópolis, Nova Friburgo, RJ, BRASIL. *Rev. de Ciên. da Vida.*, 28 (2), 63-74, **2008.**

Terra, F. S. "Avaliação da qualidade de vida do paciente renal crônico submetido à hemodiálise e sua adesão ao tratamento farmacológico de uso diário". *Dissertação de Mestrado. Universidade José do Rosário Vellano. Alfenas MG. 2007.*

Trevisan, M. T. S.; Macedo, F. V. V.; Meent, M. van de; Rhee, I. K.; Verpoorte, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Quím. Nova.*, 26, 301-304, **2003.**

USDA, NRCS. 2015. The PLANTS Database. National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA. Disponível em: <http://plants.usda.gov>. Acesso em: 17 jan. 2015.

Valadares, Y. M. "*Remijia ferruginea* D.C., *Jacaranda caroba* D.C. e *Solanum paniculatum* L: fitoquímica, atividades biológicas e síntese de derivados dos ácidos ursólico e oleanólico". Tese de doutorado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte MG. **2009.**

Valladão, F. N. "Estudo fitoquímico de folhas e polpa de fruto de *Maytenus Salicifolia* (Celastraceae) e análise quimiotaxonômica em *Maytenus* sp." Tese de doutorado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte MG. **2011**.

Veiga, J. V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev. bras. farmacogn.* 18, 308-313, **2008**.

Viegas, C. J.; Bolzani, V. S. ; Barreiro, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím. Nova*, 29, 326-337. **2006**.

Weber, J. T.; Courvalin, P. An Emptying Quiver: Antimicrobial Drugs and Resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 791-793, **2005**.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world? Ask the expert, 2008. Disponível em: < <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html> >. Acesso em 15 jan. 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Cancer: Fact Sheet, n. 297,2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. Acesso em: 15 jan. 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). First International Age-friendly Cities Conference. Disponível em: < <http://www.who.int/ageing/en/>>. Acesso em: 15 de jan. 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Projections of the global burden of disease including cancer: 2002-2030, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Regional office for the Western Pacific. Manila: WHO, **1993**. 86 p.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). The world medicines situation:

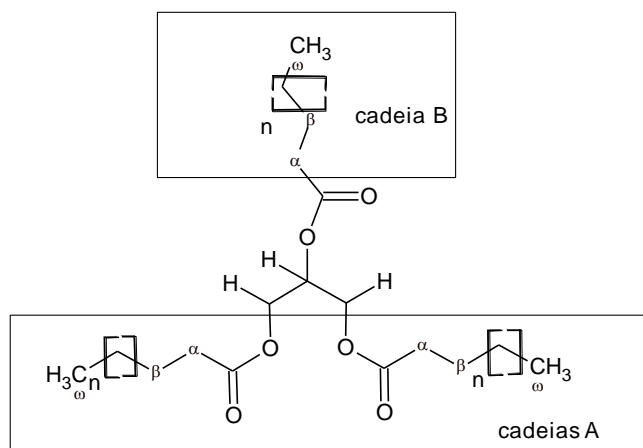
traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, **2011**. 12p.

Yaffe K.; Barnes D. E. The Projected Impact of Risk Factor Reduction on Alzheimer's Disease Prevalence. *Lancet. Neurol.*, 10, 819-828, **2011**.

ANEXOS

Tabela 12: Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV2 (200 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para triacilglicerol

	Carbono	PV2 δ_c (ppm)	Triacilglicerol δ_c (ppm)*
Cadeias A	Carbonila A	173,21	173,11
	A	62,18	62,03-62,30
	A	34,11	34,1-34,4
	B	24,85	24,7-25,01
	Ω	14,09	14,10
Cadeia B	Carbonila B	171,97	172,08
	B	69,02	68,14-69,10
	A	34,26	34,1-34,4
	B	24,89	24,7-25,01
	ω	14,09	14,10



* GUNSTONE *et al.*, 1991.

