



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MATHEUS SILVA DE BARROS

**ESTUDO QUÍMICO DE *PSYCHOTRIA CARTHAGENENSIS* (RUBIACEAE) E
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, ANTIOXIDANTE E
ANTICOLINESTERÁSICA**

UBERLÂNDIA

2022

MATHEUS SILVA DE BARROS

**ESTUDO QUÍMICO DE *PSYCHOTRIA CARTHAGENENSIS* (RUBIACEAE) E
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, ANTIOXIDANTE E
ANTICOLINESTERÁSICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

Coorientadora: Profa. Dra. Amanda Danuello

UBERLÂNDIA

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B277 Barros, Matheus Silva de, 1997-
2022 Estudo químico de *Psychotria carthagenensis*
(Rubiaceae) e avaliação das atividades citotóxica,
antioxidante e anticolinesterásica [recurso eletrônico]
/ Matheus Silva de Barros. - 2022.

Orientador: Marcos Pivatto.

Coorientadora: Amanda Danuello Pivatto.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.521>

Inclui bibliografia.

1. Química. I. Pivatto, Marcos, 1979-, (Orient.). II.
Pivatto, Amanda Danuello, 1981-, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em
Química. IV. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 351, PPGQUI				
Data:	Trinta de agosto de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14:00 h	Hora de encerramento:	17:00 h
	12012QMI009				
Nome do Discente:	Matheus Silva de Barros				
Título do Trabalho:	Estudo químico de <i>Psychotria carthagenensis</i> (Rubiaceae) e avaliação das atividades citotóxica, antioxidante e anticolinesterásica				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Prospecção química de espécies nativas do Cerrado brasileiro visando a descoberta de novos compostos bioativos				

Reuniu-se por meio de webconferência, através do link <https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/marcospivatto-2>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Aline Coqueiro, do Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Medianeira; Wellington de Oliveira Cruz, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia e Marcos Pivatto, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Marcos Pivatto, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Pivatto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/08/2022, às 17:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wellington de Oliveira Cruz, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/08/2022, às 17:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Coqueiro, Usuário Externo**, em 30/08/2022, às 17:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3879136** e o código CRC **53A6ACB4**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e familiares pela atenção e compaixão que me proporcionam sempre.

Aos meus colegas de laboratório que me apoiam e me alegram em meio as dificuldades.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia–UFU, pelo espaço cedido a esta pesquisa.

Ao professor Dr. Marcos Pivatto pela orientação e compartilhamento do conhecimento científico.

A professora Dr^a. Amanda Danuello pelo aprimoramento do trabalho.

Ao professor Dr. Foued Salmen Espindola, do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, pela disponibilidade, assim como do seu orientado Romario Vilarinho, pela realização dos ensaios de atividade anticolinesterásica e antioxidante.

A prof. Dr^a. Fernanda Maria Santiago do laboratório de Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela realização do ensaio de citotoxicidade.

A todos os professores de química pelo excelente trabalho que exercem como educadores.

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPEMIG pelo apoio financeiro aos projetos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta etapa, um enorme obrigado!

RESUMO

Psychotria carthagenensis (Rubiácea) é uma espécie arbustiva nativa do Cerrado brasileiro, popularmente conhecida como carne-de-vaca. É um dos principais ingredientes utilizados na bebida alucinógena ayahuasca, bastante comum no Peru. O material vegetal foi coletado no município de Corumbaba-GO e identificado pelo fazendeiro do local como a provável causa das mortes de ruminantes. Inicialmente foi preparado o extrato etanólico das folhas (EEFo) e flores (EEFl), que foram submetidos a extração líquido-líquido, de onde foram obtidas as frações em hexano (FHFo e FHFl), diclorometano (FDFo e FDFl), acetato de etila (FAFo e FAFI) e resíduo hidroalcolico (FHAFo e FHAFI). A fração FDFo foi selecionada para cromatografia em coluna que resultou em seis novas subfrações que foram analisadas por RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135, de onde foi possível observar a presença de compostos fenólicos. Os extratos etanólicos e as frações foram submetidos aos ensaios para avaliação da atividade antioxidante (DPPH e FRAP), sendo que os melhores resultados foram observados para as frações FAFo e FAFI, quando comparados com os controles positivos. Essas frações apresentaram atividade antioxidante superior a 90% no método de DPPH. As amostras também foram submetidas aos ensaios de inibição da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). As frações FAFo e FAFI apresentaram valores de inibição superior a 79% para AChE e superiores a 61% para BChE, próximos daqueles dos controles positivos (galantamina e rivastigmina). Os extratos e frações também foram submetidos ao ensaio para avaliação da atividade citotóxica utilizando células NIH/3T3, sendo que os extratos e frações apresentaram atividade citotóxica apenas na maior concentração testada (600 $\mu\text{g/mL}$), indicando baixo potencial citotóxico neste ensaio. Dentre as amostras testadas, apenas as frações FHFl e FDFl apresentaram citotoxicidade de 59 e 41%, respectivamente. Desse modo, esses resultados sugerem que *P. carthagenensis* não apresenta compostos com potencial citotóxico em quantidade suficiente que pudesse ser detectada no ensaio realizado, mas estudos adicionais são necessários para confirmação, inclusive em modelos animais. No entanto, os resultados de inibição da AChE/BChE e da atividade antioxidante apresentados pelos extratos e frações indicam que *P. carthagenensis* é uma fonte promissora de compostos com potencial para o desenvolvimento de fármacos anti-Alzheimer.

Palavras-chave: *Psychotria carthagenensis*, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, citotoxicidade.

ABSTRACT

Psychotria carthagenensis (Rubiacea) is a shrubby species native to the Brazilian Cerrado, popularly known as carne-de-vaca. It is one of the main ingredients used in the hallucinogenic drink ayahuasca, which is quite common in Peru. The plant material was collected in the municipality of Corumbáiba-GO and identified as the probable cause of death of ruminants in this region. Initially, the ethanolic extract of the leaves (EEFl) and flowers (EEFf) was prepared and submitted to liquid-liquid extraction, from which the fractions in hexane (FHFo and FHFf), dichloromethane (FDFo and FDFf), ethyl acetate (FAFo and FAFf) and hydroalcoholic residue (FHAFo and FHAFf) were obtained. The FDFo fraction was selected for column chromatography which resulted in six new subfractions that were analyzed by ^1H , ^{13}C and 135 DEPT NMR, from which the presence of phenolic compounds could be observed. The ethanolic extracts and fractions were submitted to antioxidant activity evaluation assays (DPPH and FRAP), and the best results were observed for the fractions FAFo and FAFf, when compared to the positive controls. These fractions showed antioxidant activity higher than 90% in the DPPH method. The samples were also submitted to acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibition assays. The fractions FAFo and FAFf presented inhibition values higher than 79% for AChE and higher than 61% for BChE, close to those of the positive controls (galantamine and rivastigmine). The extracts and fractions were also submitted to a cytotoxic activity assay using NIH/3T3 cells, and the extracts and fractions presented cytotoxic activity only at the highest concentration tested (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$), indicating low cytotoxic potential. Among the samples tested, only the fractions FHFf and FDFf showed cytotoxicity of 59 and 41%, respectively. Thus, these results suggest that *P. carthagenensis* does not present compounds with cytotoxic potential in sufficient quantity that could be detected in the assay performed, but additional studies are needed for confirmation even in animal models. However, the results of AChE/BChE inhibition and antioxidant activity presented by the extracts and fractions indicate that *P. carthagenensis* is a promising source of compounds with potential for the development of anti-Alzheimer pharmaceuticals.

Keywords: *Psychotria carthagenensis*, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfina, quinina (e derivados) e salicilina (e derivados).	15
Figura 2 – Fármacos aprovados pelo FDA de janeiro de 1981 a setembro de 2019 (total de 1881).	16
Figura 3 – Biomas considerados <i>hotspots</i> de preservação global.	17
Figura 4 – Ocorrência do gênero <i>Psychotria</i> no mundo.	21
Figura 5 – Alcaloides presentes em <i>P. viridis</i> .	21
Figura 6 – Alcaloides pirrolidinoindolínicos presentes nas flores de <i>P. colorata</i> .	22
Figura 7 – Alcaloides presentes nas espécies de <i>P. leiocarpa</i> e <i>P. nemorosa</i> .	23
Figura 8 – Cumarinas, flavonóis e terpenoides isolados de espécies do gênero <i>Psychotria</i> .	24
Figura 9 – Flores e folhas de <i>P. carthagenensis</i> .	25
Figura 10 – Ocorrência de <i>P. carthagenensis</i> no mundo.	25
Figura 11 – Triterpenos identificados em <i>P. carthagenensis</i> .	26
Figura 12 – Ácido <i>p</i> -cumárico em <i>P. carthagenensis</i> .	26
Figura 13 – Biossíntese da ACh.	27
Figura 14 – Hidrólise da ACh.	28
Figura 15 – Sinapse colinérgica.	29
Figura 16 – Sinapse colinérgica na ausência e a na presença de inibidores de AChE.	30
Figura 17 – Medicamentos inibidores de acetilcolinesterase.	32
Figura 18 – Agrotóxicos organofosforados inibidores irreversíveis de AChE.	33
Figura 19 – Agrotóxicos carbamatos inibidores irreversíveis de AChE.	33
Figura 20 – Fluxograma de extração da galantamina.	39
Figura 21 – Mecanismo da reação aldólica entre a cortisona e o anisaldeído.	44
Figura 22 – Reação de Liebermann-Buchard.	45
Figura 23 – Reação de Dragendorff.	45
Figura 24 – CC da fração FDFo.	46
Figura 25 – Cromatoplasmas das frações obtidas da CC (PCDC1).	47
Figura 26 – Cromatoplasmas das frações obtidas da CC (PCDC2).	48
Figura 27 – Fluxograma do fracionamento cromatográfico do FDFo de <i>P. carthagenensis</i> .	48
Figura 28 – Espectros de RMN ¹ H da fração PCDC1-F ₁₋₇₆ a 400 MHz em CDCl ₃ .	49

Figura 29 – Espectros de RMN ^{13}C da fração PCDC1-F ₁₋₇₆ a 400 MHz em CDCl_3 .	49
Figura 30 – Espectros de RMN DEPT 135 da fração PCDC1-F ₁₋₇₆ a 400 MHz em CDCl_3 .	50
Figura 31 – Espectros de RMN ^1H da fração PCDC1-F ₇₇₋₁₁₄ a 400 MHz em CDCl_3 .	51
Figura 32 – Espectros de RMN ^{13}C da fração PCDC1-F ₇₇₋₁₁₄ a 400 MHz em CDCl_3 .	51
Figura 33 – Espectros de RMN DEPT 135 da fração PCDC1-F ₇₇₋₁₁₄ a 400 MHz em CDCl_3 .	52
Figura 34 – Cromatograma (CLAE-EM) da galantamina.	53
Figura 35 – EM-IES-(+) em alta resolução da galantamina.	53
Figura 36 – EM/EM-IES-(+) da galantamina.	54
Figura 37 – Proposta de fragmentação para a galantamina.	54
Figura 38 – Gráfico de avaliação da atividade inibidora de AChE (%) dos extratos e frações.	55
Figura 39 – Gráfico de avaliação da atividade inibidora de BChE (%) dos extratos e frações.	56
Figura 40 – Reação entre o DTNB e a acetilcolina.	57
Figura 41 – Atividade antioxidante pelo método DPPH.	58
Figura 42 – Curva analítica de trolox.	59
Figura 43 – Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BChE	Butilcolinesterase
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
Ch	Colina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
d	Dupleto
DA	Doença de Alzheimer
d.i.	Diâmetro interno
DPN	Derivados de produtos naturais
EEFo	Extrato etanólico das folhas de <i>P. carthagenensis</i>
EEFl	Extrato etanólico das flores de <i>P. carthagenensis</i>
EM	Espectrometria de massas
FAFo	Fração acetato de etila das folhas
FAFl	Fração acetato de etila das flores
FE	Fase estacionaria
FHA Fo	Fração hidroalcoólica das folhas
FHA Fl	Fração hidroalcoólica das flores
FHFo	Fração hexânica das folhas
FHF1	Fração hexânica das flores
FDFo	Fração diclorometano das folhas
FDFl	Fração diclorometano das flores

FM	Fase móvel
GBIF	<i>Global Biodiversity Information Facility</i>
HEPES	Agente tamponante do ácido sulfônico zwitteriônico
IC ₅₀	Concentração necessária para inibição de 50%
IQ	Instituto de Química
MFA	Monofluoracetato
MTT	Sal de tetrazólio amarelo
NCE	<i>New chemical entities</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPs	Organofosforados
PNs	Produtos naturais
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹ H e ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de ¹ H e ¹³ C
s	Simpleto
SNC	Sistema nervoso central
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico em relação ao TMS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Equipamentos disponíveis para realização do projeto de pesquisa.	37
Tabela 2. Massas obtidas das extrações líquido-líquido dos EEFo- <i>Pc</i> e EEFI- <i>Pc</i> .	42
Tabela 3. Prospecção química das frações obtidas da extração líquido-líquido das folhas e flores de <i>P. carthagenensis</i> .	43
Tabela 4. Citotoxicidade dos extratos etanólicos e das frações de <i>P. carthagenensis</i> em porcentagem (%) de células mortas.	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Química de produtos naturais	13
1.2. Plantas tóxicas para bovinos	17
1.3. Rubiaceae e o gênero <i>Psychotria</i>	19
1.4. <i>Psychotria carthagenensis</i>	24
1.5. Hipótese colinérgica	27
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Solventes	34
3.2. Soluções utilizadas como reveladores	35
3.2.1. Solução de vanilina sulfúrica	35
3.2.2. NP/PEG	35
3.2.3. Dragendorff	35
3.2.4. Solução de anisaldeído	35
3.2.5. Solução de KOH (5%)	36
3.2.6. Liebermann-Buchard	36
3.3. Técnicas cromatográficas	36
3.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	36
3.3.2. Cromatografia em coluna (CC)	36
3.4. Técnicas espectroscópicas	36
3.5. Equipamentos utilizados	37
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	37
4.1. Coleta do material vegetal e preparo do extrato etanólico	37
4.2. Extração líquido-líquido	38
4.3. Extração da galantamina a partir do bromidrato de galantamina [®] comercial	38
4.4. Atividades biológicas	39
4.4.1. Atividade anticolinesterásica	39
4.4.2. Atividade antioxidante pelo método de DPPH	40
4.4.3. Atividade antioxidante pelo método de FRAP	41
4.4.4. Atividade citotóxica utilizando a linhagem celular NIH/3T3	41
5. Resultados e discussão	42
	11

5.1. Preparação dos extratos etanólicos e fracionamento	42
5.2. Prospecção química dos extratos e frações	42
5.2.1 Análise por cromatografia em coluna da fração diclorometano das folhas (FDFo)	46
5.3 Análise por CLAE-EM da galantamina	52
5.3 Avaliação da inibição da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE)	54
5.4. Atividade antioxidante pelo método de DPPH	57
5.5. Atividade antioxidante pelo método de FRAP	58
5.6. Ensaio de citotoxicidade sobre a linhagem celular NIH/3T3	60
6. Conclusões	61
REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química de produtos naturais

Há registros do uso de plantas como recurso medicinal datados desde 60.000 anos a.C., estando presentes em diversas culturas, como a Egípcia, Hindu, Persa, Grega e os povos da América pré-colombiana, tornando as plantas medicinais uma das formas mais antigas de tratamento medicinal. No Brasil esta prática é anterior à chegada dos Portugueses sendo amplamente utilizada pelos povos indígenas com várias destas práticas utilizadas até os dias atuais (ROCHA et al., 2015).

Na Idade Média, além de técnicas medicinais, muitos venenos foram descobertos na natureza, como o veneno de Hemlock (*Conium maculatum*) utilizado na execução de prisioneiros, inclusive o filósofo Sócrates, durante o Império Grego (DEWICK, 2002). Desta forma é evidente como a natureza se torna uma enorme fonte de inspiração para o estudo químico de forma benéfica no cotidiano (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

As atividades farmacológicas presentes em plantas ocorrem devido a presença de princípios ativos capazes de desempenhar inúmeros papéis no organismo, combatendo ou causando diversas enfermidades (CECHINEL E YUNES, 1998). No século XIX, com a consolidação da química como ciência, surgem os primeiros trabalhos científicos de isolamento dos metabólitos secundários, associando as propriedades biológicas afirmadas pela cultura popular, com as estruturas químicas do que chamamos de produtos naturais (PNs) (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2014).

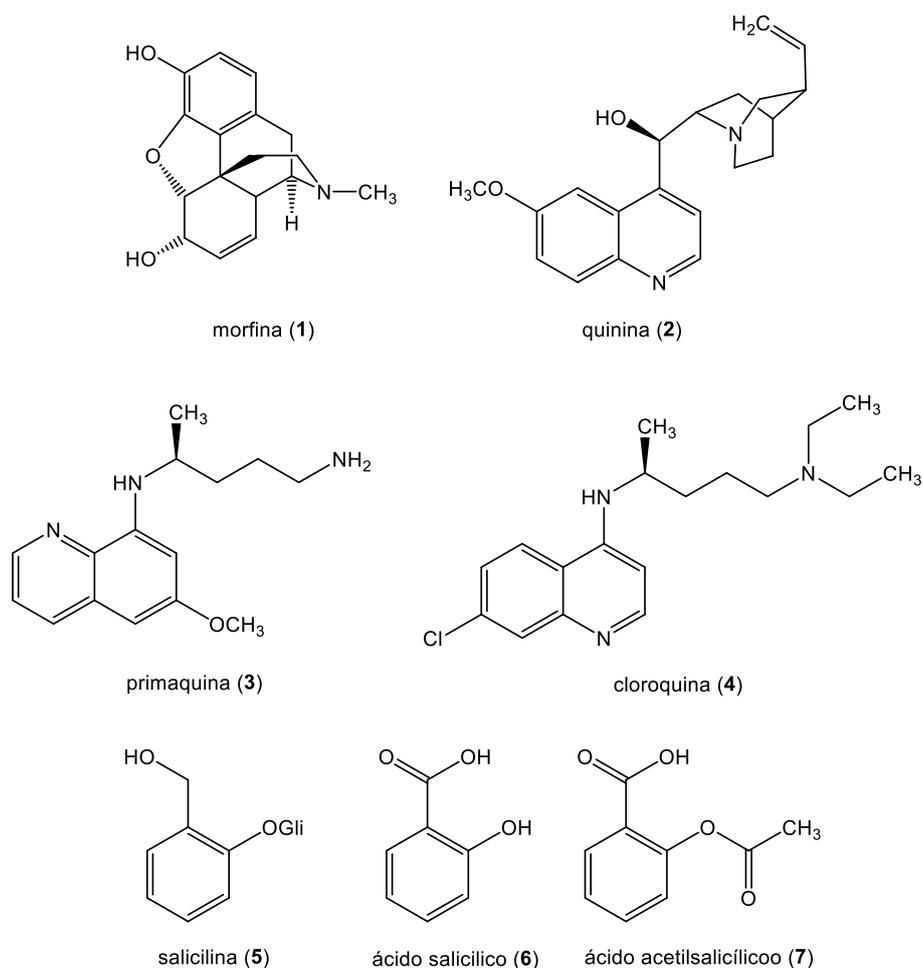
Os PNs desempenham um papel importante na evolução dos vegetais e na interação com os seres vivos pois a incapacidade de locomoção das plantas pressionou as espécies a desenvolverem mecanismos químicos que possibilitem funções específicas sem comprometimento das células e processos fisiológicos primários, pelo fato de serem influenciadas ao longo do tempo pelos fatores bióticos e abióticos (ISAH, 2019). Em geral, os PNs pertencem a três principais classes de metabólitos: terpenos, compostos fenólicos e nitrogenados (RASKIN et al., 2002). Sabendo do enorme potencial dos PNs é importante entender a história e a origem do estudo e isolamento destas substâncias.

A História da química de PNs se assemelha a química medicinal, os primeiros registros escritos sobre a utilização de técnicas medicinais se encontra em tábuas de argila

da Mesopotâmia e datam de cerca de 2600 a.C., entre as substâncias utilizadas estavam óleos de espécies de *Cedrus* (cedro) e *Cupressus sempervirens* (cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), espécies de *Commiphora* (mirra) e *Papaver somniferum* (papoula), todos ainda hoje em uso para o tratamento de sintomas como tosse, resfriados, infecções parasitárias e inflamações. O registro farmacêutico egípcio mais conhecido é o papiro de Ebers, datado de 1.500 a.C., que documenta cerca de 700 medicamentos (principalmente plantas) e inclui métodos como gargarejos, rapés, cataplasmas, infusões, pílulas e pomadas, utilizando como veículos de administração oral cerveja, leite, vinho e mel (CRAGG e NEWMAN, 2003). Com o desenvolvimento da química orgânica moderna, compostos foram isolados e elucidados sendo comercializados como fármacos importantes para o combate a doenças e outras enfermidades.

Em 1804 o primeiro composto puro foi isolado de uma planta, a morfina (**1**), obtida do ópio (*Papaver somniferum*) por Friedrich Sertürner (CONCHEIRO et al., 2014). Em 1820 Pelletier e Caventou isolaram a quinina (**2**) de uma espécie do gênero *Cinchona* (Rubiaceae) sendo este e seus derivados sintéticos, a primaquina (**3**) e cloroquina (**4**), os principais princípios ativos utilizados contra a malária (OLIVEIRA e SZCZERBOWSKI, 2009). Após Johann A. Buchner em 1828 isolar uma pequena quantidade de salicilina (**5**) da espécie *Salix alba* (Salicaceae) cientistas buscaram elevar o rendimento, até que em 1860, Hermann Kolbe sintetizou o ácido salicílico (**6**) com propriedade analgésica comprovada e seu sal sódico a partir do fenol; Em 1898, Felix Hofmann sintetizou o ácido acetilsalicílico (**7**) (Figura 1), que apresentava menos efeitos colaterais e mesma atividade analgésica, este então é o medicamento mais vendido da farmacêutica Bayer com nome comercial Aspirina® (WEISSMANN, 1991).

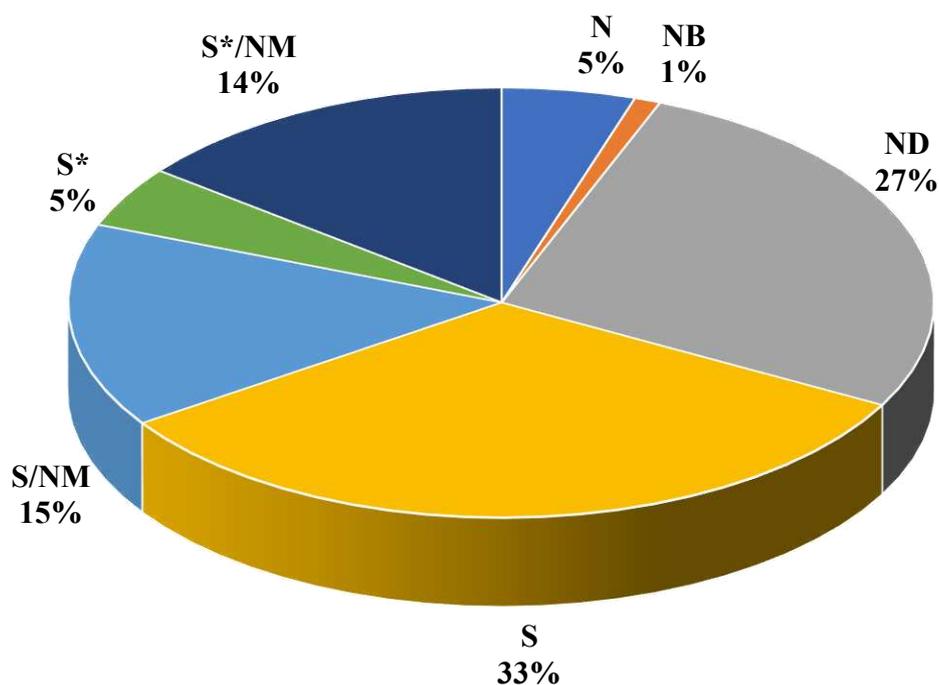
Figura 1 – Morfina, quinina (e derivados) e salicilina (e derivados).



Fonte: O autor.

Diversos PNs foram descobertos e comercializados na forma de medicamentos desde o primeiro isolamento de um princípio ativo. Entre os 1211 novos protótipos de baixo massa molecular conhecidos como *new chemical entities* (NCE) introduzidos no mercado mundial como produtos farmacêuticos durante o período de 1981–2019, 68,6% são derivados de produtos naturais, miméticos (que imitam) ou projetados a partir de estruturas de PNs (Figura 2), demonstrando que os PNs desempenham um papel altamente significativo no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Estes dados indicam também que biomas com alta biodiversidade, como os encontrados no Brasil, são fontes promissoras de novos PNs.

Figura 2 – Fármacos aprovados pelo FDA de janeiro de 1981 a setembro de 2019 (total de 1881).

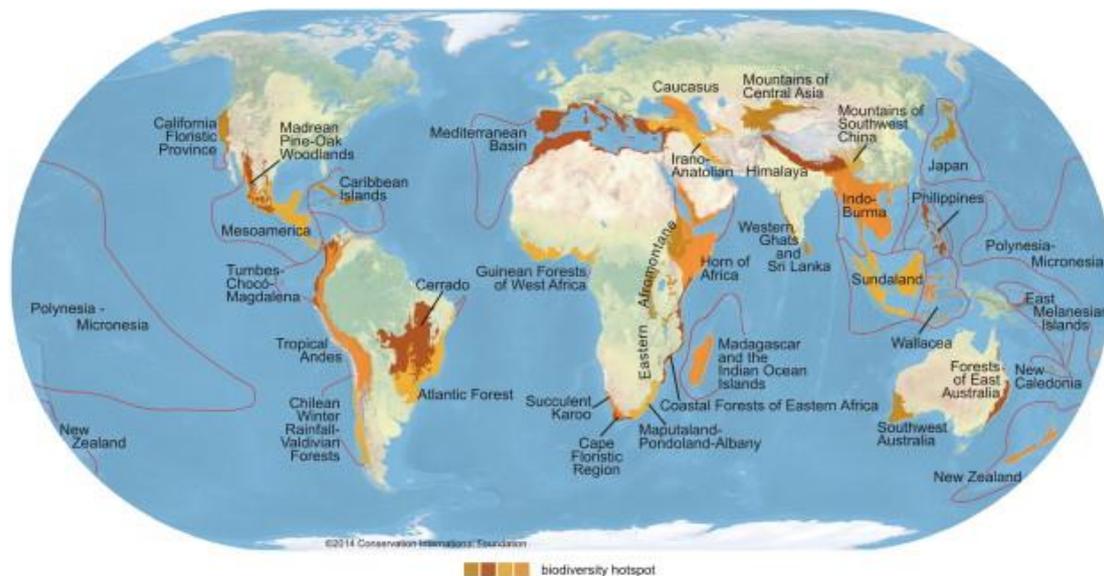


Nota: S*/MN: Sintético com grupo farmacofórico inspirado em produto natural; S*: Sintético com grupo farmacofórico de produto natural; S/MN: Sintético inspirado em produto natural (“imitação de produto natural”); S = Totalmente sintético; DN: Derivado de produto natural (modificação semissintética); NB: Produto natural botânico (mistura definida); N: Produto natural inalterado.

Fonte: Adaptado de Newman e Cragg (2020).

O mercado brasileiro de fitoterápicos ainda é pouco relevante, representado menos de 5% do mercado mundial, fechado em 27 bilhões de dólares americanos em 2014, apesar da grande biodiversidade (DUTRA et al., 2016). O Brasil possui uma biodiversidade extremamente rica, responsável por aproximadamente 20% de todas as espécies vivas conhecidas, que são encontrados em diversos biomas importantes, como a Amazônia, o Cerrado e as regiões da Mata Atlântica (VALLI et al., 2013). O Brasil contém diversos biomas e dois deles, o Cerrado e a Mata Atlântica são considerados “hotspots” de preservação mundial (Figura 3), que graças a mudanças de habitats e sua superexploração, poluição, espécies invasoras e em particular as mudanças climáticas estes biomas sofrem perdas anualmente de território e diversidade tanto animal quanto vegetal (MARCHESE, 2015).

Figura 3 – Biomas considerados *hotspots* de preservação global.



Fonte: Marchese (2015).

Neste contexto é enfatizada a importância do estudo fitoquímico para que cada vez mais a flora brasileira seja reconhecida como fonte promissora para a descoberta de novos PNs com potencial farmacológico. No entanto, é importante salientar que além do potencial farmacológico os PNs também podem apresentar toxicidade para os seres humanos e animais.

1.2. Plantas tóxicas para bovinos

O metabolismo das plantas é responsável pela síntese de produtos químicos para proteção contra insetos e parasitas, estas substâncias podem ser uma das causas de tais plantas apresentarem características tóxicas para animais, desta forma existe uma grande variedade de espécies vegetais com esta capacidade (WINK, 2004). A natureza tóxica de uma espécie de planta varia de espécie para espécie, e depende de vários fatores, incluindo químico, físico, biológico e ambiental (presença de substâncias químicas, sua concentração, idade da planta, parte utilizada, estado de maturação de seus frutos, tipos de solos, temperatura, umidade, etc.) (MENDIETA et al., 2014). Estas plantas quando ingeridas por animais podem causar diversos malefícios inclusive morte (BARBOSA et al., 2007). A escassez de alimentos, de modo geral, é a razão que leva os animais a ingerir plantas nocivas, afetando diretamente o agronegócio com a morte de

animais ou indiretamente com gastos veterinários para o tratamento do animal (JAMES; NIELSEN; PANTER, 1992).

O setor agropecuário teve participação de 27,4% do PIB brasileiro em 2020 (CEPEA/USP, 2015), sendo que a exportação de carne bovina representa 30% do PIB deste setor, cerca de 3% de toda a exportação do país (EMBRAPA, 2022). Desta forma é evidente a importância deste setor para o desenvolvimento do país e nesse sentido o conhecimento de potenciais plantas tóxicas que podem causar intoxicação dos animais.

No Brasil são descritas pelo menos 88 espécies tóxicas, pertencentes a 50 gêneros, este número aumenta anualmente (RIET-CORREA et al., 2001). A presença de concentrações elevadas de monofluoroacetato (MFA) em plantas é uma das principais justificativas para apresentarem toxicidade as tornando causadoras de morte súbita em ruminantes (OLIVEIRA NETO et al., 2017). Sabe-se que o MFA apresenta pouca toxicidade celular em sua forma inicial, entretanto uma vez ingerido e absorvido, as reações enzimáticas dentro das células convertem o fluoroacetato em fluoroacetil-CoA, que na presença de oxalacetato, é convertido pela citrato sintase em fluorocitrato, um potente inibidor da enzima aconitase, de grande importância na via do ácido cítrico na respiração aeróbica dos seres vivos (TWIGG; MEAD; KING, 1986).

As principais referências de plantas tóxicas que apresentam morte súbita em bovinos são pertencentes à três famílias: Rubiaceae, Malpighiaceae e Bignoniaceae totalizando 22 espécies, estas mortes ocorrem sem que seja observado lesões cardíacas indicando intoxicação por MFA (NASCIMENTO et al., 2018). As espécies do gênero *Amorimia* (Malpighiaceae): *A. amazonica*, *A. exotropa*, *A. pubiflora*, *A. rigida* e *A. septentrionalis*, apresentam toxicidade a ruminantes, todas apresentam MFA (DUARTE et al., 2013). Nesta mesma família as espécies do gênero *Niederzuehlla*: *N. stannea*, *N. multiglandulosa* e *N. acutifolia* são as responsáveis por esta atividade, sendo que *N. multiglandulosa* e *N. acutifolia* mesmo apresentando MFA em sua composição causam sintomas diferentes, se comparado as outras espécies que contêm MFA, como aborto e lesões relacionadas ao sistema nervoso central, indicando conter também outros compostos tóxicos (ANDERSON, 2006).

A espécie *Tanaecium bilabiatum* (Bignoniaceae) é a segunda espécie com mais registros como causadora de morte súbita em bovinos, atrás apenas da *Palicourea marcgravii*, ambas apresentam MFA em sua composição (KREBS; KEMMERLING; HABERMEHL, 1994). A concentração de MFA nas folhas

desta espécie varia entre 0,0001% e 0,039% de acordo com o local de coleta (LIMA et al., 2016).

No estado de Goiás, no município de Corumbaíba houve relatos de morte súbita em Bovinos, uma planta que pertencia a dieta destes animais foi coletada e levada para identificação botânica, inicialmente acreditava-se ser a espécie *Palicourea hoffmannseggiana* (Rubiaceae) que já contém na literatura atividade tóxica contra ruminantes, inicialmente esta espécie era denominada *Psychotria hoffmannseggiana* entretanto posteriormente a espécie foi reclassificada pertencendo ao gênero *Palicourea* (Rubiaceae) (OHASHI e OLIVEIRA, 2020). Após a identificação a espécie coletada foi então confirmada ser outra espécie pertencente a mesma família a *Psychotria carthagenensis*, a proximidade filogenética entre as duas espécies incentivou o estudo da espécie coletada para averiguação se ambas possuíam a atividade tóxica a bovinos.

As espécies do gênero *Palicourea* consideradas: *P. marcgravii*, *P. aeneofusca*, *P. juruana* e *P. grandiflora* eram as únicas relatadas com esta atividade tóxica à ruminantes até 1981, ambas apresentando MFA em sua composição (TOKARNIA e DÖBEREINER, 1981). Posteriormente outras oito espécies foram relatadas contendo MFA e apresentando atividade tóxica: *P. amapaensis*, *P. longiflora*, *P. barraensis*, *P. macarthurorum*, *P. nigricans*, *P. vacillans* e *P. juruana* (COOK et al., 2014). Desta forma fica destacado o potencial da família Rubiaceae contendo espécies tóxicas à ruminantes, o gênero *psychotria* onde que compreende a espécie estudada neste projeto é uma promissora fonte de estudos nessa área, visando sua proximidade filogenética a outros gêneros com potencial toxicidade.

1.3. Rubiaceae e o gênero *Psychotria*

A família Rubiaceae ocupa o quarto lugar em diversidade de Angiospermas, após as famílias Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae (DELPRETE e JARDIM, 2012). É constituída de cerca de 44 tribos, 620 gêneros envolvendo 13.526 espécies arbóreas e arbustivas. A América do Sul é contemplada com quase um terço de todas as espécies existentes da família Rubiaceae (CHIQUIERI et al. 2004).

Algumas espécies da família Rubiaceae apresentam valores históricos e econômicos como o café (*Coffea arabica* L.) consumido em todos os países, o jenipapo

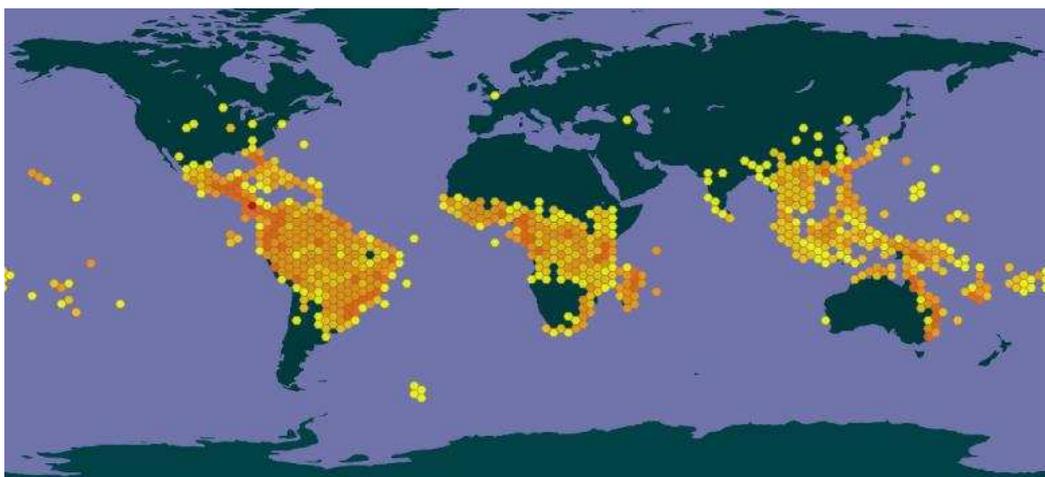
(*Genipa americana* L.) com seus frutos utilizados para pintura corporal em diversas tribos indígenas e a quina (*Cinchona calisaya* Wedd.), que possui o quinino usado no tratamento da malária (RUHSAM, GOVAERTS, DAVIS, 2008).

Outro exemplo é a espécie *Uncaria tomentosa*, conhecida popularmente como unha-de-gato, usada há muito tempo na medicina tradicional no tratamento de câncer, feridas e artrite. Devido às suas propriedades anti-inflamatória, citotóxica, antioxidante, e principalmente, imunestimulante, esta espécie possui alto valor comercial no Brasil e no mundo, sendo comercializada *in natura* ou como fitoterápico na forma de cápsulas e comprimidos (HEITZMAN et al., 2005).

Estudos em 154 táxons demonstraram que a família Rubiaceae pode ser dividida em três subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae) também em 44 tribos com base na proximidade filogenética (ROVA et al., 2002). As espécies de Rubiaceae presentes na América do Sul apresentam uma característica de adaptação aos mais diferentes biomas, sendo encontradas na Bacia Amazônica, na Mata Atlântica brasileira, no Cerrado, na caatinga e nas restingas (DELPRETE e JARDIM, 2012).

A subfamília Rubioideae está presente em todo o mundo e a maioria das tribos e espécies são tropicais ou subtropicais, mas algumas espécies ocorrem nas regiões temperadas (BREMER e ERIKSSON, 2009). O gênero *Psychotria* pertence à família Rubiaceae e compreende mais de 2000 espécies, distribuídas predominantemente em florestas tropicais e subtropicais (JUNIOR et al., 2016), sendo 251 nativas brasileiras (ZAPPI et al., 2015), pertence a subfamília Rubioideae e à tribo *Psychotrieae* (MARQUES; LYRA; CONSERVA, 2013). O gênero é encontrado em praticamente todas as florestas e sub-bosques tropicais sendo em grande maioria arbustos ou pequenas árvores (Figura 4) (SAKAI e WRIGHT, 2008).

Figura 4 – Ocorrência do gênero *Psychotria* no mundo.

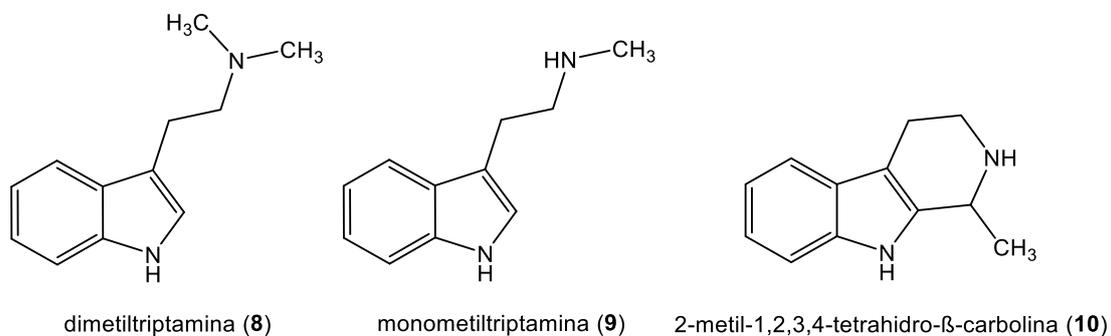


Fonte: GBIF (2022a).

Enquanto em 1995 foram descritos cerca de 10 artigos científicos, em 2014 foram publicados mais de 50 sobre o gênero *Psychotria*, este número continua a aumentar demonstrando a relevância científica de pesquisas sobre este gênero (CALIXTO et al., 2016).

O gênero *Psychotria* é conhecido por duas de suas espécies serem utilizadas em uma decocção alucinógena no Peru chamada “ayahuasca”, as espécies *P. viridis* e *P. carthagenensis*. Os alcaloides dimetiltriptamina (**8**), Monometiltriptamina (**9**) e 2-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina (**10**) foram caracterizados em *Psychotria viridis* por análises em CG-MS (Figura 5) (RIVIER e LINDGREN, 1972). Entretanto *P. carthagenensis* não possui alcaloides em sua biossíntese tornando-a diferente da *P. viridis*, a outra espécie utilizada na “ayahuasca” (ELISABETSKY e LEAL, 1990).

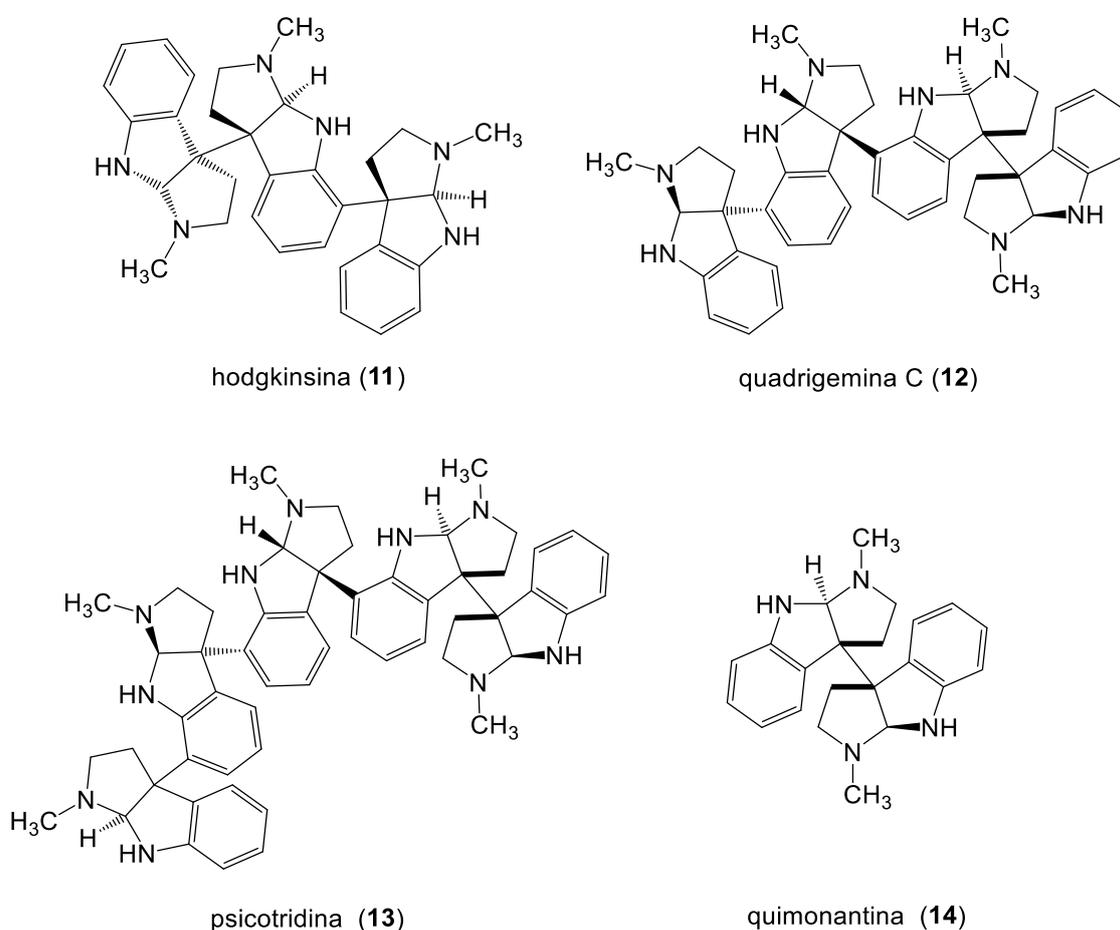
Figura 5 – Alcaloides presentes em *P. viridis*.



Fonte: O autor.