Tabela 13: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C obtido para PV3 (200 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para β -sitosterol e estigmasterol

N	Carbono	β -sitosterol δ_{C}^* (ppm)	PV3 δ_{C} (ppm)	Carbono	estigmasterol δ_{C}^* (ppm)	PV3 δ_{C} (ppm)
1	CH ₂	37,3	37,28	CH ₂	37,3	37,28
2	CH ₂	31,6	31,69	CH ₂	31,7	31,68
3	CH	71,8	71,82	CH	71,8	71,82
4	CH ₂	42,5	42,32	CH ₂	42,5	42,32
5	C	140,7	140,78	C	140,8	140,78
6	CH	121,7	121,72	CH	121,7	121,72
7	CH ₂	31,8	31,94	CH ₂	31,9	31,94
8	CH	31,9	31,94	CH	31,9	31,94
9	CH	50,1	50,17	CH	50,2	50,17
10	C	36,5	36,53	C	36,6	36,53
11	CH ₂	21,1	21,10	CH ₂	21,1	21,10
12	CH ₂	39,7	39,80	CH ₂	39,7	39,80
13	C	42,3	42,34	C	42,4	42,34
14	CH	56,7	56,79	CH	56,9	56,89
15	CH ₂	24,3	24,32	CH ₂	24,4	24,59
16	CH ₂	28,2	28,26	CH ₂	29,0	28,92
17	CH	56,0	56,09	CH	56,1	56,09
18	CH ₃	11,9	11,88	CH ₃	12,1	11,99
19	CH ₃	19,4	19,41	CH ₃	19,4	19,41
20	CH	36,1	36,16	CH	40,5	40,49
21	CH ₃	18,8	18,79	CH ₃	21,1	21,23
22	CH ₂	33,9	33,98	CH	138,4	138,31
23	CH ₂	26,0	26,13	CH	129,3	129,30
24	CH	45,8	45,87	CH	51,3	51,25
25	CH	29,2	29,19	CH	31,9	31,93
26	CH ₃	19,8	19,83	CH ₃	21,3	21,23
27	CH ₃	19,1	19,06	CH ₃	19,0	19,41
28	CH ₂	23,0	23,09	CH ₂	25,4	25,41
29	CH ₃	12,0	11,99	CH ₃	12,3	11,87

Fonte: GOULART *et al.*, 1993. Nota: * 50 MHz, CDCl_3 ,

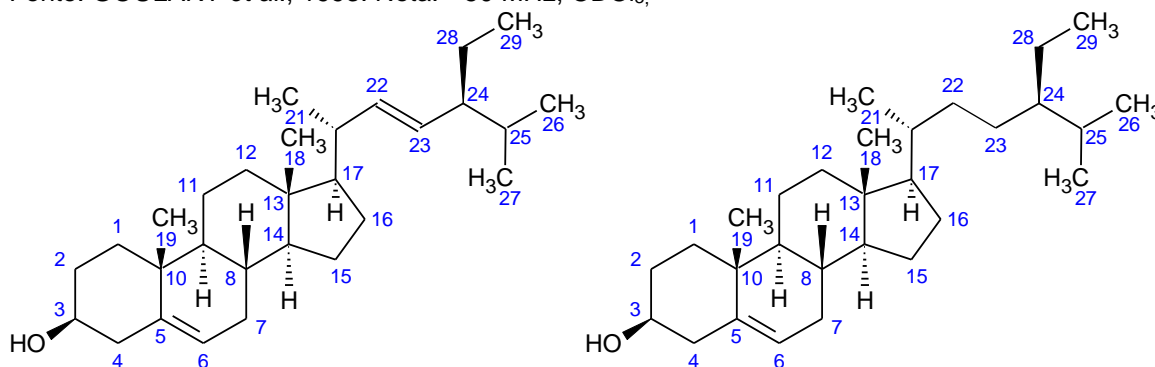


Tabela 14: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV4 com os dados da literatura para esqualeno