O interesse por plantas do gênero *Psychotria* aumentou consideravelmente, uma vez que é uma fonte abundante de vários produtos naturais interessantes como alcaloides, cumarinas, flavonoides, terpenoides, taninos e peptídeos cíclicos (CALIXTO et al., 2016). Os alcaloides polindólicos são considerados um dos principais grupos de metabólitos secundários encontrados em espécies do gênero *Psychotria*, as substâncias hodgkinsina (**11**), quadrigemina C (**12**), psicotridina (**13**) e quimonantina (**14**) foram alcaloides pirrolidinoindolínicos isolados do extrato das flores de *P. colorata* (Figura 6) (VEROTTA et al., 1998).

Figura 6 – Alcaloides pirrolidinoindolínicos presentes nas flores de *P. colorata*.

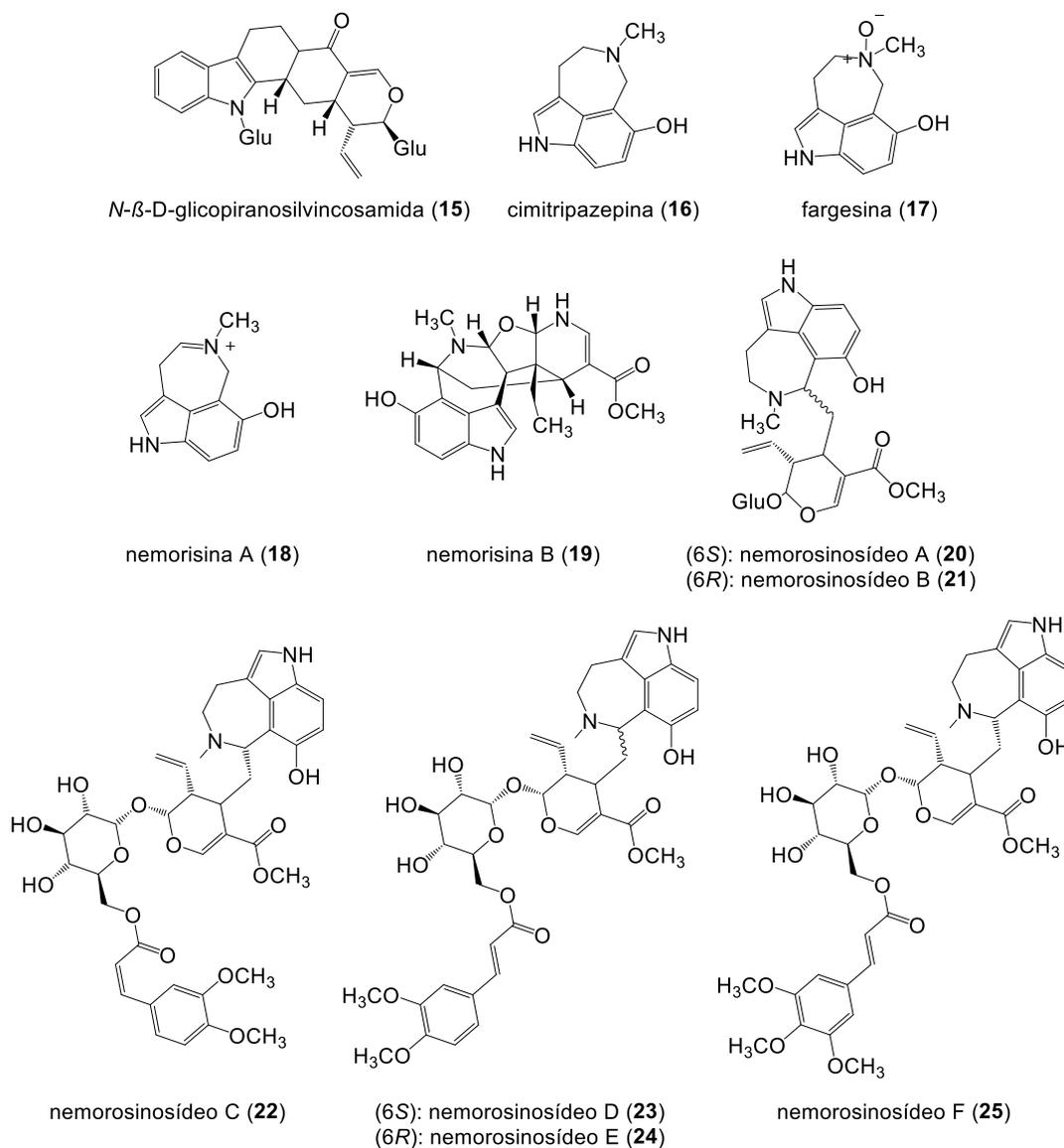


Fonte: O autor.

Do extrato etanólico das folhas de *P. leiocarpa* foi isolado o primeiro alcaloide indólico monoterpênico *N*-glicosilado o *N*- β -D-glicopiranosilvincosamida (**15**) (HENRIQUES et al., 2004). Recentemente foram isolados dez alcaloides azepina-indólicos do extrato alcaloídico das partes aéreas de *P. nemorosa*, a cimitripazepina (**16**),

a fargesina (17), as nemorosinas A (18) e B (19) e os nemorosinosídeos A–F (20–25) (Figura 7) (KLEIN-JÚNIOR et al., 2020).

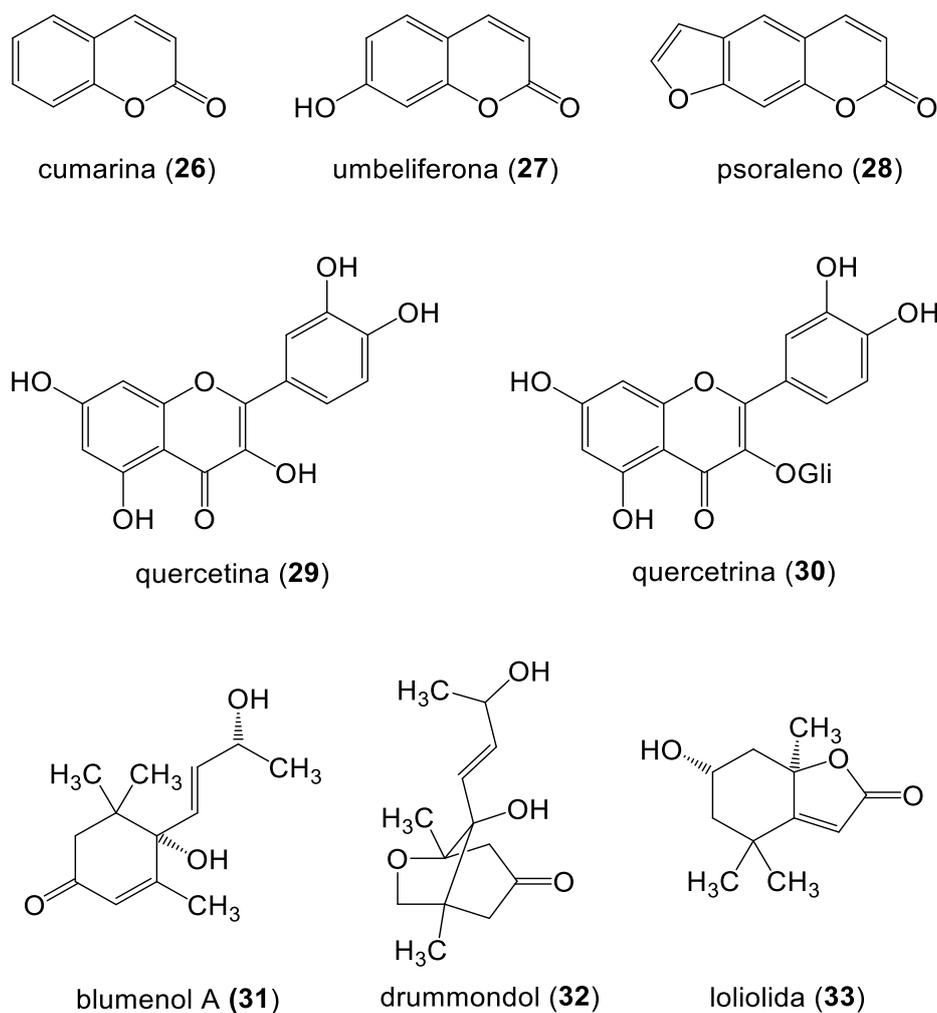
Figura 7 – Alcaloides presentes nas espécies de *P. leiocarpa* e *P. nemorosa*.



Fonte: O autor.

Outras classes de substâncias foram isoladas de espécies do gênero *Psychotria*, do extrato etanólico das folhas de *P. spectabilis* foram isolados compostos da classe das cumarinas como a cumarina (26), umbeliferona (27) e psoraleno (28), flavonoides como a quercetina (29) e a quercetrina (30) (BENEVIDES; YOUNG; BOLZANI, 2005). Terpenoides como os norisoprenóides: blumenol A (31), drummondol (32), e a loliolida (33) (Figura 8) um tipo de sesquiterpeno derivado do acorano isolado da espécie *P. yunnanensis* (LU; WANG; KONG, 2014).

Figura 8 – Cumarinas, flavonóis e terpenoides isolados de espécies do gênero *Psychotria*.



Fonte: O autor.

1.4. *Psychotria carthagenensis*

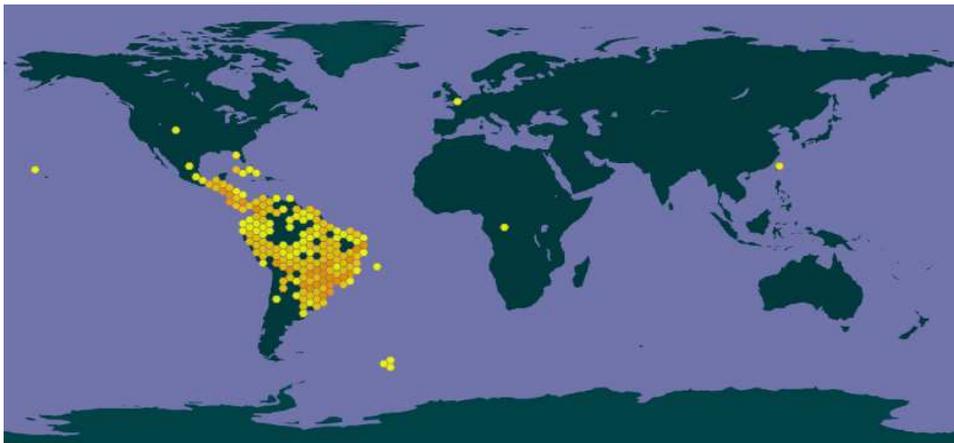
Psychotria carthagenensis (Figura 9) pertence à família Rubiaceae, popularmente conhecida como “carne-de-vaca”, “cafeeiro-do-mato”, “erva-de-rato-branca” ou “orelha-de-onça” é um arbusto de aproximadamente 2 a 3 m de altura, que possui ampla distribuição na América Central e do Sul, presente desde a Costa Rica até a Argentina (Figura 10) (VITARELLI e SANTOS, 2009).

Figura 9 – Flores e folhas de *P. carthagenensis*.



Fonte: Fotografia feita por João Paulo - Fazendeiro de Corumbaíba-GO.

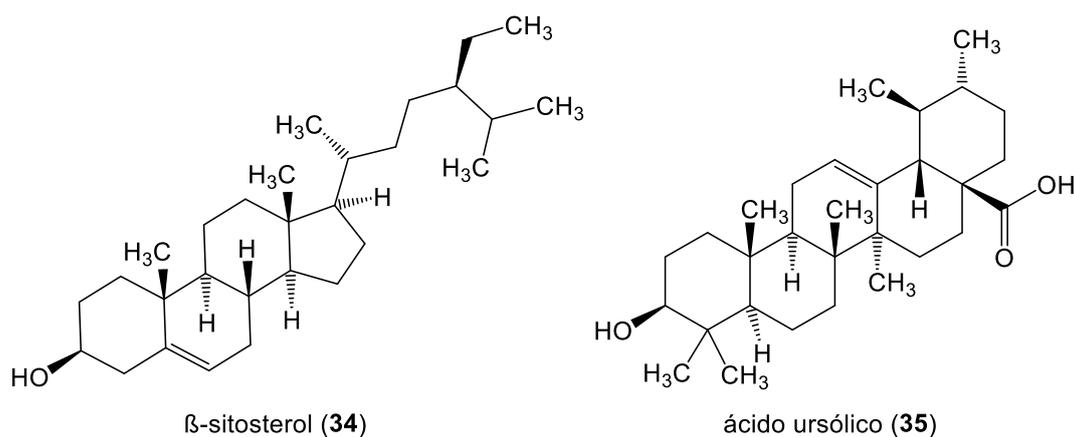
Figura 10 – Ocorrência de *P. carthagenensis* no mundo.



Fonte: GBIF (2022b).

Um estudo químico de *P. carthagenensis*, mostrou que as análises dos extratos das folhas e culturas de células suspensas apresentavam dois principais triterpenos: β -sitosterol (**34**) e ácido ursólico (**35**) (Figura 11) caracterizados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), outros triterpenos ou esteroides que não puderam ser totalmente caracterizados foram encontrados nestas amostras, a atividade da triptofano descarboxilase (TDC) não foi detectada nas células suspensas da espécie, esta enzima está presente na biossíntese de alcaloides, colaborando com o fato de não se ter alcaloides em seu metabolismo (LOPES; MORENO; HENIQUES, 2000).

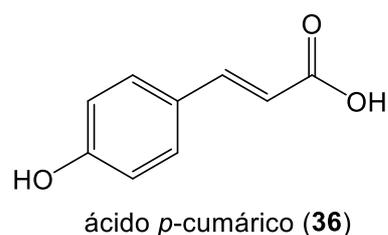
Figura 11 – Triterpenos identificados em *P. carthagenensis*.



Fonte: O autor.

Análises qualitativas utilizando reagentes específicos determinaram a presença de taninos e compostos fenólicos, no extrato metanólico de *P. carthagenensis*, demonstrando que esta espécie apresenta uma quantidade considerável de taninos, flavonols e flavonoides se comparado a outras espécies de *Psychotria* como *P. leiocarpa*, *P. capillacea* e *P. deflexa*, também foi encontrado por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) e comparado com amostra de padrão o ácido *p*-cumárico (36) (Figura 12) (FORMAGIO et al., 2014). Não se tem outros estudos químicos envolvendo a espécie *P. carthagenensis* disponíveis na literatura demonstrando a necessidade de pesquisas sobre este aspecto.

Figura 12 – Ácido *p*-cumárico em *P. carthagenensis*.



Fonte: O autor.

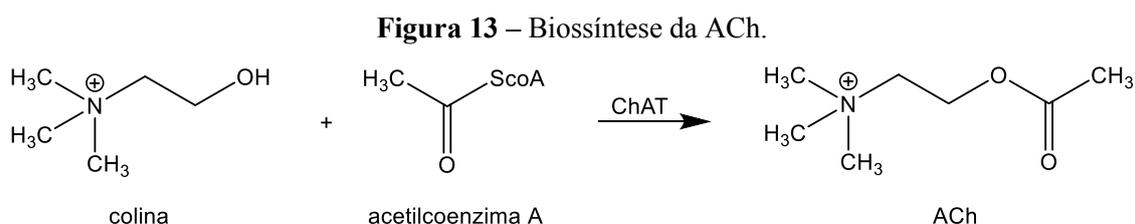
O extrato metanólico das folhas de *P. carthagenensis* foi avaliado no ensaio antimicrobiano contra diferentes tipos de *Staphylococcus aureus*, o que resultou em concentração inibitória mínima (CIM) superior a 500 $\mu\text{g/mL}$, indicando que o extrato etanólico não possui atividade antimicrobiana contra este microrganismo, neste mesmo estudo as espécies *Eugenia masoni*, *Eugenia uruguayensis*, *Myrcianthes cisplatensis* e

Myrrhinium atropurpureum, ambas pertencentes a família Myrtaceae, apresentaram um MIC menor que 7,8 µg/mL demonstrando apresentar esta atividade (BARNECHE et al., 2011).

No estudo visando avaliar a toxicidade e a atividade de inibição da acetilcolinesterase dos extratos etanólicos das folhas secas e frescas de *P. carthagenensis*, no ensaio utilizando ratos (*Rattus norvegicus*) a de 200 µg/Kg, não foi observada toxicidade nesta concentração, o extrato das folhas frescas apresentaram diminuição da colina no plasma sanguíneo, demonstrando uma atividade de inibição da acetilcolinesterase, que é uma enzima relacionada a doenças neurodegenerativas, demonstrando assim o possível potencial farmacológico sobre o sistema nervoso central (SNC) de compostos presentes nestas matrizes (NASCIMENTO et al., 2021). Desta forma é evidente a importância de se realizar estudos sobre a atividade biológica desta espécie, sabendo que a relatos sobre a sua atividade anticolinesterasica.

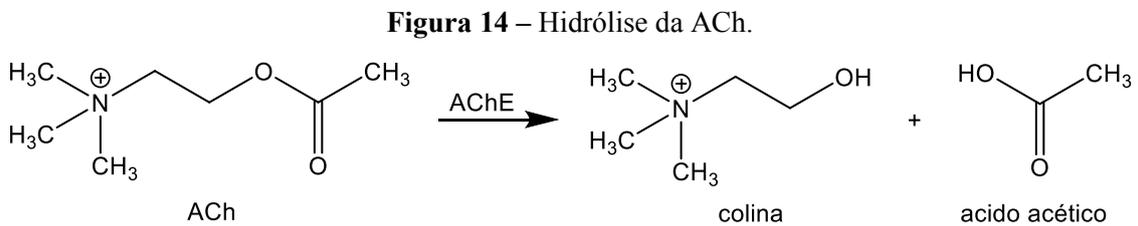
1.5. Hipótese colinérgica

A acetilcolina (ACh) é um importante neurotransmissor, encontrado em praticamente todos os mamíferos, sendo descoberto em 1920 tornando-o primeiro neurotransmissor descoberto na história da neurociência (AMENTA; TAYEBATI, 2008). Ela atua em todo o córtex, gânglios basais e no prosencéfalo basal (MESULAM, 2013). Sua biossíntese nas células neurais é catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT) a partir de colina (Ch) e acetilcoenzima A (Acetil-CoA), principal metabólito derivado da via glicolítica (Figura 13) (WILLIAMS; SORRIBAS; HOWES, 2011). Existe um consenso na literatura, no que diz respeito à influência direta da acetilcolina sobre os receptores colinérgicos, relacionados à aprendizagem e memorização (HASSELMO, 2006).



Fonte: O autor.

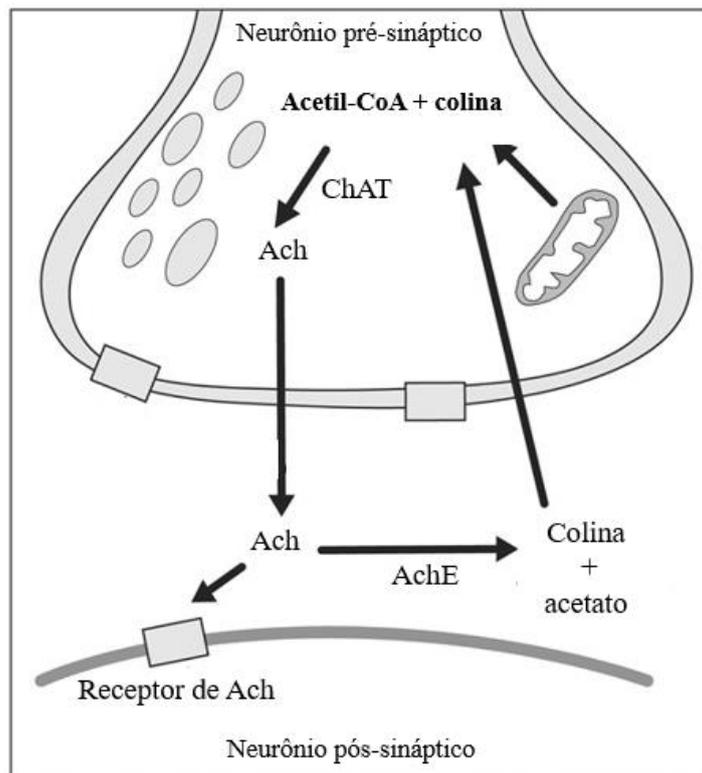
As colinesterases são enzimas presentes no sistema nervoso de todos os vertebrados e invertebrados, atuando na transmissão sináptica entre neurônios, que regulam a concentração de neurotransmissores específicos, sendo as principais a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) (ANAND e SINGH, 2013). A AChE presente no cérebro e a BChE com maior concentração no fígado são responsáveis pela reação de hidrólise da acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético (Figura 14) (STEPANKOVA e KOMERS, 2008). BChE apresenta um sítio ativo de volume maior, tornando-a pouco seletiva para acetilcolina, assim é responsável pela hidrólise de diversos outros ésteres, porém em situações atípicas de concentrações elevadas de acetilcolina, ela pode atuar como um auxiliar da AChE (GREIG et al., 2005).



Fonte: O autor.

Desta forma as principais etapas que ocorrem nos neurônios pré-sinápticos (síntese e liberação da acetilcolina) e pelos receptores colinérgicos pós-sinápticos (recaptação do neurotransmissor) fazem parte da sinapse colinérgica (Figura 15) (HAMPEL et al., 2018). No sistema nervoso central (SNC) a sinapse colinérgica está associada a funções cognitivas e respostas emocionais importantes do corpo humano (VENTURA et al., 2010).

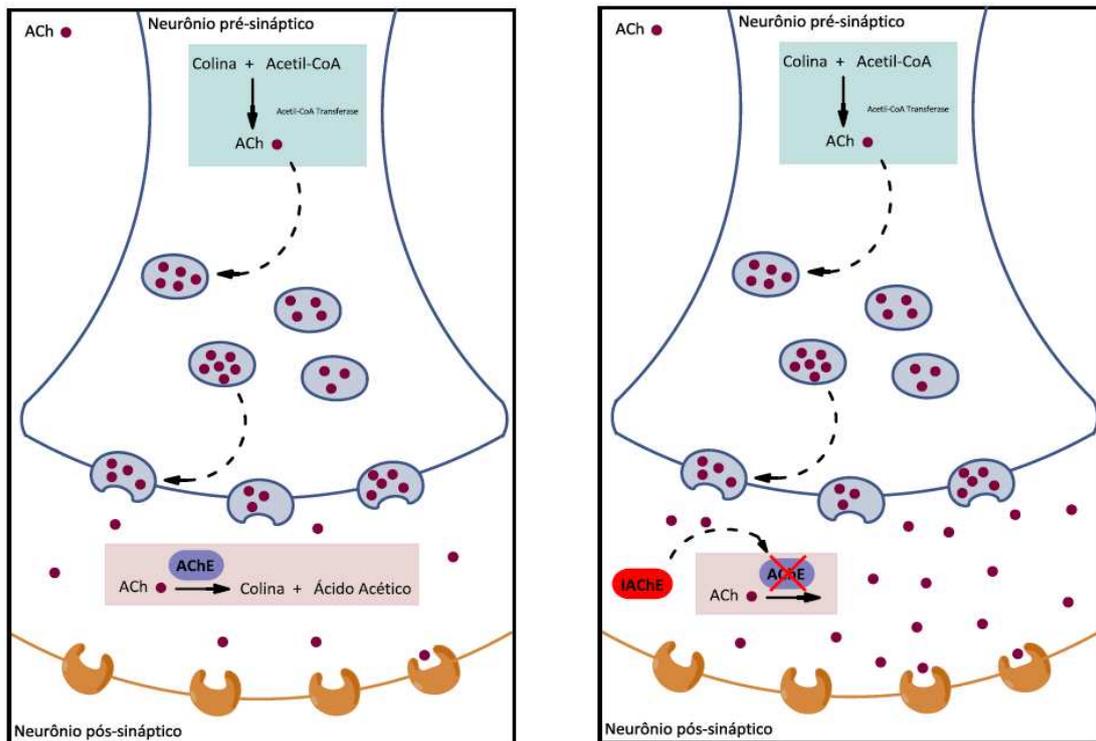
Figura 15 – Sinapse colinérgica.



Fonte: Adaptado de Hampel (2018).

O equilíbrio de diferentes sistemas de neurotransmissores como a ACh, noradrenalina, dopamina, ácido gama-aminobutírico, serotonina e glutamato são essenciais para o bom funcionamento cognitivo, na aprendizagem e na memória (WATKINS et al., 1994). As substâncias capazes de inibir a atividade da AChE são denominadas anticolinesterásicas, e elas apresentam atividades farmacológicas importantes, a principal sendo a capacidade de retardar a degradação cerebral pela doença de Alzheimer (DA) (HAMPEL et al., 2018). A substância anticolinesterásica inibe a atividade da AChE diminuindo a degradação da ACh, possibilitando que o neurotransmissor passe mais tempo na fenda sináptica e assim intensificando a sinapse colinérgica (Figura 16) (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

Figura 16 – Sinapse colinérgica na ausência e na presença de inibidores de AChE.



Nota: IAChE: Inibidores de acetilcolinesterase.

Fonte: Araujo (2016).

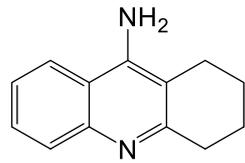
A demência é uma ampla categoria de patologias neurodegenerativas que geram diversos sintomas, cujo principal é a interferência na capacidade cognitiva capaz de interferir nas atividades da vida diária do portador (CALABRÒ et al., 2021). A DA é a causa mais comum de demência em idosos no mundo (FRISONI et al., 2022). Obteve-se uma estimativa de que em 2010 cerca de 35,6 milhões de pessoas viviam com demência em todo o mundo, com uma previsão de aumento para 65,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050, esta previsão leva em consideração o envelhecimento da população nestas décadas (PRINCE et al., 2013).

A hipótese colinérgica revolucionou o campo de pesquisa sobre a doença de Alzheimer, incentivando estudos na área de neurotransmissão sináptica (HAMPEL et al., 2018). E sua correlação com a DA se inicia na década de 70 com a demonstração de que os antagonistas colinérgicos prejudicam a memória enquanto os agonistas têm o efeito oposto (DRACHMAN e LEAVITT, 1974). E nos anos 80 quando terapias com inibidores da colinesterase mostraram induzir melhora sintomática significativa em pacientes com doença de Alzheimer, esta teoria ganhou validação

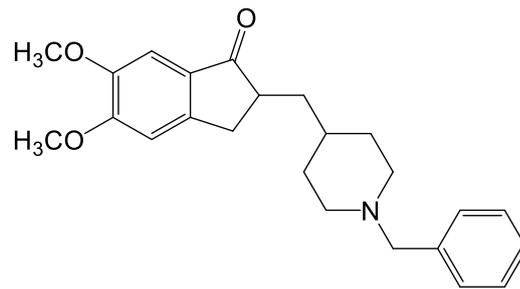
demonstrando que medicamentos com atividade anticolinesterásicas deviam ser estudadas para combate a DA (SUMMERS et al 1986).

O primeiro medicamento aprovado pela FDA em 1993 para o tratamento de DA é a tacrina (**37**) de nome comercial Cognex[®] inibidora de AChE e BChE (PARK, 2010). Devido a presença de vários efeitos colaterais como prisão de ventre, diarreia, gases, perda de apetite, dores musculares, náuseas, dor de estômago, vômitos, perda de peso, e possível hepatotoxicidade este medicamento não seguiu muito tempo no mercado (FALCO et al., 2016). Atualmente três medicamentos inibidores de colinesterases são comercializados como tratamento para DA a donepezila (**38**) de nome comercial Eranz[®] aprovado em 1997 inibidor específico de AChE, rivastigmina (**39**) de nome comercial Exelon[®] aprovada em 1998 inibidora de AChE e BChE e galantamina (**40**) de nome comercial Coglive[®] aprovado em 2000 inibidora específica de AChE (FINK et al., 2018). Tacrina, galantamina e donepezila são inibidores reversíveis da acetilcolinesterase de duração curta, intermediária e longa respectivamente, já a rivastigmina é inibidora pseudo-irreversível ou lentamente reversível, (FORTALEZA, 2005). O metrifonato (**41**) é um inibidor irreversível de acetilcolinesterase que em 1998 foi administrada em portadores de DA sendo informados efeitos adversos entre os pacientes testados (BECKER et al., 1998). O metrifonato tem como princípio ativo o 2,2,2-tricloro-1-hidroxietildimetilfosfonato, é utilizado como inseticida, causador de neuropatia retardada caso ocorra intoxicação aguda pelo mesmo (INOUE e OLIVEIRA, 2004). Os estudos sobre metrifonato relacionados a DA foram descontinuados pela FDA na fase III devido sua toxicidade (FORTALEZA, 2005). O metrifonato anteriormente utilizado como agrotóxico e vermífugo veterinário de nome Trichlorfon foi proibido no país em 2010 (CANAL RURAL, 2010).

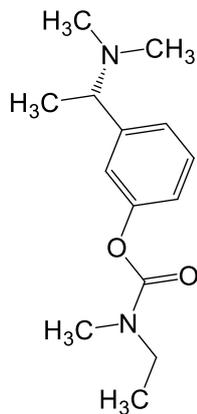
Figura 17 – Medicamentos inibidores de acetilcolinesterase.



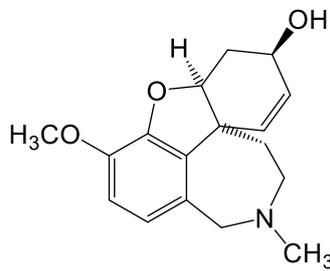
tacrina (**37**)



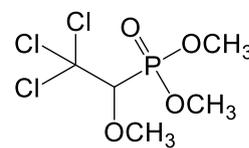
donepezila (**38**)



rivastigmina (**39**)



galantamina (**40**)



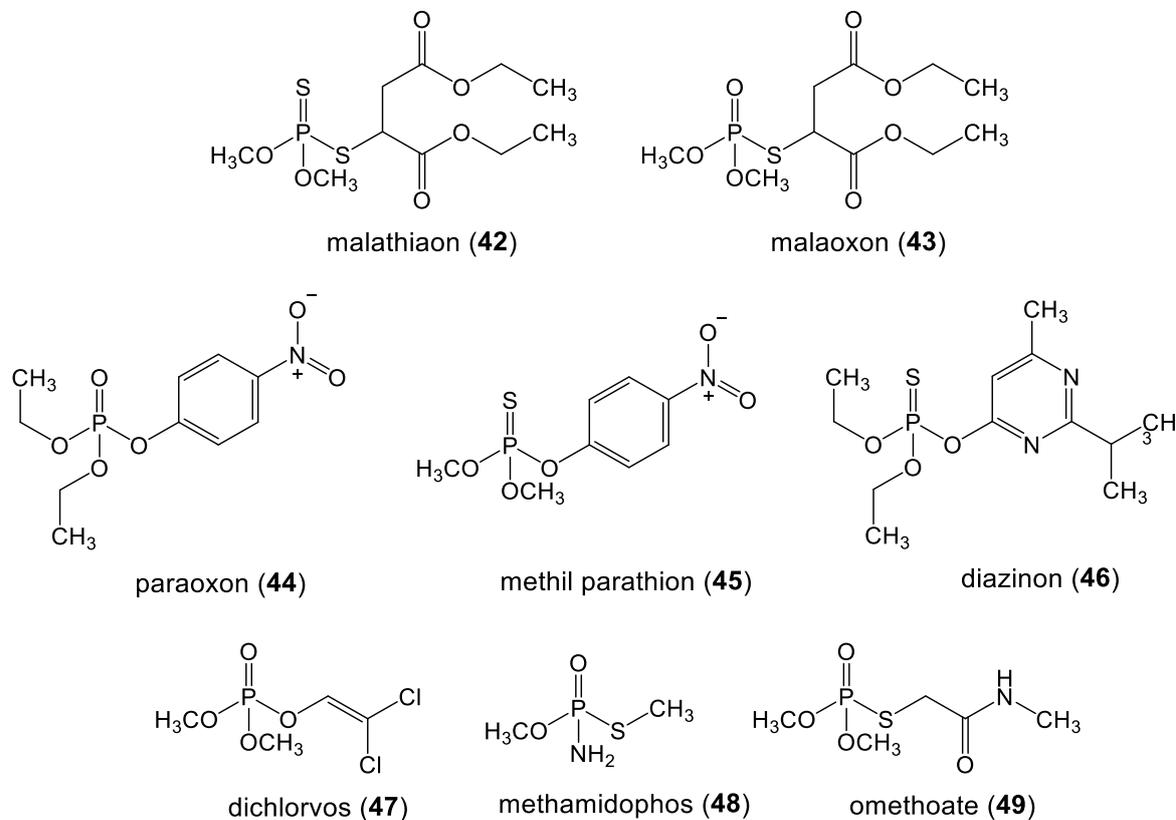
metrifonato (**41**)

Fonte: O autor.

Inibidores irreversíveis de AChE geralmente compartilham como característica a neurotoxicidade, sendo que a acetilcolina quando acumulada em terminações nervosas causa estimulações elétricas desreguladas e elevadas, provocando danos no sistema nervoso periférico e sistema nervoso central (JOKANOVIĆ, 2009). Duas classes de agrotóxicos são conhecidas por apresentarem atividade inibidora de acetilcolinesterase de forma irreversível, os organofosforados (OPs) e os carbamatos (ARDUINI et al.; 2006). Os pesticidas têm sua toxicidade dependente da sua estrutura química, os OPs mais conhecidos são o malathion (**42**), malaoxon (**43**), paraoxon (**44**), methyl parathion (**45**), diazinon (**46**), dichlorvos (**47**), methamidophos (**48**) e o omethoate (**49**) (Figura 18); Já os agrotóxicos carbamatos mais conhecidos são o carbaryl (**50**), carbofuran (**51**) e o pirimicarp (**52**) (Figura 19) (PUNDIR e CHAUHAN, 2012). A intoxicação por estes agrotóxicos causa disfunções respiratórias e miocárdicas podendo levar até mesmo a morte (CHAPALAMADUGU e CHAUDHRY, 1992). Estes sintomas se assemelham aos sintomas encontrados nos ruminantes intoxicados, desta forma é possível associar a

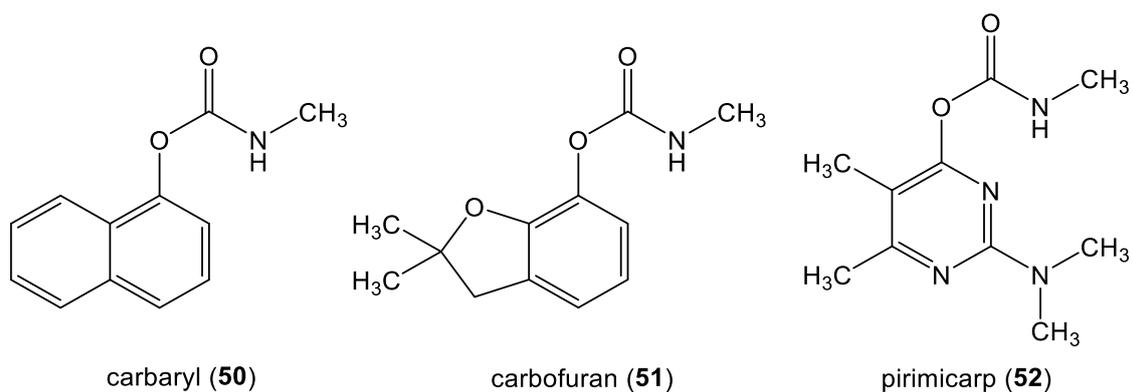
inibição irreversível da AChE e da BChE a possível intoxicação de animais, podendo ser a causa da morte de ruminantes.

Figura 18 – Agrotóxicos organofosforados inibidores irreversíveis de AChE.



Fonte: O autor.

Figura 19 – Agrotóxicos carbamatos inibidores irreversíveis de AChE.



Fonte: O autor.

Dentro deste contexto, esse trabalho propõe o estudo químico do extrato etanoico das flores e folhas de *P. carthagenensis* e posterior avaliação quanto ao potencial de inibição das enzimas AChE e BChE, e sua atividade citotóxica.

2. OBJETIVOS

Estudo do perfil químico e biológico (avaliação da atividade citotóxica, anticolinesterásica e antioxidante) dos extratos etanólicos (folhas e flores) e das respectivas frações obtidas da extração líquido-líquido de *Psychotria carthagenensis* (Rubiaceae).

2.1. Objetivos específicos

- Extração líquido-líquido dos extratos etanólicos das flores e folhas de *Psychotria carthagenensis* (Rubiaceae);
- Estudo químico e prospecção química (por CCD) das frações obtidas da extração líquido-líquido;
- Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos e frações;
- Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e frações;
- Avaliação da atividade citotóxica dos extratos e frações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Solventes

- Metanol (MeOH): Synth P.A. ACS
- Hexano (C₆H₁₄): Vetec P.A.
- Acetato de etila (AcOEt): Vetec P.A.
- Diclorometano (CH₂Cl₂): Vetec P.A.ACS
- Hidróxido de amônio (NH₄OH): Synth P.A. ACS
- Solventes de grau analítico (P.A.), purificados por destilação fracionada: etanol, hexano, acetato de etila.
- Ácido acético glacial (CH₃COOH): Synth P.A. ACS

- Solução aquosa de hidróxido de amônio (NH₄OH) 28%: Alphatec P.A. e Neon P.A.
- Dimetilsulfóxido (DMSO): Synth P.A. ACS

3.2. Soluções utilizadas como reveladores

3.2.1. Solução de vanilina sulfúrica

Preparada a partir de 3,0 g de vanilina dissolvida em solução contendo 135 mL de água destilada, 135 mL de metanol e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado.

3.2.2. NP/PEG

Preparado a partir da mistura de 20 mL de uma solução do ácido β -etilaminodifenilbórico 1% em metanol, com 16 mL da uma solução de polietilenoglicol-4000 (PEG) 5% em etanol.

3.2.3. Dragendorff

Preparado a partir da dissolução de 0,85 g de nitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e adição de 40,0 mL de água destilada sob aquecimento (Solução A). Esta solução foi misturada com a solução B contendo 8,00 g de iodeto de potássio em 30,0 mL de água, na mesma proporção para gerar uma solução estoque. A solução reveladora foi preparada a partir de 1,0 mL da solução estoque, 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água destilada.

3.2.4. Solução de anisaldeído

Preparado a partir da dissolução de 0,5 mL de anisaldeído em 10,0 mL de ácido acético glacial em banho de gelo, seguido da adição de 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

3.2.5. Solução de KOH (5%)

Preparado a partir da dissolução de 2,5 g de KOH em 47,5 mL de metanol em banho de gelo.

3.2.6. Liebermann-Buchard

Preparado a partir da dissolução de 49,0 mL de anidrido acético em 1,0 mL de ácido sulfúrico em banho de gelo, seguido da adição de 1 mL de ácido acético glacial.

3.3 Técnicas cromatográficas

3.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 (Macherey-Nagel), com 0,20 mm de espessura e indicador de fluorescência (UV 254 nm). As revelações foram feitas por irradiação ultravioleta (254 ou 365 nm) ou por nebulização de revelador específico.

3.3.2. Cromatografia em coluna (CC)

Foi utilizado com fase estacionária Sílica gel (SiO_2) para cromatografia flash (40-63 μm), diâmetro de poro 60 Å, Merck.

3.4. Técnicas espectroscópicas

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas no equipamento da marca Bruker Ascend™ 400 Avance III HD (9,2 Tesla) do laboratório multiusuário do Instituto de Química da UFU, operando em frequências de 400 MHz para os núcleos de hidrogênio e 100 MHz para o carbono. Os experimentos foram realizados a 25 °C, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno (δ_{TMS} 0,00).

3.5. Equipamentos utilizados

O Núcleo de Pesquisa em compostos bioativos (NPCBio) – IQ/UFU, também conta com alguns equipamentos básicos mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Equipamentos disponíveis para realização do projeto de pesquisa.

Equipamento	Marca	Modelo
Banho de aquecimento	Fisatom	550
Balança analítica	Shimadzu	AX 200
Balança analítica	Gehaka	BG 200
Bomba de vácuo	Prismatec	131B
Câmara escura para luz ultravioleta (UV 254 e 365 nm)	Solab	SL-204
Centrifugador	Eppendorf	5415C
Centrifugador Excelsa Baby	Fanem	Mod. 206
Banho ultratermostático	Quimis	Q214M2
Linha de secagem de amostra a pressão reduzida (bomba)	Edwards	RV5
Liofilizador	Terroni	LS3000
Rotaevaporador (componentes: rotavapor R-100, banho de aquecimento B-100, bomba de vácuo V-100 e controlador I-100)	Buchi	R-100
Sistema de exaustão (capelas) (2 unidades)		

Fonte: autor.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1. Coleta do material vegetal e preparo do extrato etanólico

Os extratos etanólicos das folhas e flores de *P. carthagenensis* (EEFo-*Pc* e EEFl-*Pc*) foram obtidos a partir dos materiais vegetais coletados, em novembro de 2019, na Fazenda da Barra, zona rural do município de Corumbaíba-GO nas coordenadas 18°21'48"S e 48°21'08"W, sendo que uma exsicata (HUFU 80589) foi depositada no Herbário Uberlandense (HUFU). As folhas (648,7 g) e flores (200,0 g), foram secas em estufa com circulação de ar (35 °C) por 3 dias, trituradas em liquidificador e submetidas

à extração com etanol ($6 \times 5,0$ L). Os extratos etanólicos foram monitorados por CCD para verificar a eficiência e se os mesmos compostos estavam presentes em cada uma das extrações.

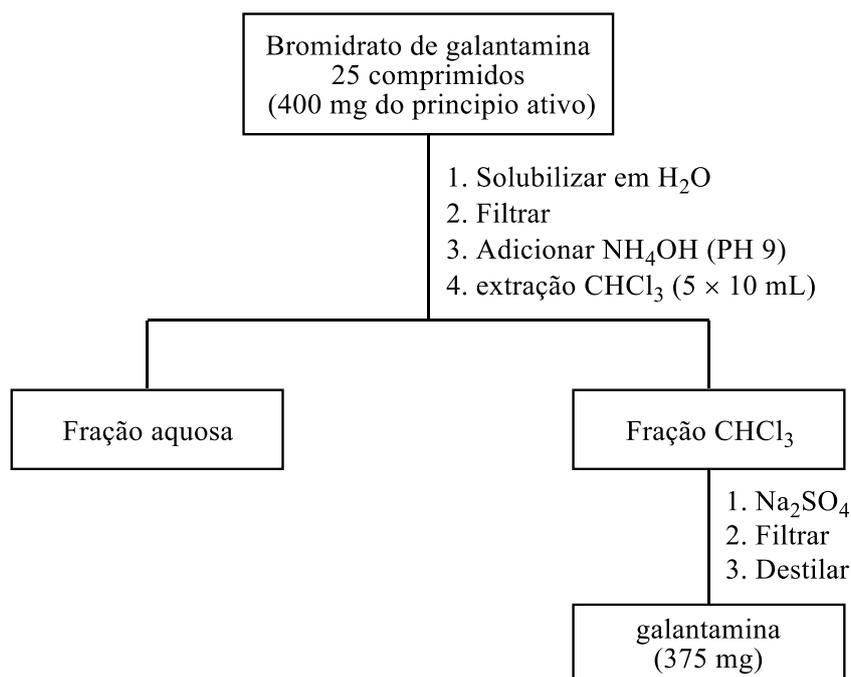
4.2. Extração líquido-líquido

Parte do extrato etanólico (100,0 g) das folhas de *P. carthagenensis* (EEFo-Pc) foi solubilizado em 500 mL de solução metanol/água (9:1) e em seguida submetido à extração líquido-líquido com hexano (5×300 mL), diclorometano (5×300 mL) e acetato de etila (5×300 mL) respectivamente. A mesma metodologia foi utilizada para a extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores, porém a massa utilizada deste extrato foi 7,0 g e os volumes dos solventes utilizados foram 40 mL para cada extração. Os solventes foram removidos por destilação em evaporador rotativo sob pressão reduzida, utilizando banho de aquecimento a 40 °C. As frações obtidas foram pesadas e analisadas por CCD para verificar o perfil químico e avaliar a eficiência do procedimento. As cromatoplasmas foram reveladas com vanilina sulfúrica, KOH (5%), NP/PEG, Liebermann-Burchard, anisaldeído e Dragendorff.