Carbono	Atribuição	PV4 δ_{C} (ppm)	Esqualeno δ_{C} (ppm)*
27 e 30	-CH ₃	16,01	16,01
28 e 29	-CH ₃	16,05	16,06
24 e 26	-CH ₃	17,68	17,68
1 e 25	-CH ₃	25,69	25,69
8 e 17	-CH ₂ -	26,69	26,69
4 e 21	-CH ₂ -	26,80	26,80
12 e 13	-CH ₂ -	28,29	28,30
5 e 20	-CH ₂ -	39,75	39,75
9 e 16	-CH ₂ -	39,75	39,77
7 e 18	-CH=	124,31	124,30
3 e 22	-CH=	124,34	124,44
11 e 14	-CH=	124,44	124,44
2 e 23	=C=	131,25	131,26
10 e 15	=C=	134,91	134,91
6 e 19	=C=	135,12	135,12

*OLIVEIRA, 2012

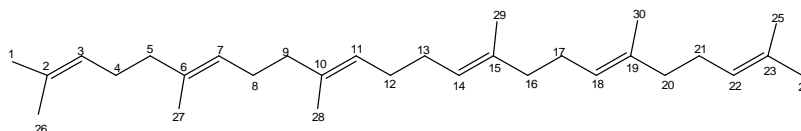


Tabela 15: Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) obtido para PV5 e dados da literatura para 24-metilenocicloartenol

Carbono		PV5 $\bar{\delta}_C$ (ppm)*	24-metilenocicloartenol $\bar{\delta}_C$ (ppm)*
1	CH ₂	32,07	31,99
2	CH ₂	30,45	30,41
3	CH	78,83	78,87
4	C	40,54	40,51
5	CH	47,21	47,14
6	CH ₂	21,19	21,14
7	CH ₂	28,20	26,11
8	CH	48,02	48,00
9	C	20,08	20,03
10	C	26,23	26,11
11	CH ₂	26,07	26,03
12	CH ₂	35,65	35,59
13	C	45,41	45,33
14	C	48,89	48,84
15	CH ₂	33,02	32,93
16	CH ₂	26,58	26,03
17	CH	52,37	52,30
18	CH ₃	18,06	18,04
19	CH ₂	29,93	29,90
20	CH	36,18	36,14
21	CH ₃	18,39	18,33
22	CH ₂	35,15	35,03
23	CH ₂	31,41	31,34
24	C	156,79	156,94
25	CH	33,89	33,83
26	CH ₃	21,94	21,89
27	CH ₃	22,06	22,01
28	CH ₃	19,40	19,34
29	CH ₃	14,06	14,01
30	CH	25,52	25,45
31	CH	106,10	105,95

*DE PASCUAL *et al.*, 1987

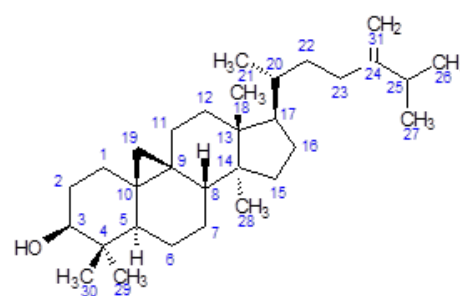
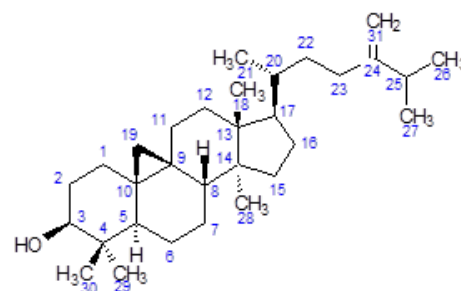


Tabela 16: Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para PV5 (400 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para 24-metilenocicloartenol

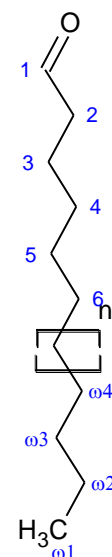
H	24-metilenocicloartenol		PV5 δ_c (ppm)	
	δ_H (ppm)*	J (Hz)	δ_H (ppm)	J (Hz)
H3	3,28 m		3,28 m	
H18	0,97 s		0,97 s	
H19	0,33 d	4,17	0,33 d	4,2
	0,56 d	4,11	0,56 d	4,2
H21	0,90 m		0,90 m	
H26 e H27	1,02 d	6,8	1,03 d	6,8
H28	0,90 s		0,90 s	
H29	0,97s		0,97s	
H30	0,81 s		0,81 s	