4.3. Extração da galantamina a partir do bromidrato de galantamina[®] comercial

Os comprimidos (25 unidades), oriundos do medicamento Coglive[®] (bromidrato de galantamina, 400 mg do princípio ativo, 1,4 mmol), foram triturados com auxílio de um graal e pistilo (Figura 20). O material pulverizado foi transferido para um béquer, solubilizado em 20 mL de água, com o auxílio do banho ultrassônico, filtrado e adicionado NH₄OH (pH 9). Em seguida a solução foi submetida a extração líquido-líquido com CHCl₃ (5×10 mL). Os resquícios de água foram retirados utilizando sulfato de sódio anidro e o CHCl₃ foi removido em evaporador rotativo, sob pressão reduzida (temperatura do banho a 40 °C). O produto foi analisado por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas em alta resolução (CLAE/EM), para confirmação da estrutura.

Figura 20 – Fluxograma de extração da galantamina.



Fonte: O autor.

4.4. Atividades biológicas

Os ensaios para determinar a atividade anticolinesterásica e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU (LABIBI) em Uberlândia aos cuidados do Prof. Dr. Foued Salmen Espindola. A metodologia utilizada foi adaptada a partir dos ensaios realizados por Marston et al. (2002), Ellman et al. (1961) e Rhee et al. (2001).

O ensaio de citotoxicidade em células NIH/3T3 foram realizados no laboratório de Imunologia e Parasitologia Aplicadas aos cuidados da prof. Dr^a. Fernanda Maria Santiago.

4.4.1. Atividade anticolinesterásica

As atividades inibitórias da AChE e BChE dos extratos etanólicos das folhas e flores e das frações obtidas da extração líquido-líquido, foram avaliadas usando o método de microplaca de 96 poços (MARSTON et al., 2002; ELLMAN et al., 1961; RHEE et al., 2001).

Para os experimentos, 25 μL de solução aquosa de iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina (3 mM), 125 μL de DTNB (3 mM) em tampão C, 50 μL de tampão B e 25 μL da amostra diluída em tampão A foram adicionados a microplaca de 96 poços, para dar concentrações de iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o teste de inibição e 30 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o teste de IC_{50} , fração CH_2Cl_2 e fração AcOEt . A seguir, foram adicionados 25 μL de solução de enzima (AChE ou BChE) de 0,2 U/mL e a absorbância foi imediatamente medida a 405 nm a cada 30 s, por 20 min (a temperatura foi mantida a 30 °C). Qualquer aumento na absorbância devido à hidrólise espontânea do substrato (ou aos cromóforos presentes nas amostras) que pode ter ocorrido antes da leitura das absorbâncias, foi corrigido subtraindo-se a taxa de reação medida antes do início do experimento (isto é, antes da leitura a cada 30 s por 20 min) a partir dos valores obtidos após o início do experimento. A percentagem de inibição foi calculada em comparação com um branco (MeOH a 10% em tampão A) e o controle positivo utilizado foi a galantamina e a rivastigmina.

Foram utilizados os seguintes tampões: tampão A: Tris-HCl 50 mM (pH 8); tampão B: Tris-HCl 50 mM (pH 8) contendo fração de albumina de soro bovino a 0,1%; tampão C: Tris-HCl 50 mM (pH 8) contendo NaCl 0,10 M e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

4.4.2 Atividade antioxidante pelo método de DPPH

O DPPH é diluído em metanol em uma concentração de 0,06 mg/mL. O controle positivo utilizado é ácido ascórbico em 30 μM e o controle negativo foi o veículo (DPPH e metanol).

Os extratos etanólicos e as frações obtidas por extração líquido-líquido das flores e folhas foram analisadas neste experimento. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 75 μL de amostra a 1 mg/mL e 225 μL de solução de DPPH e incubado por 30 minutos à 30 °C no escuro. Após esse tempo, foi medida a absorção das amostras em 517 nm no espectrofotômetro. Esta metodologia é realizada em duplicata.

4.4.3 Atividade antioxidante pelo método de FRAP

A redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} é detectada através da adição de 250 μL do reagente FRAP (10 vol. Tampão acetato + 1 vol. TPTZ + 1 vol. de Fe^{3+}) em 10 μL de cada amostra a 1 mg/mL e 25 μL de água, onde o Fe^{2+} é quelado pela 2,4,6-tri-(2 piridil)-s-triazida (TPTZ) resultando em um complexo Fe^{2+} -TPTZ de coloração azul intensa.

As amostras utilizadas foram os extratos etanólicos das flores e folhas, frações obtidas por extração líquido-líquido e ácido ascórbico como controle positivo. Foi utilizado o reagente trolox, um análogo solúvel em água de vitamina E, para a realização da curva padrão nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 400, 800 e 1000 μM . A reação foi realizada em microplaca, incubada por 6 minutos à 37 °C e posteriormente feita a leitura à 593 nm no espectrofotômetro. Este experimento é realizado em duplicata e os resultados são obtidos em μmol de trolox eq/L.

4.4.4. Atividade citotóxica utilizando a linhagem celular NIH/3T3

As células de fibroblastos embrionários de camundongos NIH/3T3, foram cultivadas em garrafas plásticas de cultura celular de 75 cm^2 em meio RPMI completo (10% de Soro Fetal Bovino, 20 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina). As células foram mantidas a 37 °C, 5% de CO_2 e 95% de umidade. Subculturas (repiques) foram realizadas de três a cinco dias, quando foi realizada a contagem das células viáveis pela metodologia de exclusão por corante vital azul de tripan (0,4% p/v).

As células foram então incubadas (37 °C, 5% de CO_2 , 24 horas) em placa de 96 poços, em concentração ajustada para 1×10^5 células/poço em meio RPMI completo, para aderência aos poços. Após o período de incubação, o meio dos poços foi esgotado e adicionado as amostras diluídas em RPMI completo nas concentrações de 600, 300 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As culturas de células permaneceram expostas durante 24 horas (37 °C, 5% de CO_2). Após o período de incubação, os poços foram esgotados, e foi adicionada solução MTT (Sigma Aldrich Co, EUA) 50 $\mu\text{g}/\text{poço}$. As placas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos (37 °C, 5% de CO_2). Passado esse período foi adicionado DMSO para solubilizar os cristais de formazana gerados, e as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (570 nm) (MOSMANN, 1983; DUTTA et al., 2005).

5. Resultados e discussão

5.1. Preparação dos extratos etanólicos e fracionamento

A partir do material vegetal seco (folhas 648,7 g e flores 200,0 g) de *P. carthagenensis*, foram preparados os extratos etanólicos das folhas (EEFo, 128,0 g) e flores (EEFl, 12,0 g). Uma parte do EEFo-*Pc* (99,0 g) foi submetido a extração líquido-líquido com *n*-hexano, CH₂Cl₂ e AcOEt. O EEFl-*Pc* (7,0 g) também foi submetido ao mesmo procedimento de onde foram obtidas as frações respectivas (Tabela 2).

Tabela 2. Massas obtidas das extrações líquido-líquido dos EEFo-*Pc* e EEFl-*Pc*.

Fração	Massa (g)
Hexano (folhas) - FHFo	5,2
Diclorometano (folhas) - FDFo	4,3
Acetato de etila (folhas) - FAFo	47,0
Hidroalcóolica (folhas) - FHAFo	35,0
Hexano (flores) - FHFl	0,8
Diclorometano (flores) - FDFl	1,1
Acetato de etila (flores) - FAFI	2,5
Hidroalcóolica (flores) - FHAFI	2,3

Fonte: O autor.

5.2. Prospecção química dos extratos e frações

Uma alíquota de cada extrato e fração foi submetida a análise por CCD, que foi inspecionada em câmara de luz UV-Vis (254 e 365 nm) e revelada utilizando reagentes químicos específicos (vanilina sulfúrica, Dragendorff, Liebermann-Burchard, anisaldeído, KOH (5%) e NP/PEG), para identificação das classes de metabólitos. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos por Wagner (2009) (Tabela 3).

Manchas vermelhas após aspersão com solução alcóolica de KOH 5%, que indica a presença da classe das antraquinonas, foram observados em algumas amostras, sendo encontrados em maior concentração nas frações AcOEt. Já os alcaloides não foram observados nos extratos utilizando Dragendorff o que corrobora com os dados descritos

na literatura para esta espécie, que é conhecida por não apresentar alcaloides em sua biossíntese, (LEAL, ELISABETSKY, 1996). Outros reveladores podem ser utilizados para averiguar a presença de alcaloides.

Tabela 3. Prospecção química das frações obtidas da extração líquido-líquido das folhas e flores de *P. carthagenensis*.

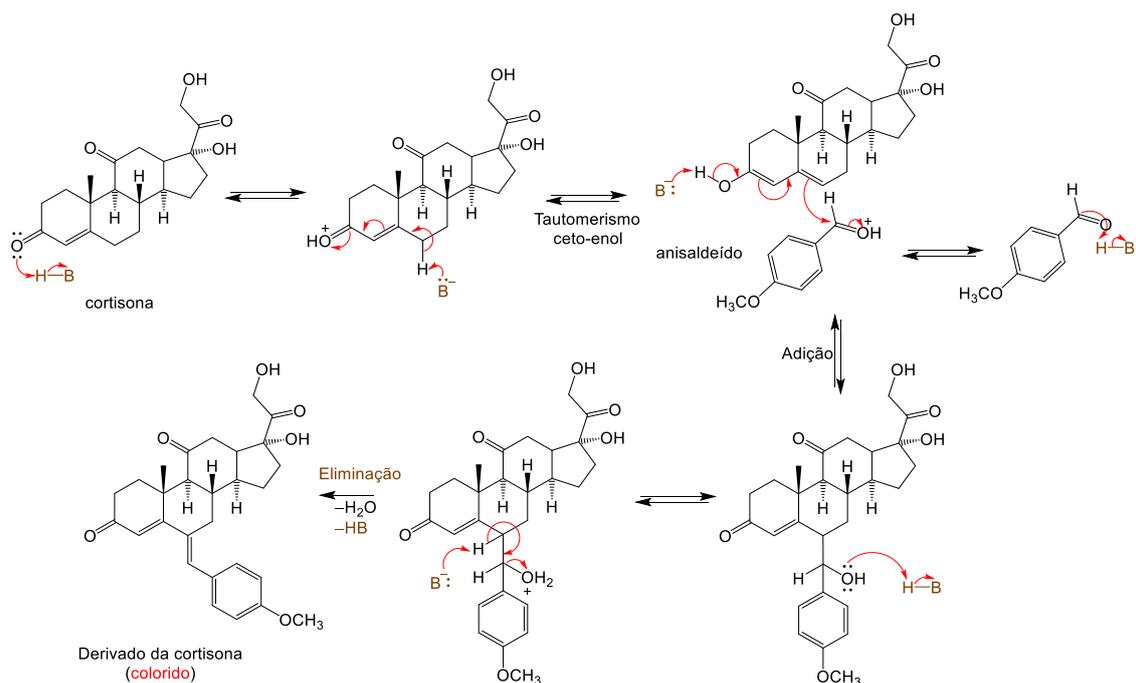
	NP/PEG	Dragendorff	KOH	Liebermann- Buchard	Vanilina sulfúrica	Anisaldeído
EEFo	n.a.	n.a.	+	+	++	++
FHFo	+	–	+	+	++	++
FDFo	+	–	+	+	+	+
FAFo	+	–	++	+	++	++
FHAFo	+	–	+	–	++	++
EEFl	n.a.	n.a.	+	+	++	++
FHF1	n.a.	–	+	+	++	++
FDF1	n.a.	–	+	–	–	+
FAFl	n.a.	–	++	+	++	++
FHAF1	n.a.	–	–	–	++	++

Nota: (n.a.) Não analisado, (–) não identificado, (+) identificado, (++) intenso. EEFo: Estrato etanólico das folhas, FHFo: Fração hexano das folhas, FDFo: Fração CH₂Cl₂ das folhas, FAFo: Fração AcOEt das folhas, FHAFo: Fração hidroalcolica das folhas, EEFl: Estrato etanólico das flores, FHF1: Fração hexano das flores, FDF1: Fração CH₂Cl₂ das flores, FAFl: Fração AcOEt das flores, FHAF1: Fração hidroalcolica das flores.

Fonte: O autor.

Os reveladores químicos de uma forma geral reagem com os componentes específicos para tornar moléculas incolores visíveis para serem então detectadas ao olho humano. O revelador de anisaldeído (anisaldeído, ácido acético e ácido sulfúrico em metanol) é um revelador para CCD que indica a presença de esteroides, saponinas e propilpropanoides através de uma reação de condensação aldólica, que pode ser melhor visualizado através do mecanismo (Figura 21), a vanilina sulfúrica segue o mesmo princípio, após a reação o grupo cromofórico do *p*-anisaldeído estabelece uma maior conjugação, promovendo a absorção no espectro do visível e facilitando a visualização (KATO, 1964).

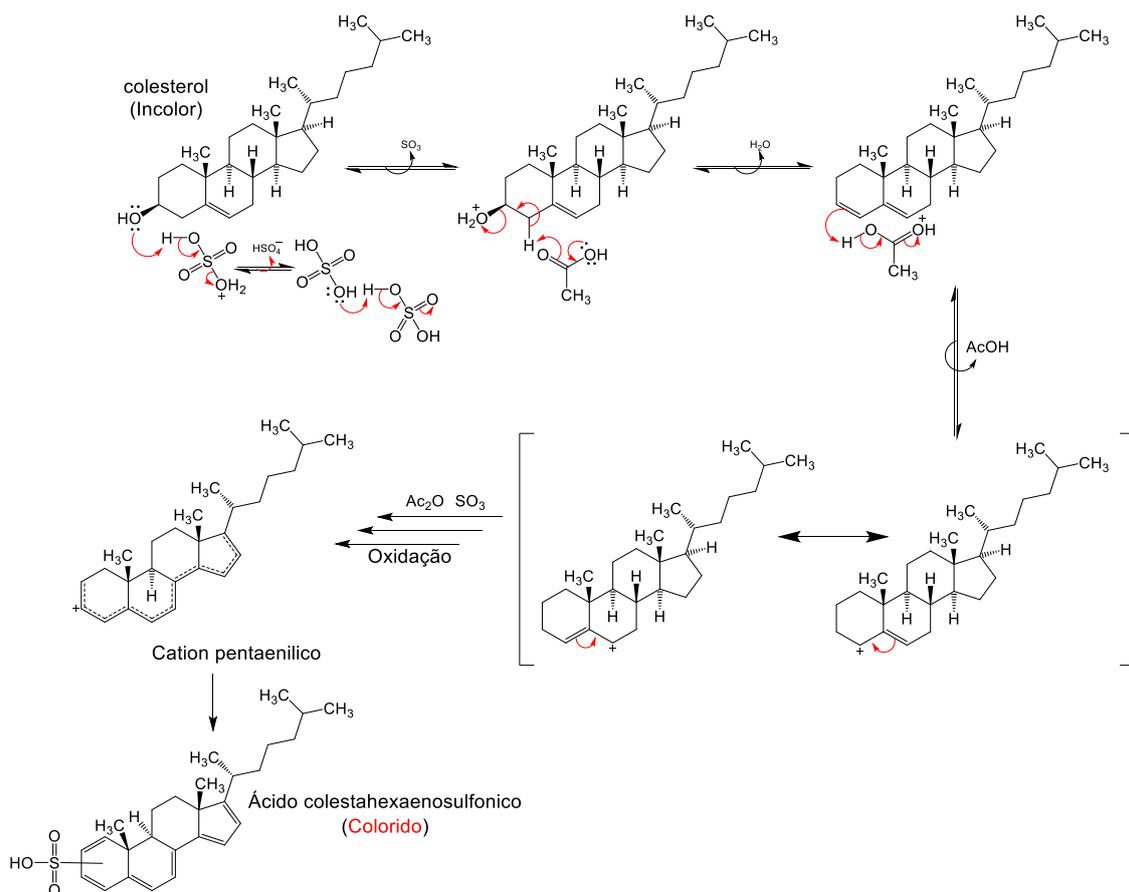
Figura 21 – Mecanismo da reação aldólica entre a cortisona e o anisaldeído.



Fonte: O autor.

O revelador Liebermann-Buchard é um revelador para CCD que indica a presença de esteroides como o colesterol, o mecanismo contém uma etapa de iniciação com a protonação do grupo hidroxila no esteroide e subsequente eliminação de uma molécula de água para formar o íon carbônio-3,5-colestadieno, em seguida na presença de anidrido acético e trióxido de enxofre ocorre oxidações em serie formando dienens alternados finalizando com uma sulfonação (Figura 22) (MESGARZADEH; AKBARZADEH; RAHIMI, 2017).

Figura 22 – Reação de Liebermann-Buchard.

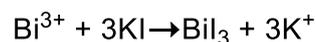


Fonte: O autor.

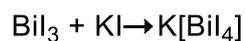
O reagente de Dragendorff é utilizado para detecção de alcaloides, o reagente é uma solução de iodeto de bismuto potássico preparada a partir de nitrato de bismuto [Bi(NO₃)₃], ácido tartárico e iodeto de potássio (KI); Os alcaloides presentes na solução da amostra na presença do reagente de Dragendorff produzem um precipitado laranja ou vermelho alaranjado (Figura 23) (RAAL et al., 2020).

Figura 23 – Reação de Dragendorff.

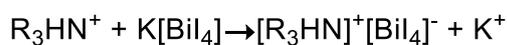
Formação do iodeto de bismuto:



Formação do tetraiodobismuto potássico:



Formação do complexo
alcaloide-tetraiodobismuto:

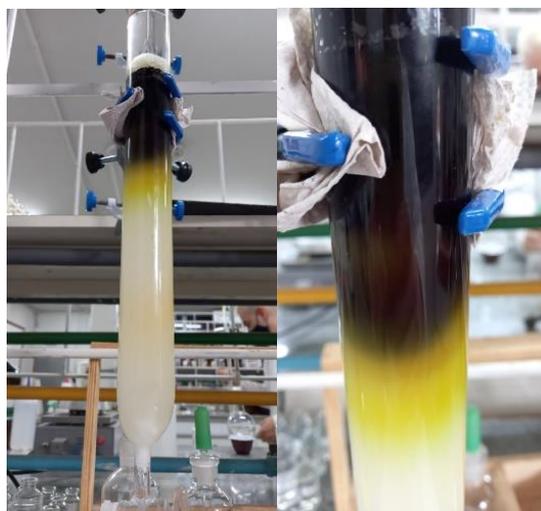


Fonte: O autor.

5.2.1 Análise por cromatografia em coluna da fração diclorometano das folhas (FDFo)

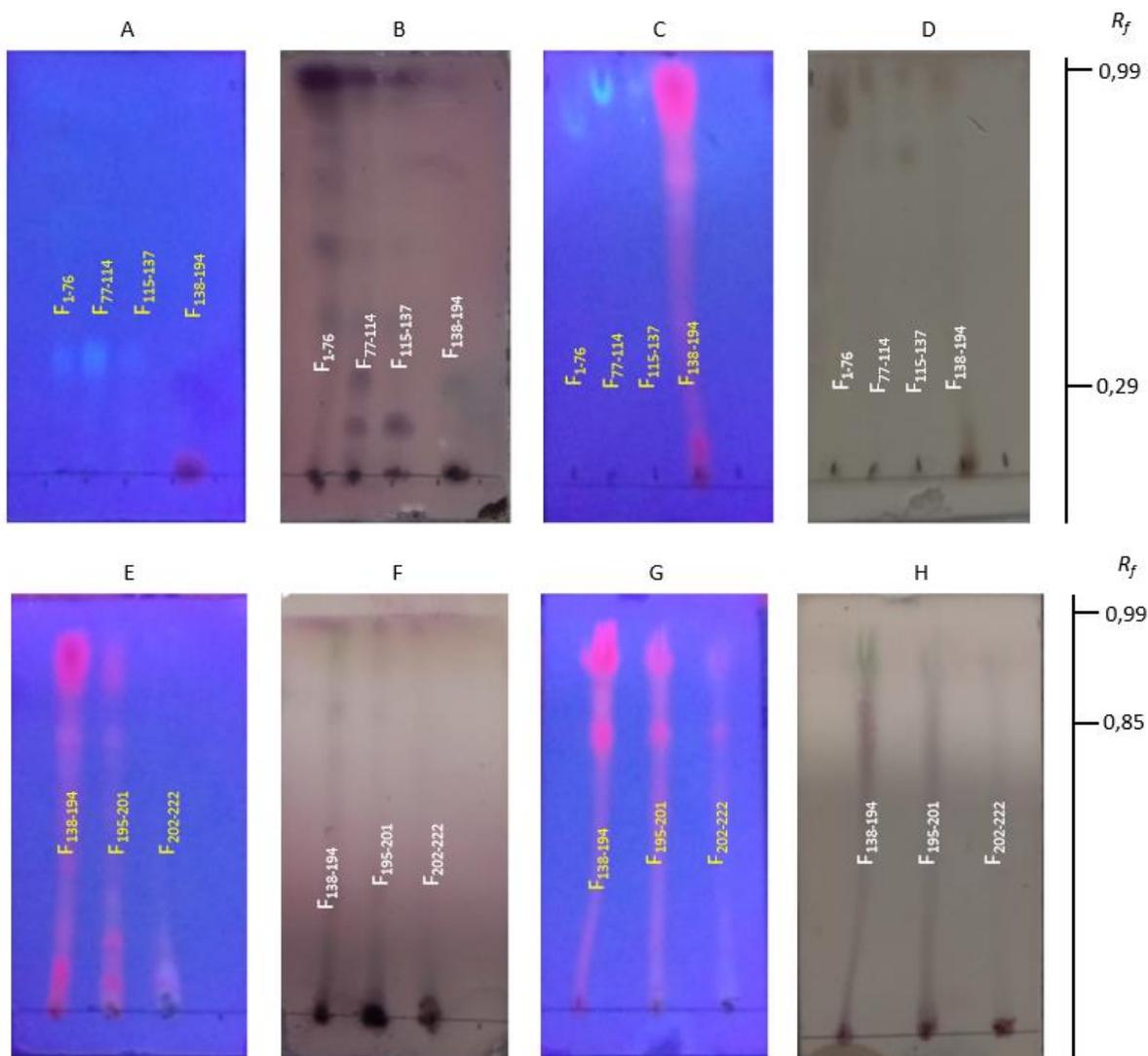
A fração FDFo (2,7 g), foi submetida à CC (PCDC1) (90,2 g, 22,0 × 3,0 cm d.i.) utilizando como FE sílica gel para cromatografia flash (40–263 μm) e FM um gradiente de solventes que iniciou com hexano/CH₂Cl₂ (99:1) até CH₂Cl₂ 100%, e na sequência CH₂Cl₂/MeOH (99:1) até MeOH 100% (Figura 24). As frações coletadas (222) foram analisadas por CCD utilizando vanilina sulfúrica como revelador e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de *R_f* permitindo reagrupá-las em seis novas frações (Figura 25).

Figura 24 – CC da fração FDFo.



Fonte: O autor.

Figura 25 – Cromatoplasas das frações obtidas da CC (PCDC1).

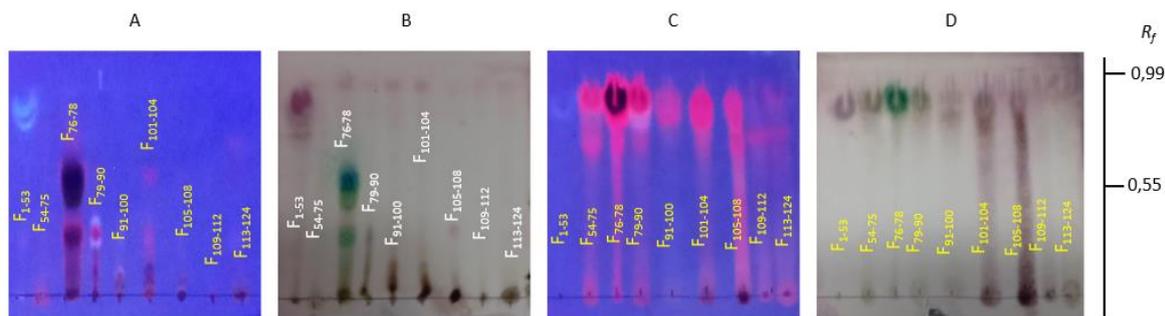


Nota: FE: sílica, FM: hexano/CH₂Cl₂ (3:7) (A e B), CH₂Cl₂/AcOEt (7:3) (C e D), AcOEt (100%) (E e F) e AcOEt/MeOH (7:1) (G e H). Inspeção em luz UV 365 nm (A, C, E e G) e revelador vanilina sulfúrica (B, D, F e H).

Fonte: O autor.

A fração FDC1-F₁₃₈₋₁₉₄ (915,6 mg) foi submetida à CC (PCDC2) (79,0 g, 20,0 × 3,0 cm d.i.) utilizando como FE sílica gel para cromatografia flash (40–263 μm) e FM um gradiente de solventes que iniciou com hexano/CH₂Cl₂ (9:1) até CH₂Cl₂ (100%), CH₂Cl₂/AcOEt (9,5:0,5) até AcOEt (100%), e AcOEt/MeOH (9:1) até MeOH (100%). As frações coletadas (124) foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de *R_f* (Figura 26 e 27).

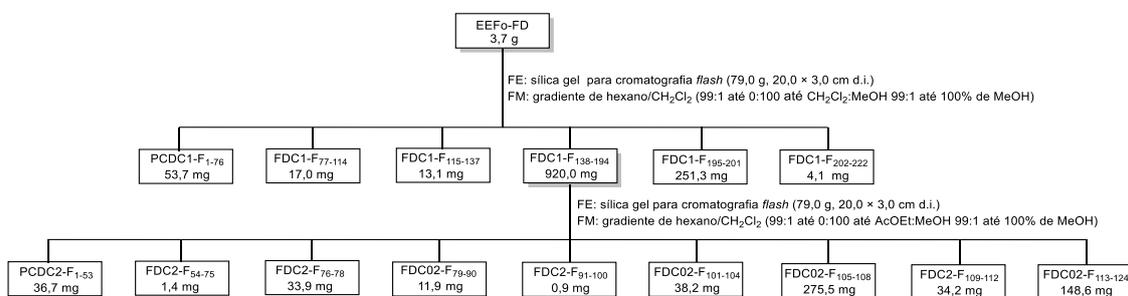
Figura 26 – Cromatoplas das frações obtidas da CC (PCDC2).



Nota: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂/AcOEt (38:2) (A e B), e AcOEt/MeOH (7:1) (C e D). Inspeção em luz UV 365 nm (A e C) e revelador vanilina sulfúrica (B e D).

Fonte: O autor.

Figura 27 – Fluxograma do fracionamento cromatográfico do FDFo de *P. carthagenensis*.

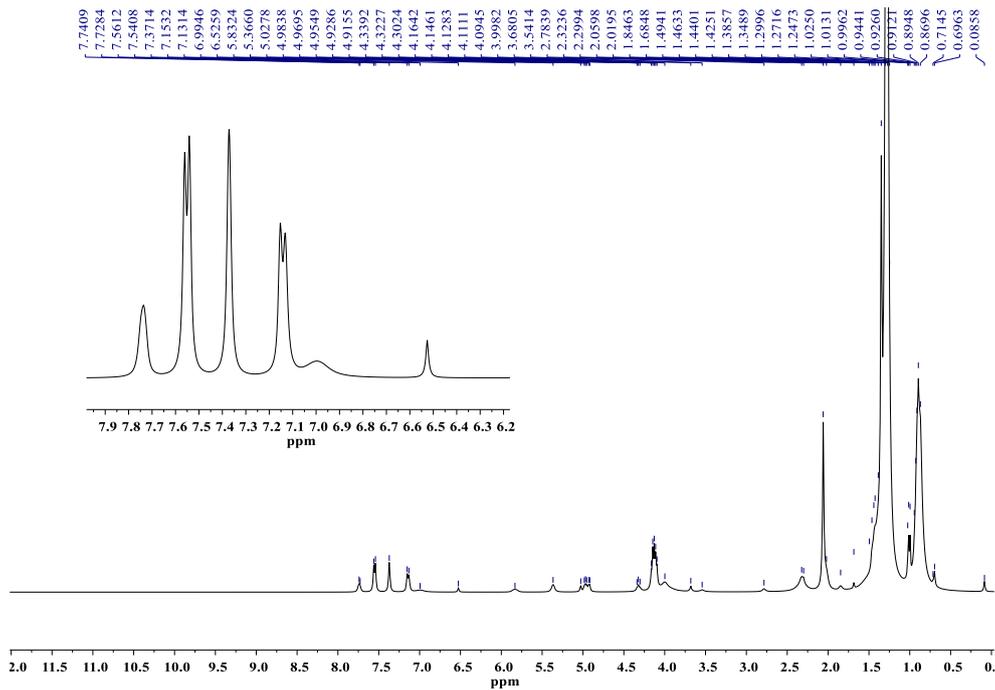


Fonte: O autor.

5.2.2.1. Análise por RMN das frações PCDC1-F₁₋₇₆ e PCDC1-F₇₇₋₁₁₄

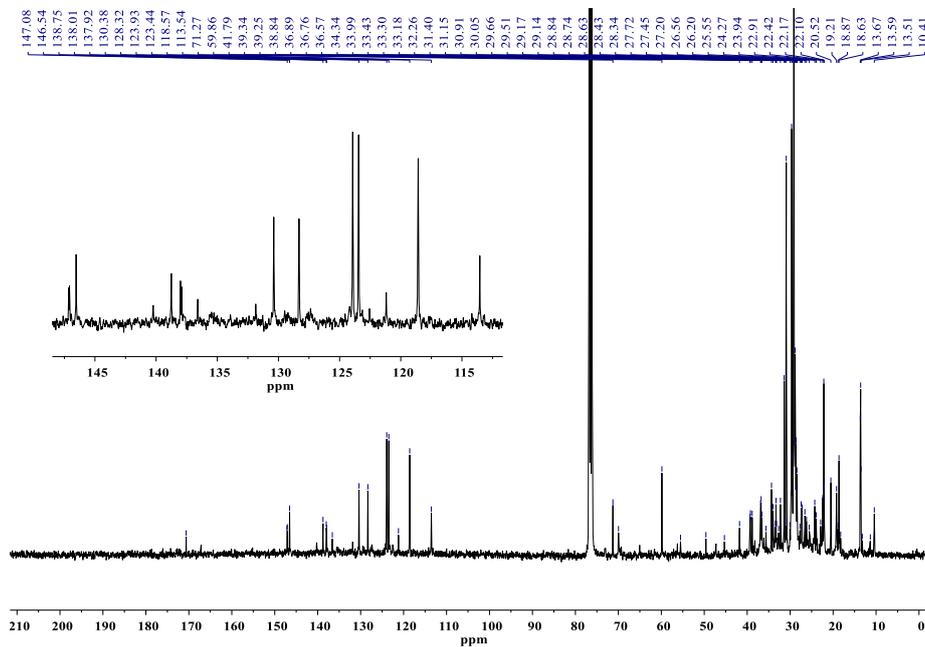
As frações PCDC1-F₁₋₇₆ (Figura 28–30) e PCDC1-F₇₇₋₁₁₄ (Figura 31–33) foram submetidas a RMN ¹H, ¹³C e DEPT 135 para avaliação das classes de metabólitos presentes.

Figura 28 – Espectros de RMN ^1H da fração PCDC1-F $_{1-76}$ a 400 MHz em CDCl_3 .



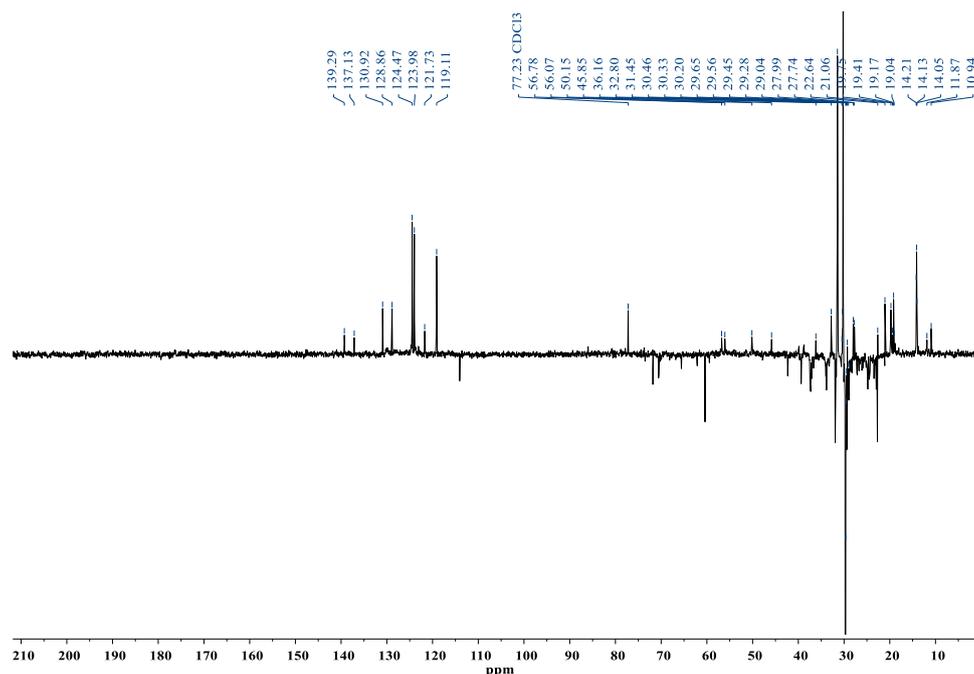
Fonte: O autor.

Figura 29– Espectros de RMN ^{13}C da fração PCDC1-F $_{1-76}$ a 400 MHz em CDCl_3 .



Fonte: O autor.

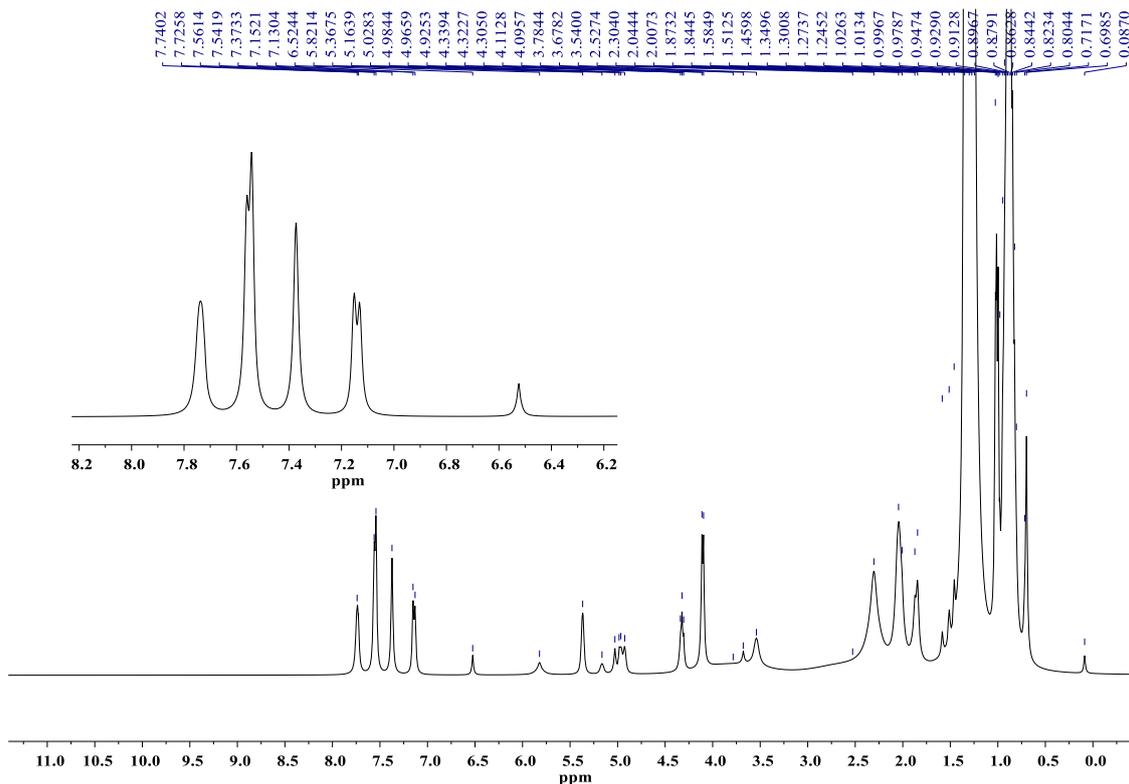
Figura 30 – Espectros de RMN DEPT 135 da fração PCDC1-F₁₋₇₆ a 400 MHz em CDCl₃.



Fonte: O autor.

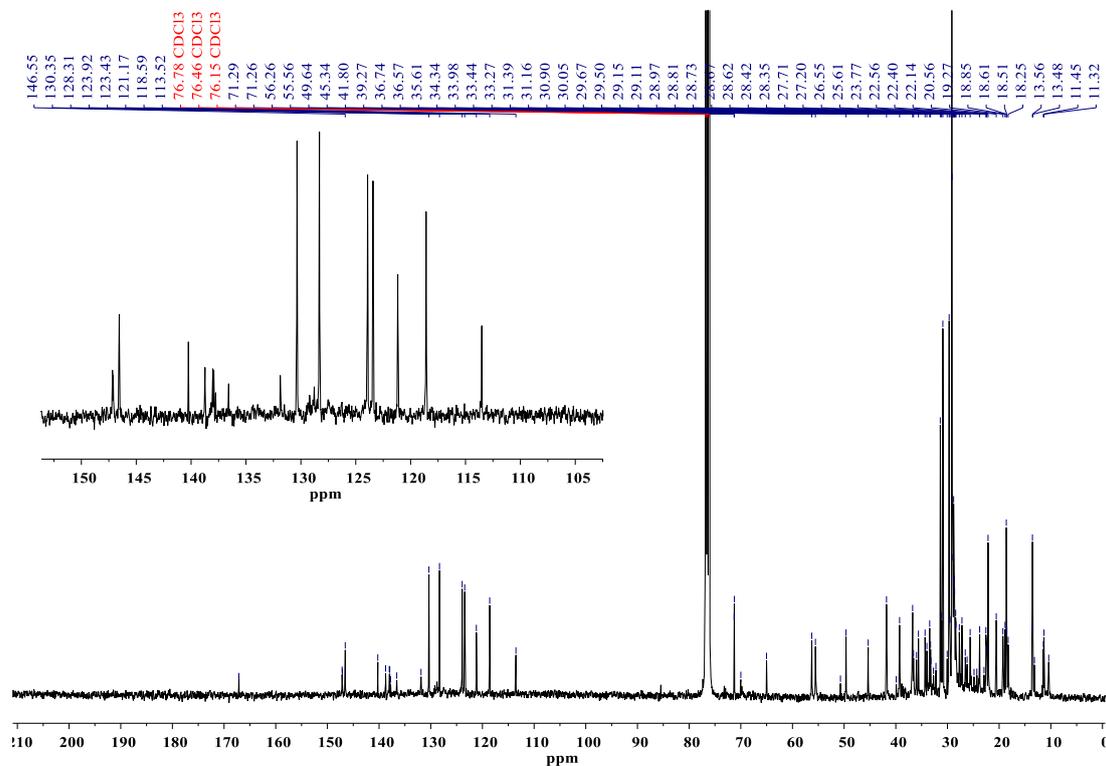
A análise dos espectros de RMN ¹H da fração PCDC1-F₁₋₇₆ (Figura 28), permitiu observar a presença de quatro sinais na região de hidrogênios aromáticos em δ 7,14 (d, $J = 8,75$ Hz), δ 7,37 (s), δ 7,155 (d, $J = 8,75$ Hz) e δ 7,74 (s), o RMN ¹³C (Figura 29). Também foi possível observar a presença de quatorze sinais na região de carbono aromático dos quais cinco (δ 136,59; 138,01; 146,54; 147,08 e 147,15) não aparecem no DEPT 135 (Figura 30), indicando que são carbonos quaternários. Estes sinais indicam a presença de compostos aromáticos substituídos.

Figura 31 – Espectros de RMN ^1H da fração PCDC1-F₇₇₋₁₁₄ a 400 MHz em CDCl_3 .



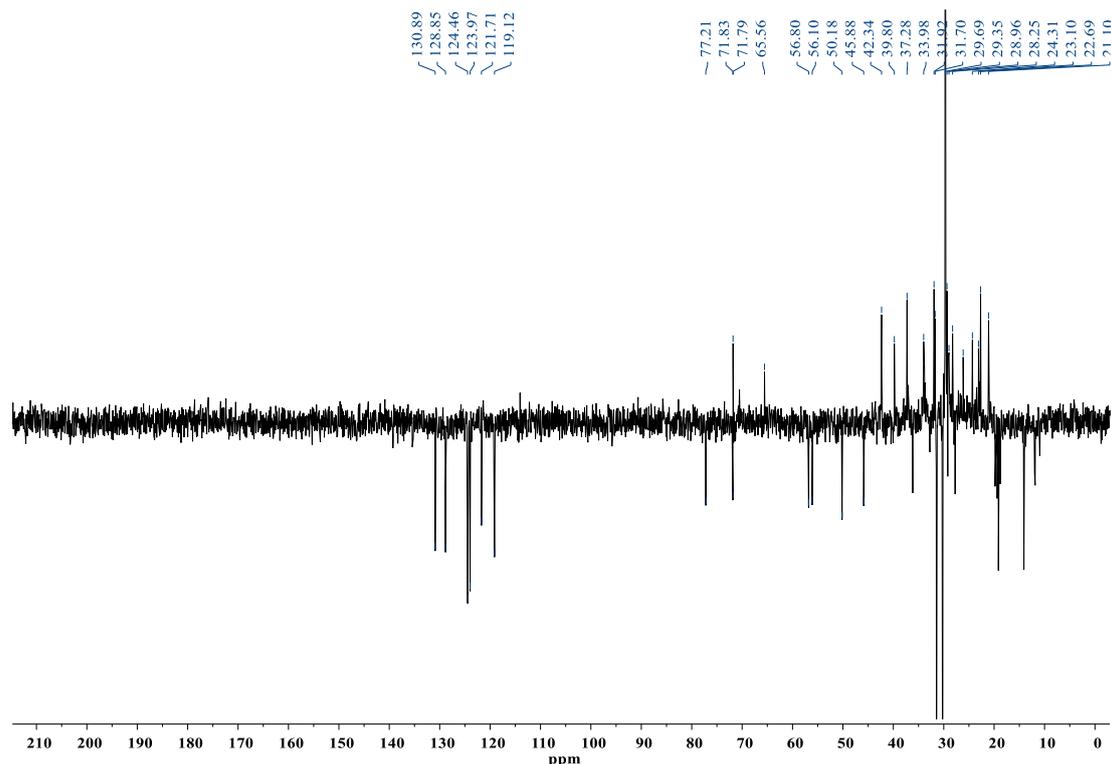
Fonte: O autor.

Figura 32 – Espectros de RMN ^{13}C da fração PCDC1-F₇₇₋₁₁₄ a 400 MHz em CDCl_3 .



Fonte: O autor.

Figura 33 – Espectros de RMN DEPT 135 da fração PCDC1-F₇₇₋₁₁₄ a 400 MHz em CDCl₃.



Fonte: O autor.