*DE PASCUAL *et al.*, 1987

Tabela 17: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV6 com os dados calculados* para nonacosanal

Carbono	PV6 δ_c (ppm)	Nonacosanal*	
		δ_c ppm	Intervalo de confiança
C(1)	C	202,85	202,4 ---
C(2)	CH_2	43,90	43,70 0,2
C(3)	CH_2	22,09	22,00 0,1
C(4)	CH_2	29,17	28,86 1,3
C(5)	CH_2	29,36	29,06 0,3
C(6)	CH_2	29,44	29,44 0,3
$(\text{CH}_2)_n$	CH_2	29,71	29,54 0,4
ω_4	CH_2	29,59	29,41 ---
ω_3	CH_2	31,93	32,04 1,1
ω_2	CH_2	22,69	22,52 2,7
ω_1	CH_3	14,12	14,25 3,8



*Predicted NMR data calculated using Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs) Software V11.01 (© 1994-2014 ACD/Labs)

Tabela 18: Comparação dos dados de RMN de ^1H de PV6 com os dados da literatura para nonacosanal

H	Nonacosanal*			PV6		
	δ_H (ppm)	J (Hz)	Integração	δ_H (ppm)	J (Hz)	Integração
CH ₃	0,91	t, 6,8	3,0	0,88	t, 6,8	3,0
CH ₂	1,00 -1,90	M	52,0	1,63-1,59	m	52,3
CH ₂ CHO	2,35	t, 7,2	2,0	2,39-2,37	td, 7,3 e 1,9	2,0
CHO	9,73	t,1,8	1,0	9,74	t,1,6	1,0

*ŘEZANKA E SIGLER, 2007

Tabela 19: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV7 com os dados da literatura para álcool graxo de cadeia longa

Tipo de carbono	PV7 δ_C (ppm)	δ_C (ppm) literatura*
CH ₃	14,66	14,12
CH ₂	23,27	22,72
CH ₂	26,57	25,97
CH ₂	29,94	29,32
CH ₂	30,20	29,44
CH ₂	29,94	29,67-29,71
CH ₂	32,53	31,93
CH ₂	33,64	33,04
CH ₂	63,11	62,40

OLIVEIRA, 2012

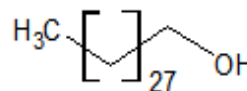
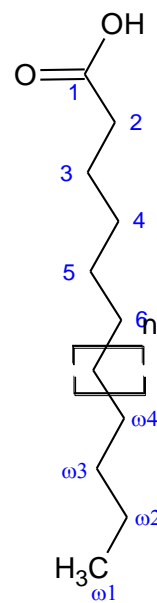


Tabela 20: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV8 com os dados da literatura para ácido graxo.

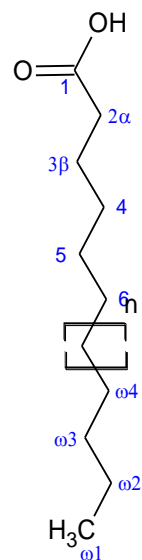
Carbono		Ácido graxo δ_c^* (ppm)	PV8 δ_c (ppm)
C(1)	C	180,43	176,50
C(2)	CH ₂	34,18	34,69
C(3)	CH ₂	24,76	25,25
C(4)	CH ₂	29,17	25,15
C(5)	CH ₂	29,32	29,36
C(6)	CH ₂	29,51	29,54
(CH ₂) _n	CH ₂	29,76	29,71
ω 4	CH ₂	29,45	29,43
ω 3	CH ₂	32,01	31,92
ω 2	CH ₂	21,74	22,69
ω 1	CH ₃	14,11	14,13



*GUNSTONE *et al.*, 1976

Tabela 21: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV9 com os dados da literatura para o ácido hexadecanoico