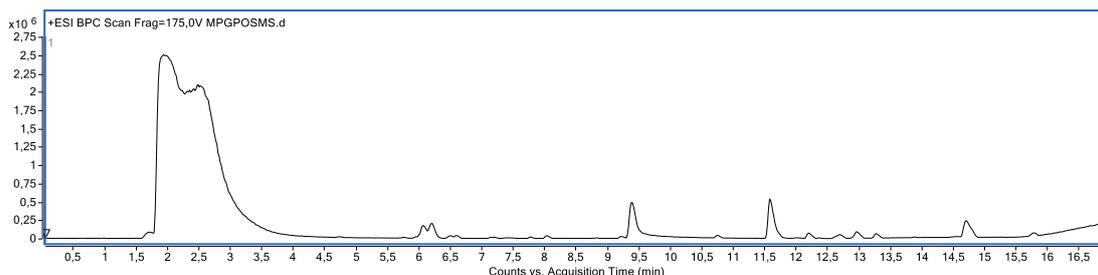
A análise dos espectros de RMN ¹H ¹³C e DEPT 135 da fração PCDC1-F₇₇₋₁₁₄ (Figura 31–33) permitiu observar sinais (hidrogênio e carbono aromáticos) equivalentes àqueles observados na fração PCDC1-F₁₋₇₆, indicando que as mesmas substâncias estão presentes nas duas frações. Também foram observados sinais intensos, no RMN ¹H (Figura 31), na região de δ 1,27 (m) e nos RMN de ¹³C (Figura 32) e DEPT 135 (Figura 33) em δ 29,6, indicando a presença de cadeias longas de metilenos (CH₂) característicos de ácidos graxos e derivados (PIETRO; MANNU; MELE, 2020).

5.3 Análise por CLAE-EM da galantamina

Como uma alternativa economicamente viável para obtenção do controle positivo (galantamina, **40**) para os testes de inibição da acetilcolinesterase e bunitilcolinesterase, o princípio ativo do fármaco comercial Coglive[®] (bromidrato de galantamina), foi extraído do medicamento e obtido na forma de base livre (Item 4.3) e analisado por CLAE-EM (Figuras 34–35) para confirmação da estrutura.

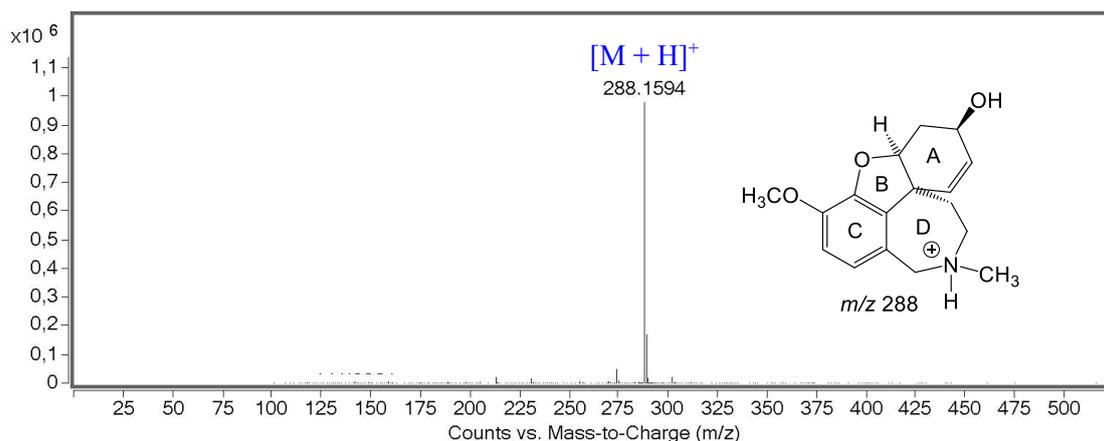
A análise permitiu observar a presença de um sinal majoritário no cromatograma com t_R 1,9 min (Figura 30). A análise por EM-IES-(+) em alta resolução permitiu estabelecer a fórmula molecular $C_{17}H_{21}NO_3$ para **40**, com índice de deficiência de hidrogênio igual a oito. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 288,1594 $[M + H]^+$, calculado $C_{17}H_{22}NO_3^+$ (Δ 0,0 ppm) (Figura 31).

Figura 34 – Cromatograma (CLAE-EM) da galantamina.



Fonte: O autor.

Figura 35 – EM-IES-(+) em alta resolução da galantamina.

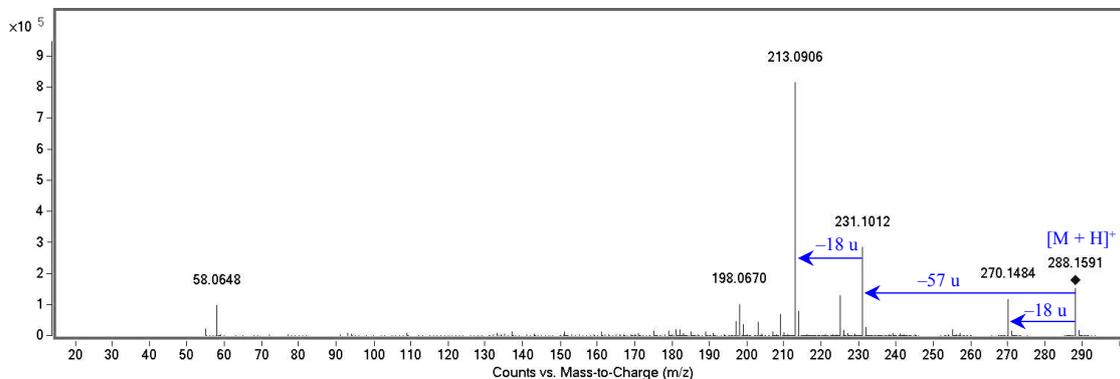


Fonte: O autor.

Quando o sinal de m/z 288 foi submetido à análise sequencial (EM/EM-IES-(+)) (Figura 36), foi observado o fragmento de m/z 270 atribuído à eliminação neutra de H_2O (18 u) (Figura 37). Adicionalmente, foi observado o sinal de m/z 213, correlacionado a conjugação do par de elétrons da metoxila (anel C), que auxilia a abertura do anel de sete membros (anel D), contendo o nitrogênio protonado, seguido de um rearranjo de hidrogênio e eliminação neutra de C_3H_7N (57 u). A sequência de eliminações anteriormente mencionadas também pode ser invertida. Inicialmente a eliminação neutra de C_3H_7N , levando ao íon fragmento de m/z 231, seguida de eliminação neutra de H_2O , gerando o íon de m/z 213 (Figura 37) (MANNENS et al., 2002). Este perfil de

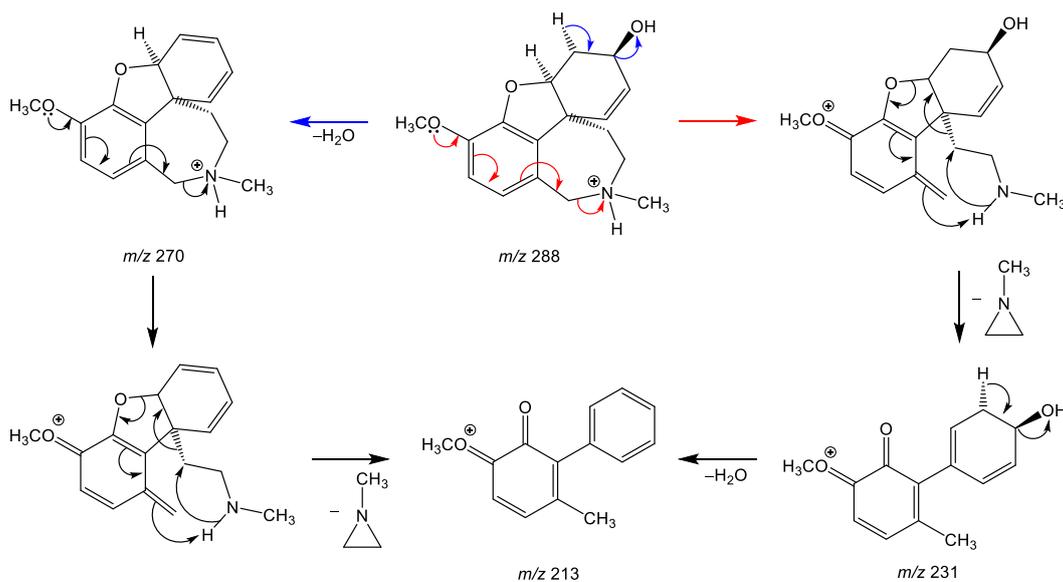
fragmentação é semelhante àquele encontrado na literatura (MANNENS et al., 2002; ZHOU et al., 2014).

Figura 36 – EM/EM-IES-(+) da galantamina.



Fonte: O autor

Figura 37 – Proposta de fragmentação para a galantamina.



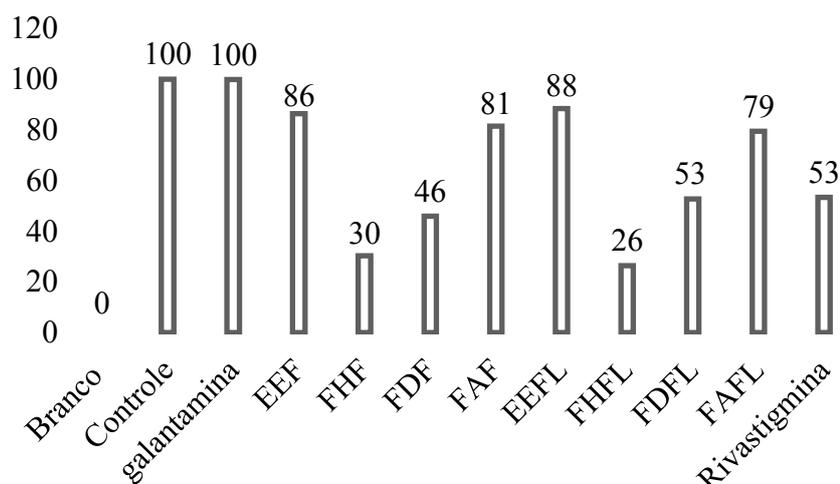
Fonte: O autor

5.3 Avaliação da inibição da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE)

Estudos anteriores demonstraram que *P. carthagenensis* é uma fonte em potencial de substâncias inibidoras da AChE, o que nos motivou para uma abordagem mais direcionada para esta atividade. Desta forma, os extratos etanólicos, as frações hexano, CH_2Cl_2 e AcOEt das flores e folhas foram avaliados quanto ao potencial de inibição da

AChE (Figura 38) e BChE (Figura 39) utilizando o modelo de ensaio em microplaca (MARSTON et al., 2002; ELLMAN et al., 1961; RHEE et al., 2001). Neste método, as enzimas hidrolisam os substratos acetiltiocolina ou butiriltiocolina, para produzir tiocolina que reage com 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), formando 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocinoína e um composto que pode ser detectado a 405 nm o 5-tio-2-nitrobenzoato (Figura 40).

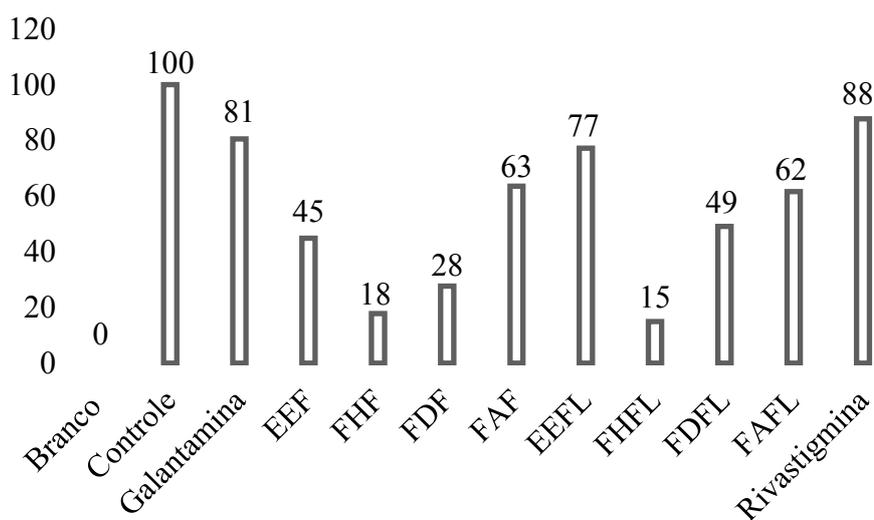
Figura 38 – Gráfico de avaliação da atividade inibidora de AChE (%) dos extratos e frações.



Nota: Controle positivo: galantina, EEfo: Extrato etanólico das folhas, FHFo: Fração hexano das folhas, FDFo: Fração CH₂Cl₂ das folhas, FAFo: Fração AcOEt das folhas, EEfL: Extrato etanólico das flores, FHFfL: Fração hexano das flores, FDFfL: Fração CH₂Cl₂ das flores, FAFfL: Fração AcOEt das flores.

Fonte: O autor.

Figura 39 – Gráfico de avaliação da atividade inibidora de BChE (%) dos extratos e frações.



Nota: Controle positivo: rivastigmina, EEFo: Extrato etanólico das folhas, FHFo: Fração hexano das folhas, FDFo: Fração CH_2Cl_2 das folhas, FAFo: Fração AcOEt das folhas, EEFL: Extrato etanólico das flores, FHFL: Fração hexano das flores, FDFL: Fração CH_2Cl_2 das flores, FAF: Fração AcOEt das flores.

Fonte: O autor.

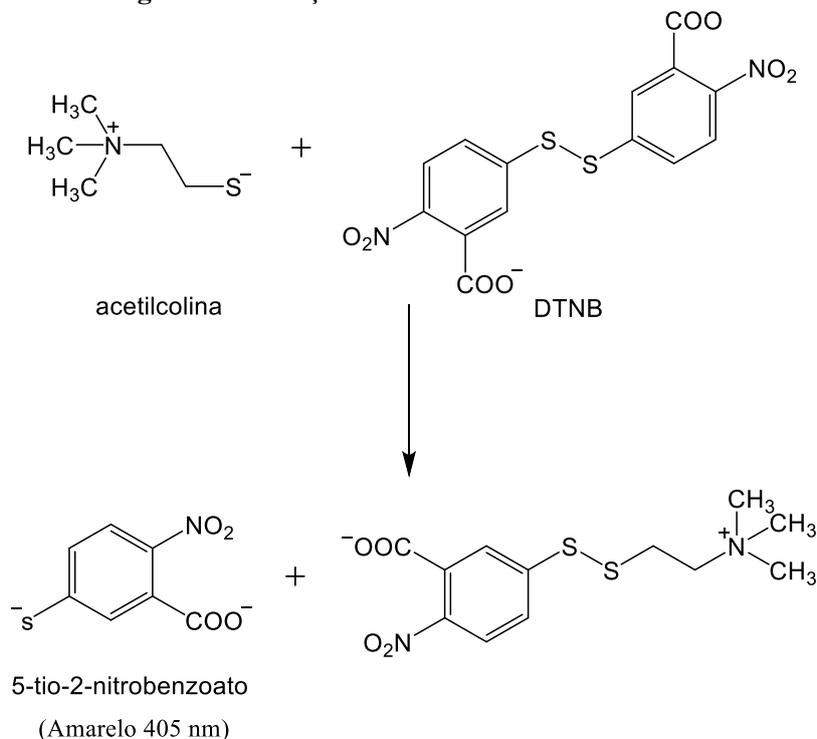
A partir dos resultados observados nas figuras demonstradas acima, é possível notar que os extratos etanólicos das folhas e flores e as frações acetato de etila de ambas apresentaram potenciais de inibição da AChE promissores de 86% e 88% (extratos), das folhas e flores respectivamente e as frações acetato de etila 81% e 79% respectivamente, dentre as amostras testadas são os mais próximos dos valores obtidos pelo controle positivo, a galantamina com valor de inibição de 99%, as frações CH_2Cl_2 e hexano tanto das flores quanto das folhas apresentaram inibição inferior a 54% nesta enzima, esta diferença indica que compostos potenciais inibidores da AChE podem estar presentes nas frações acetato de etila e que estes mesmos compostos estão presente nos extratos etanólicos.

Quanto aos valores de inibição de BChE obtidos, o extrato etanólico das flores e as frações acetato de etila de ambas as partes (folhas e flores) apresentaram inibição superior a 61%, sendo as frações hexano e CH_2Cl_2 tendo valores inferiores a 50%, indicando que os potenciais compostos inibidores de BChE como demonstrado para a AChE podem estar na fração acetato de etila.

A galantina apresentou um maior valor de inibição da enzima AChE (99%) se comparado ao valor de inibição da BChE (81%), o que difere da rivastigmina, que

apresentou um maior valor de inibição da enzima BChE (88%), sendo maior que o valor obtido para a AChE (53%).

Figura 40 – Reação entre o DTNB e a acetilcolina.

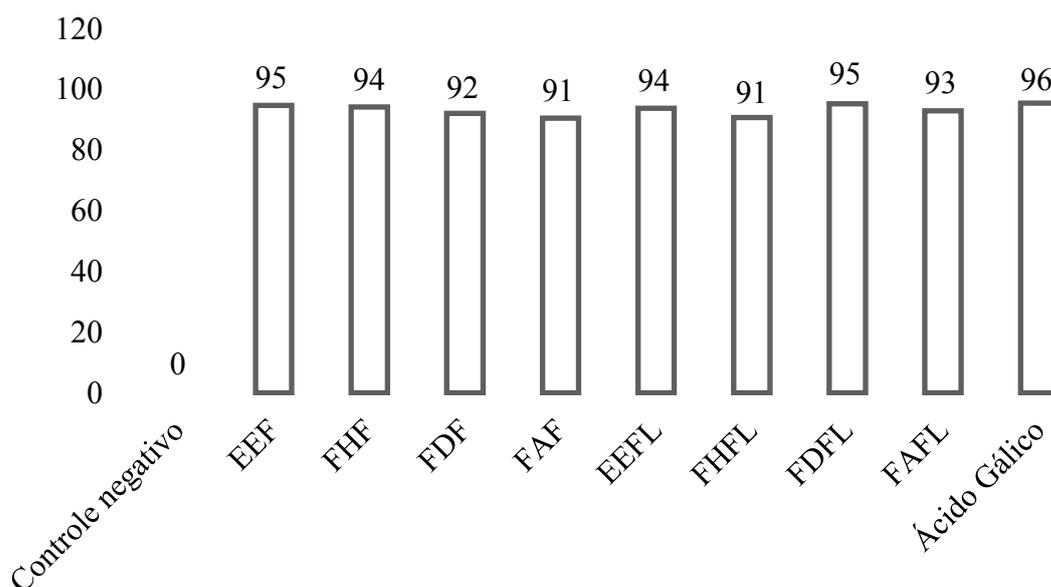


Fonte: O autor

5.4. Atividade antioxidante pelo método de DPPH

Desequilíbrios entre compostos oxidantes e antioxidantes seguida da geração excessiva de radicais livres em um organismo ocasiona um processo chamado de estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2010). Este mecanismo gera a oxidação inadequada de biomoléculas ocorrendo a perda de sua atividade biológica gerando um dano oxidativo em células e tecidos (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Neste contexto para avaliar a espécie, visando sua atividade antioxidante, ensaios utilizando o método de redução dos radicais livres gerados por DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) neste método o elétron desemparelhado do DDPH o confere uma cor violeta, e, quando é reduzido, sua coloração se torna amarelo e o método FRAP, baseado na capacidade da amostra reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+} . Ambos os extratos etanólicos e as frações hexano, CH_2Cl_2 e AcOEt das flores e folhas foram submetidas à análise com DPPH e FRAP (Figura 41).

Figura 41 – Atividade antioxidante pelo método DPPH.



Nota: Controle positivo: Ácido gálico, EEf: Extrato etanólico das folhas, FHF: Fração hexano das folhas, FDF: Fração CH₂Cl₂ das folhas, FAF: Fração AcOEt das folhas, EEfL: Extrato etanólico das flores, FHFfL: Fração hexano das flores, FDFfL: Fração CH₂Cl₂ das flores, FAFfL: Fração AcOEt das flores.

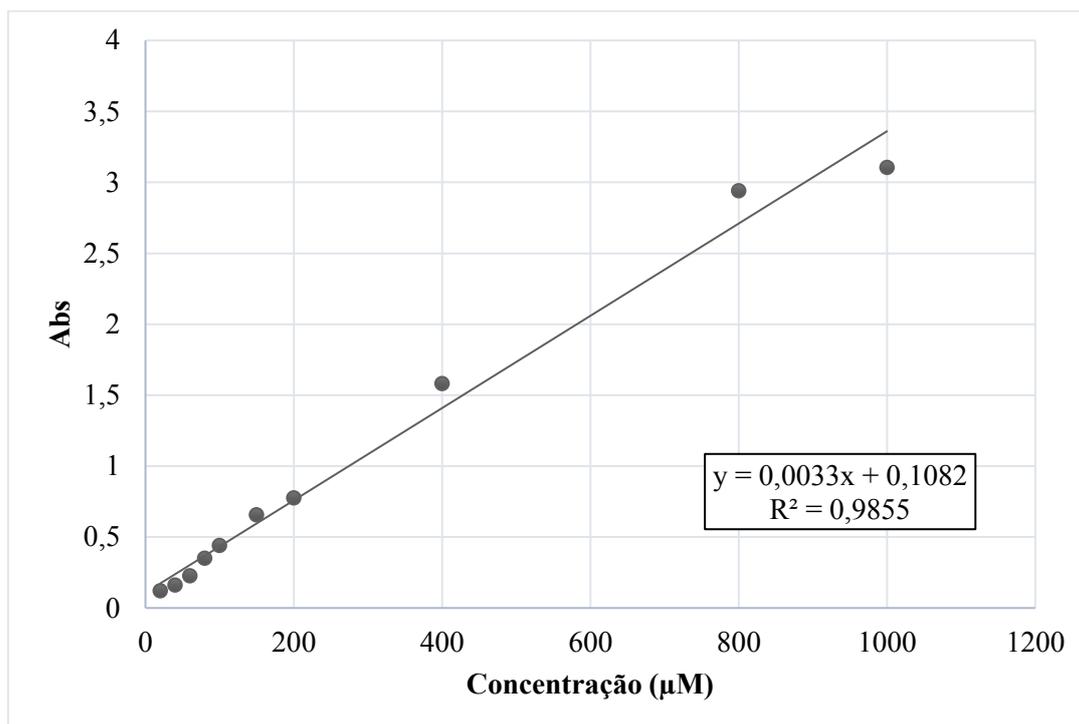
Fonte: O autor.