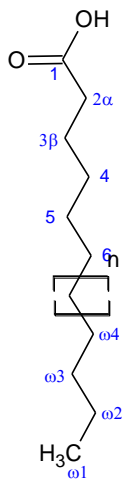
Carbono		Ácido hexadecanoico δ_c^* (ppm)	PV9 δ_c^* (ppm)
C1	C	180,60	177,99
C2 α	CH ₂	34,26	33,71
C3 β	CH ₂	24,84	24,73
C4	CH ₂	29,26	29,09
C5	CH ₂	29,41	29,25
C6	CH ₂	29,60	29,45
(CH ₂) _n	CH ₂	29,84	29,71
ω 4	CH ₂	29,53	29,37
ω 3	CH ₂	32,11	31,94
ω 2	CH ₂	22,82	22,70
ω 1	CH ₃	14,13	14,12



* GUNSTONE *et al.*, 1976

Tabela 22: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV10 com os dados da literatura para o ácido heptadecanoico

Carbono		Ácido heptadecanoico δ_{C}^* (ppm)	PV10 δ_{C} (ppm)
C1	C	180,61	176,69
C2 α	CH ₂	34,23	34,64
C3 β	CH ₂	24,79	25,20
C4	CH ₂	29,20	29,16
C5	CH ₂	29,38	29,33
C6	CH ₂	29,57	29,53
(CH ₂) _n	CH ₂	29,79	29,70
ω 4	CH ₂	29,49	29,41
ω 3	CH ₂	32,05	31,93
ω 2	CH ₂	22,78	22,70
ω 1	CH ₃	14,13	14,12



GUNSTONE *et al.*, 1976

Tabela 23: Atribuição de sinais do espectro de RMN de ^1H para PV11 (400 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para o ácido ursólico e oleanólico

Carbono	Ácido ursólico			PV11			Ácido oleanólico			PV11		
	δ_{C}^* (ppm)	J (Hz)		δ_{C} (ppm)	J (Hz)		δ_{C}^* (ppm)	J (Hz)		δ_{C} (ppm)	J (Hz)	
C2	1,51	m	-	1,51	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	3,19	m	-	3,19	m	-	3,19	m	-	3,19	m	-
C5	0,71	m	-	0,71	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	5,24	t	3,8	5,25	t	3,8	5,27	t	-	5,28	t	3,76
C16	1,60	m	-	1,60	m	-	-	-	-	-	-	-
C18	2,19	d	11	2,20	d	11,45	2,80	M	14 e 4	2,80	m	-
C23	0,98	-	-	0,99	-	-	1,22	s	-	-	-	-
C24	0,77	-	-	0,78	-	-	0,77	s	-	0,78	s	-
C25	0,93	-	-	0,93	-	-	1,26	s	-	1,26	s	-
C27	1,09	-	-	1,08	-	-	1,30	s	-	1,30	s	-
C29	0,86	d	6,5	0,86	-	-	0,97	s	-	0,95	s	-
C30	0,95	d	6,5	0,95	-	-	1,14	s	-	1,14	-	-

* VALADARES, 2009. 100 MHz

Tabela 24: Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV11 e comparação com dados da literatura para o ácido oleanólico e ursólico

Carbono		ácido oleanólico δ^* (ppm)	PV11 δ (ppm)	ácido ursólico δ^* (ppm)	PV11 δ (ppm)
1	CH ₂	38,51	38,65	39,00	38,65
2	CH ₂	26,74	27,24	27,02	27,24
3	CH	78,79	79,10	79,00	79,10
4	C	38,67	38,77	38,96	38,77
5	CH	55,22	55,25	53,3	52,65
6	CH ₂	18,32	18,34	18,59	18,34
7	CH ₂	32,74	32,97	33,35	32,95
8	C	39,25	39,25	39,77	39,54
9	CH	47,64	47,58	47,87	47,59
10	C	36,98	37,01	37,21	37,01
11	CH ₂	23,01	23,32	23,54	23,32
12	CH	122,3	122,66	125,8	125,90
13	C	143,84	144,78	138,5	139,05
14	C	41,70	42,01	42,35	42,01
15	CH ₂	27,67	28,01	28,20	28,01
16	CH ₂	23,38	23,32	24,49	24,15
17	C	46,31	46,58	48,10	47,98
18	CH	41,22	41,07	53,10	52,65
19	CH ₂	45,98	45,9	39,38	39,07
20	C	30,61	30,62	39,22	38,85
21	CH ₂	33,86	33,81	30,95	30,62
22	CH ₂	32,54	32,95	37,11	36,70
23	CH ₃	27,96	28,01	28,20	28,15
24	CH ₃	15,50	15,61	15,61	15,48
25	CH ₃	15,21	15,34	15,81	15,61
26	CH ₃	16,79	16,93	17,11	16,93
27	CH ₃	25,81	25,93	23,73	23,63
28	C	180,99	182,88	181,00	182,88
29	CH ₃	32,99	33,07	17,20	16,93
30	CH ₃	23,46	23,63	21,30	21,17

* VALADARES, 2009. 100 MHz

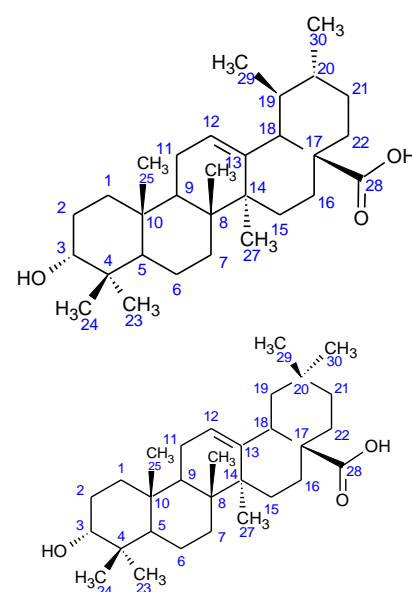
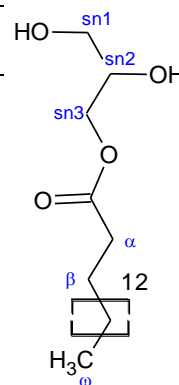


Tabela 25: Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para PV12 (100 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para monopalmitina

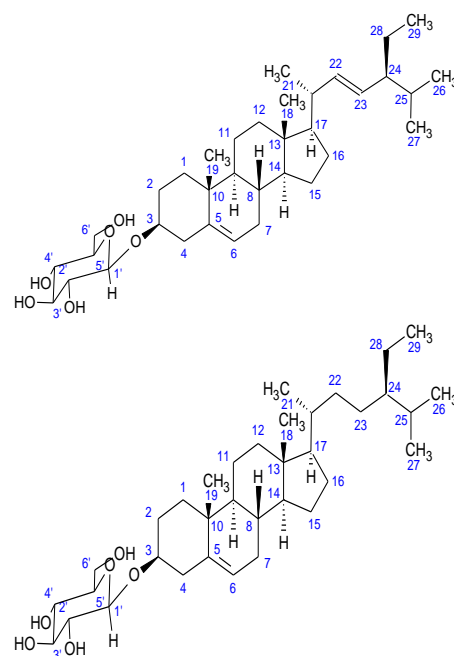
Carbono		Monopalmitina δ_c (ppm)	PV12 δ_c (ppm)
C1	C=O	174,27	174,37
sn-1	CH_2OH	63,34	63,36
sn-2	CHOH	70,26	70,31
sn-3	CH_2O	65,11	65,20
α	CH_2	34,19	34,18
β	CH_2	24,94	24,93
$(\text{CH}_2)_{12}$	CH_2	29,7 – 22,77	29,5 – 22,70
	CH_3	14,11	14,12



*GUNSTONE, 1991

Tabela 26: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV13 com os dados da literatura para β -sitosterol glicosilado e estigmasterol glicosilado

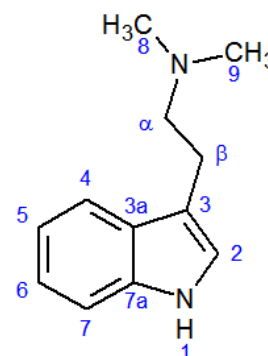
Carbono	β -sitosterol glicosilado δ_C (ppm)*	PV13 δ_C (ppm)	Carbono	Estigmasterol glicosilado δ_C (ppm)**	PV13 δ_C (ppm)	
1	CH ₂	36,7	37,23	CH ₂	37,4	37,23
2	CH ₂	29,19	29,80	CH ₂	28,5	28,24
3	CH	78,73	78,15	CH	78,1	78,15
4	CH ₂	38,82	38,86	CH ₂	39,2	38,86
5	C	140,5	140,52	C	140,8	140,52
6	CH	121,85	121,65	CH	121,9	121,65
7	CH ₂	31,88	31,83	CH ₂	32,1	31,83
8	CH	31,93	31,83	CH	32,0	31,83
9	CH	50,15	50,11	CH	50,3	51,20
10	C	36,14	36,65	C	36,9	36,65
11	CH ₂	19,83	19,80	CH ₂	21,2	21,01
12	CH ₂	39,77	39,73	CH ₂	39,9	39,73
13	C	42,32	42,26	C	42,5	42,26
14	CH	56,73	56,66	CH	56,8	56,66
15	CH ₂	23,1	23,10	CH ₂	24,5	24,27
16	CH ₂	28,26	26,12	CH ₂	29,4	29,80
17	CH	56,06	56,01	CH	56,2	55,92
18	CH ₃	11,86	11,81	CH ₃	12,0	11,81
19	CH ₃	19,07	19,04	CH ₃	19,9	19,24
20	CH	36,14	36,10	CH	36,4	36,15
21	CH ₃	18,81	18,68	CH ₃	19,2	18,79
22	CH ₂	33,97	33,94	CH	137,3	138,40
23	CH ₂	26,11	24,26	CH	128,3	129,22
24	CH	45,85	45,81	CH	46,0	43,88
25	CH ₂	29,19	28,24	CH	26,3	26,11
26	CH ₃	18,81	18,79	CH ₃	20,0	19,80
27	CH	19,31	19,24	CH ₃	19,4	19,04
28	CH ₃	22,69	21,01	CH ₂	29,9	29,80
29	CH ₃	12,07	11,97	CH ₃	12,5	11,98
1'	CH	101,77	102,01	CH	102,4	102,90
2'	CH	73,97	74,38	CH	75,0	75,09
3'	CH	76,3	77,59	CH	78,2	78,15
4'	CH	71,41	71,40	CH	71,5	71,39
5'	CH	76,3	77,28	CH	78,1	78,15
6'	CH ₂	62,86	62,63	CH ₂	62,7	62,63



*SILVA, 2014. **EL-ASKARY, 2005

Tabela 27: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV14 com os dados da literatura para a dimetiltriptamina

Carbono	DMT δ_c (ppm)*	PV14 δ_c (ppm)**
C2	122,01	123,08
C3	114,37	113,44
C3a	127,67	128,62
C4	118,94	119,15
C5	119,28	119,54
C6	121,79	122,30
C7	111,36	112,25
C7a	136,55	138,15
C α	60,53	61,33
C β	23,86	24,16
C8; C9	45,61	45,29

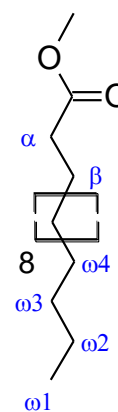


* Fonte: GAUJAC et al., 2013. Solvente: CDCl_3

** Solvente: CD_3OD

Tabela 28: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PV17 com os dados da literatura tetradecanoato de metila

Carbono	Tetradecanoato de metila δ_c (ppm)*	PV17 δ_c (ppm)
O- CH_3	51,27	51,46
C=O	174,08	174,43
CH $_2$ α	34,18	34,14
CH $_2$ β	25,12	24,98
(CH $_2$) $_n$	29,37-29,85	29,71-29,17
CH $_2$ ω_4	29,55	29,47
CH $_2$ ω_3	32,11	31,94
CH $_2$ ω_2	22,84	22,71
CH $_2$ ω_1	14,14	14,13



*GUNSTONE et al., 1976