Nas concentrações analisadas ambas as amostras apresentaram atividade antioxidante próximos ao padrão positivo (ácido gálico atividade de 96%). Neste contexto é notável o potencial sequestrador de radical livre DPPH de ambas as amostras.

5.5. Atividade antioxidante pelo método de FRAP

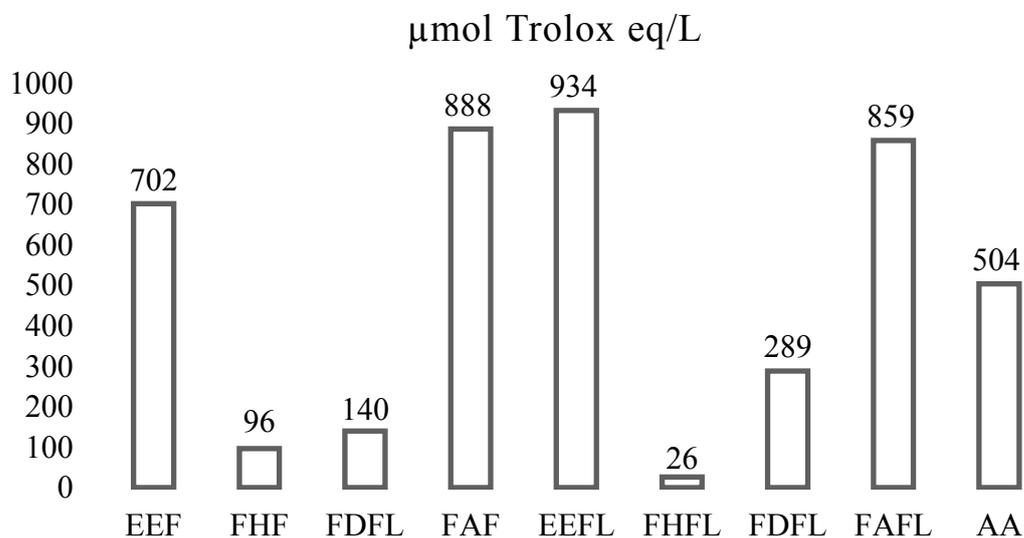
Uma curva analítica, construída com trolox como padrão, é utilizada para determinar a capacidade antioxidante (Figura 42). O ensaio de FRAP consiste na análise do potencial redutor de um composto antioxidante pela sua reação com o complexo Fe³⁺-TPTZ (forma férrica) reduzindo-o para um complexo Fe²⁺-TPTZ de coloração azul escuro (forma ferrosa), podendo ser quantificado por colorimetria a 593 nm. Os extratos etanólicos (EEf e EEfL) e as frações em hexano (FHF e FHFfL), CH₂Cl₂ (FDF e FDFfL) e AcOEt (FAF e FAFfL) foram avaliados utilizando este método (Figura 43).

Figura 42 – Curva analítica de trolox.



Fonte: O autor.

Figura 43 – Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP.



Nota: Controle positivo: Ácido ascórbico (AA), EEFo: Extrato etanólico das folhas, FHFo: Fração hexano das folhas, FDFo: Fração CH₂Cl₂ das folhas, FAFo: Fração AcOEt das folhas, EEFL: Extrato etanólico das flores, FHFL: Fração hexano das flores, FDFL: Fração CH₂Cl₂ das flores, FAFL: Fração AcOEt das flores.

Fonte: O autor.

Das 10 amostras analisadas 4 apresentaram um potencial antioxidante superior a 500 μmol de trolox eq/L, que é o valor obtido pelo controle positivo, os extratos etanólicos das folhas e das flores e as frações AcOEt de ambas. Isto sugere que as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante podem estar presentes na fração AcOEt, e estas mesmas substâncias estão presentes no extrato etanólico.

5.6. Ensaio de citotoxicidade sobre a linhagem celular NIH/3T3

Ensaio baseado em biotransformações de sais de tetrazólio para determinar a atividade enzimáticas de células vivas é uma forma bastante atraente de quantificar citotoxicidade, desta forma os extratos etanólicos e as frações obtidas por extração líquido-líquido das folhas e flores da espécie *P. carthagenensis* foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular utilizando biotransformação de MTT. A citotoxicidade foi testada nas concentrações de 100, 300 e 600 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4).

Tabela 4. Citotoxicidade dos extratos etanólicos e das frações de *P. carthagenensis* em porcentagem (%) de células mortas.

Amostra	Concentração		
	600 $\mu\text{g/mL}$	300 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
EEFo	21	0	0
FHFo	0	0	0
FDFo	0	0	0
FAFo	12	0	0
FHAFo	0	0	0
EEFl	0	0	0
FHFf	59	0	0
FDFf	41	0	0
FAFf	0	0	0
FHAFf	5	0	0

Nota: EEFo: Extrato etanólico das folhas, FHFo: Fração hexano das folhas, FDFo: Fração CH_2Cl_2 das folhas, FAFo: Fração AcOEt das folhas, FHAFo: Fração hidroalcolica das folhas, EEL: Extrato etanólico das flores, FHFf: Fração hexano das flores, FDFf: Fração CH_2Cl_2 das flores, FAFf: Fração AcOEt das flores, FHAFf: Fração hidroalcolica das flores.

Fonte: O autor.

A partir dos resultados do ensaio, foi possível observar baixa citotoxicidade, uma vez que morte celular só foi observada na maior concentração (600 µg/mL) testada, sendo que nessa concentração as frações FHF1 e FDF1 apresentaram citotoxicidade de 59 e 41%, respectivamente.

6. Conclusões

Psychotria carthagenensis (Rubiaceae) é uma espécie endêmica do Cerrado brasileiro, utilizadas na bebida alucinógena ayahuasca no Peru, e suspeita de causar a morte de ruminantes em Corumbáiba-GO. Existem poucos estudos na literatura sobre o perfil químico, no entanto, há relatos de potencial anticolinesterásico, o que direcionou nossos estudos para essa atividade. Assim, extratos etanólicos das folhas e flores foram preparados, submetidos a extração líquido-líquido e em seguida avaliados nos ensaios de citotoxicidade, e atividades antioxidante e anticolinesterásica.

A análise das frações obtidas da extração líquido-líquido do extrato etanólicos de *P. carthagenensis* por CCD sugeriu a presença de diversas classes de metabolitos como compostos fenólicos, antraquinonas e esteroides com ênfase na fração acetato de etila das flores e das folhas que apresentaram *spots* com alta intensidade nos reveladores (KOH, Liebermann-Buchard, vanilina sulfúrica e anisaldeído). As CCDs reveladas com iodocloroplatinato e Dragendorff não apresentaram *spots* visíveis em nenhuma fração analisada, indicando que *P. carthagenensis* não contém alcaloides em concentrações que possam ser caracterizadas pelos reveladores. As análises de RMN de ¹H, ¹³C e DEPT sugeriram a presença de compostos fenólicos, devido aos sinais observados na região de hidrogênios e carbonos aromáticos.

Devido ao relato da possível morte do gado pelo senhor João Paulo (fazendeiro de Corumbáiba-GO), que poderia estar associado a ingestão de *P. carthagenensis*, os extratos e frações obtidos foram avaliados no ensaio de citotoxicidade utilizando células NIH/3T3 em três diferentes concentrações: 100, 300 e 600 µg/mL. Na maior concentração (600 µg/mL) as frações hexano (FHF1) e diclorometano (FDF1) das flores apresentaram citotoxicidade superior a 40%, indicando baixo potencial citotóxico.

Nos ensaios de avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, os EEFo-*Pc* e EEFl-*Pc* e as frações FAFo e FAF1 apresentaram

potenciais de inibição da AChE (> 79%) e BChE (> 61%), sendo valores próximos aos controles positivos utilizados, indicando que estas frações são fontes potenciais de metabólitos que podem ser inspiração para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer, porém em quantidade elevada esses compostos também podem atuar inibindo de forma irreversível a AChE, o que causaria toxicidade.

Os extratos etanólicos e as frações também foram submetidos as análises para verificação da atividade antioxidante, utilizando os radicais livres estáveis de DPPH. Os EEFo-*Pc* e EEFl-*Pc* apresentaram valores de inibição do DPPH próximo a 96% (próximo ao obtido pelo controle positivo), sugerindo que é uma fonte de compostos com potencial antioxidante. Os extratos e frações também foram avaliados no ensaio de FRAP, onde o Fe^{3+} é reduzido para Fe^{2+} . Dentre as amostras avaliadas, merecem destaque os EEFo-*Pc* e EEFl-*Pc* e as frações FAFo e FAFl, que apresentaram potencial antioxidante superior a 500 μ mol de trolox eq/L, mesmo valor apresentado pelo controle positivo, indicando a presença de compostos potencial antioxidante.

É importante destacar que a DA é uma doença multifatorial, acarretando além do déficit cognitivo, causado pelo desequilíbrio colinesterásico, processos inflamatórios e nesse sentido, extratos e frações contendo compostos com potencial antioxidante e anticolinesterásico podem atuar em sinergia para o tratamento da DA. Assim, a partir dos resultados de inibição da atividade anticolinesterásica e da atividade antioxidante apresentados pelos extratos e frações de *P. carthagenensis*, fica evidente que essa espécie é uma fonte promissora de compostos com potencial para o tratamento da DA, assim merece um estudo direcionado para o melhor conhecimento dos constituintes químicos que possam atuar como inibidores de AChE/BChE e antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, W. R. Eight segregates from the neotropical genus *Mascagnia* (Malpighiaceae). **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 16, n. 2, p. 168–204, 2006.
[https://doi.org/10.3417/1055-3177\(2006\)16\[168:ESFTNG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3417/1055-3177(2006)16[168:ESFTNG]2.0.CO;2)
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. D. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-ache: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.
<https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160122>
- ARDUINI, F.; RICCI, F.; TUTA, C. S.; MOSCONE, D.; AMINE, A.; PALLESCHI, G. Detection of carbamic and organophosphorous pesticides in water samples using a cholinesterase biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 580, n. 2, p. 155–162, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.07.052>
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629–643, 2010.
<https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- BARBOSA, R. R.; SILVA, I. P.; RIBEIRO FILHO, M. R.; SOTO-BLANCO, B. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. **Acta Veterinária Brasília**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2007.
<https://doi.org/10.21708/avb.2007.1.1.253>
- BARNECHE, S.; CERDEIRAS, M. P.; LUCARINI, R.; MARTINS, C. H.; OLIVARO, C.; VAZQUEZ, A. Anti-Staphylococcus activity of Uruguayan riverside forest plants. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, n. 21, p. 69–71, 2011.
<https://doi.org/10.5530/pj.2011.21.12>
- BECKER, R. E.; COLLIVER, J. A.; MARKWELL, S. J.; MORIEARTY, P. L.; UNNI, L. K.; VICARI, S. Effects of metrifonate on cognitive decline in Alzheimer disease: a double-blind, placebo-controlled, 6-month study. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 12, n. 1, p. 54–57, 1998.
<https://doi.org/10.1097/00002093-199803000-00009>
- BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. D. S. Biological activities of constituents from *Psychotria spectabilis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 8, p. 565–569, 2005.
<https://doi.org/10.1080/13880200490901780>
- CALABRÒ, M.; RINALDI, C.; SANTORO, G.; CRISAFULLI, C. The biological pathways of Alzheimer disease: A review. **AIMS neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 86, 2021.
<https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2021005>

CALIXTO, N. O.; PINTO, M. E. F.; RAMALHO, S. D.; BURGER C. M.; BOBEY A.; F. YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; PINTO, A. C. The genus *Psychotria*: phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology and biological properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 1355–1378, 2016.
<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160149>

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99–105, 1998.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000100015>

CEPEA/USP - Centro de estudos avançados em economia aplicada da USP, 2022. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/pib-agro-cepea-pib-do-agro-cresce-8-36-em-2021-participacao-no-pib-brasileiro-chega-a-27-4.aspx>>. Acesso em: jun. 2022.

CHAPALAMADUGU, S.; CHAUDHRY, G. R. Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 5-6, p. 357–389, 1992.
<https://doi.org/10.3109/07388559209114232>

CHIQUIERI, A.; MAIO, F. R. D.; PEIXOTO, A. L. A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na flora Brasiliensis de Martius. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 47–57, 2004.
<https://doi.org/10.1590/2175-78602004558403>

CONCHEIRO, M.; NEWMeyer, M. N.; COSTA, J. L.; FLEGEL, R.; GORELICK, D. A.; HUESTIS, M. A. Morphine and codeine in oral fluid after controlled poppy seed administration. **Drug Testing and Analysis**, v. 7, n. 7, p. 586–591, 2014.
<https://doi.org/10.1002/dta.1742>

COOK, D.; LEE, S. T.; TAYLOR, C. M.; BASSÜNER, B.; RIET-CORREA, F.; PFISTER, J. A.; GARDNER, D. R. Detection of toxic monofluoroacetate in *Palicourea* species. **Toxicon**, v. 80, p. 9–16, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.12.003>

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299–315, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s11101-014-9367-z>

RUHSAM, M., GOVAERTS, R., DAVIS, A. P. Nomenclatural changes in preparation for a World Rubiaceae Checklist. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 157, n. 1, p. 115-124, 2008.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00779.x>

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**,

v. 63, n. 1, p. 101–128, 2012.

<https://doi.org/10.1590/S2175-78602012000100009>

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2nd. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. 520p.

<https://doi.org/10.1002/0470846275>

DRACHMAN, D. A.; LEAVITT, J. Human memory and the cholinergic system: a relationship to aging? **Archives of Neurology**, v. 30, n. 2, p. 113–121, 1974.

<https://doi.org/10.1001/archneur.1974.00490320001001>

DUARTE, A. L.; MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F. Intoxicação por *Amorimia* spp. em ruminantes. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1294–1301, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782013005000081>

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives.

Pharmacological Research, v. 112, p. 4–29, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M.

Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 19–22, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.01.001>

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JUNIOR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.

Biochemistry Pharmacology, v. 7, p. 88–95, 1961.

[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2015. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-bovina>>. Acessado em: jun. 2022.

FALCO, A. D.; CUKIERMAN, D. S.; HAUSER-DAVIS, R. A.; REY, N. A. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39, p. 63–80, 2016.

<https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150152>

FINK, H. A.; JUTKOWITZ, E.; MCCARTEN, J. R.; HEMMY, L. S.; BUTLER, M.; DAVILA, H.; RATNER, E.; CALVERT, C.; BARCLAY, T. R.; BRASURE, M.; NELSON, V. A.; KANE, R. L. Pharmacologic interventions to prevent cognitive decline, mild cognitive impairment, and clinical Alzheimer-type dementia: a systematic review. **Annals of Internal Medicine**, v. 168, n. 1, p. 39–51, 2018.

<https://doi.org/10.7326/M17-1529>

FORTALENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 32, p. 137–148, 2005.

<https://doi.org/10.1590/S0101-60832005000300006>

FRISONI, G. B.; ALTOMARE, D.; THAL, D. R.; RIBALDI, F.; VAN DER KANT, R.; OSSENKOPPELE, R.; BLENNOW, K.; CUMMINGS, J.; VAN DUIJN, C.; NILSSON P. M.; DIETRICH, P. Y.; SCHELTENS, P.; DUBOIS B. The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 53–66, 2022.

<https://doi.org/10.1038/s41583-021-00533-w>

GBIF - Global Biodiversity Information Facility, 2022. Disponível em: < <https://www.gbif.org/species/2919963> > Acessado em: jun. 2022a.

GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; INGRAM, D. K.; WANG, Y.; PEPEU, G.; SCALI, C.; YU, Q. S.; MAMCZARZ, J.; HOLLOWAY, H. W.; GIORDANO, T.; CHEN, D.; FURUKAWA, K.; SAMBAMURTI, K.; BROSSI, A.; LAHIRI, D. K. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 47, p. 17213–17218, 2005.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0508575102>

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>

HAMPEL, H.; MESULAM, M. M.; CUELLO, A. C.; FARLOW, M. R.; GIACOBINI, E.; GROSSBERG, G. T.; KHACHATURIAN, A. S.; VERGALLO, A.; CAVEDO, E.; SNYDER, P. J.; KHACHATURIAN, Z. S. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 141, n. 7, p. 1917–1933, 2018.

<https://doi.org/10.1093/brain/awy132>

HEITZMAN, M. E.; NETO, C. C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 5–29, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.10.022>

HENRIQUES, A. T.; LOPES, S. O.; PARANHOS, J. T.; GREGIANINI, T. S.; FETT-NETO, A. G.; SCHRIPEMA, J.; VON POSER, G. L. N. β -D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 4, p. 449–454, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.027>

HOLSTEGE, C. P.; BECHTEL, L. K.; REILLY, T. H.; WISPELWEY, B. P.; DOBMEIER, S. G. Unusual but potential agents of terrorists. **Emergency Medicine**

Clinics of North America, v. 25, n. 2, p. 549–566, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.emc.2007.02.006>

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Research**, v. 52, 2019.
<https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>

JABBAR A.; ALI, A.; TAWAB A.; HAQUE A.; IQBAL M. Fatty acid profiling of lipid a isolated from indigenous *Salmonella typhi* strain by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 36, n. 1, p. 140–149, 2014.
https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:45082710

JAMES, L. F.; NIELSEN, D. B.; PANTER, K. E. Impact of poisonous plant on the livestock industry. **Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives**, v. 45, n. 1, p. 3–8, 1992.
<https://doi.org/10.2307/4002517>

JANNIC, V.; GUÉRITTE, F.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; MARTIN, M. T.; SÉVENET, T.; POTIER, P. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Psychotria oleoides* and *Psychotria yciiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 6, p. 838–843, 1999.
<https://doi.org/10.1021/np9805387>

CARVALHO JUNIOR, A. R.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. *Psychotria* Genus: Chemical constituents, biological Activities, and synthetic studies. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 48, p. 231–261, 2016.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63602-7.00007-22>

KATO, K. A new color reaction of steroid with anhydrous aluminum chloride and anisaldehyde. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 12, n. 11, p. 1319–1328, 1964.
<https://doi.org/10.1248/cpb.12.13199>

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; CRETTON, S.; VANDER HEYDEN, Y.; GASPER, A. L.; NEJAD-EBRAHIMI, S.; CHRISTEN, P.; HENRIQUES, A. T. Bioactive azepine-indole alkaloids from *Psychotria nemorosa*. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 4, p. 852–863, 2020.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b004699>

KREBS, H. C.; KEMMERLING, W.; HABERMEHL, G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by ¹⁹F-NMR spectroscopy. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 909–913, 1994.
[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90369-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90369-7)

LEAL, M. B.; ELISABETSKY, E. Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 54, n. 1, p. 37–40, 1996.
[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01448-1](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01448-1)

LIMA, E. F.; MEDEIROS, R. M. T.; COOK, D.; LEE, S. T., KAEHLER, M.; SANTOS-BARBOSA, J. M.; RIET-CORREA, F. Studies in regard to the classification and putative toxicity of *Fridericia japurensis* (*Arrabidaea japurensis*) in Brazil. **Toxicon**, v. 115, p. 22–27, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.001>

LU, Q.; WANG, J.; KONG, L. Chemical constituents from *Psychotria yunnanensis* and its chemotaxonomic study. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 52, p. 20–22, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.11.002>

MANNENS, G. S. J.; SNEL, C. A. W.; HENDRICKX, J.; VERHAEGHE, T.; LE JEUNE, L.; BODE, W.; BEIJSTERVELDT, L.; LAVRIJSEN, K.; LEEMPOELS, V. J.; OSSELAER, N.; VAN PEER A.; MEULDERMANS, W. The metabolism and excretion of galantamine in rats, dogs, and humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 5, p. 553–563, 2002.

<https://doi.org/10.1124/dmd.30.5.553>

MARCHESE, C. Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. **Global Ecology and Conservation**, v. 3, p. 297–309, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.gecco.2014.12.008>

MARQUES, O. A.; LYRA, L. R. P.; CONSERVA, L. M. β -carboline alkaloids from *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 339–341, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.04.015>

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51–54, 2002.

<https://doi.org/10.1002/pca.623>

MENDIETA, M. D. C.; SOUZA, A. D. Z. D.; CEOLIN, S.; VARGAS, N. R. C.; CEOLIN, T.; HECK, R. M. Toxic plants: importance of knowledge for realization of health education. **Revista de Enfermagem UFPE**, v. 8, n. 3, p. 680–686, 2014.

<https://doi.org/10.5205/reuol.5149-42141-1-SM.0803201424>

MESGARZADEH, I.; AKBARZADEH, A. R.; RAHIMI, R. Surface-active properties of solvent-extracted panax ginseng saponin-based surfactants. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 20, n. 3, p. 609–614, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s11743-017-1940-1>

MESULAM, M. M. Cholinergic circuitry of the human nucleus basalis and its fate in Alzheimer's disease. **Journal of Comparative Neurology**, v. 521, n. 18, p. 4124–4144,

2013.

<https://doi.org/10.1002/cne.23415>

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55–63, 1983.

[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

NASCIMENTO, G. C. Z.; RIVERO-WENDT, C. L. G.; MIRANDA-VILELA, A. L.; DOURADO, D. M.; FACCO, G. G.; OLIVON, V. C.; PORTO, K. R. A.; ROEL, A. R.; NUNES, V. L. B.; OLIVEIRA, A. K. M.; MATIAS, R. Acetylcholinesterase inhibitory potential and lack of toxicity of *Psychotria carthagenensis* infusions. Research, **Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e22810414059–e22810414059, 2021.

<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.14059>

NASCIMENTO, N. C.; AIRES, L. D.; PFISTER, J. A.; MEDEIROS, R. M.; RIET-CORREA, F.; MENDONÇA, F. S. Plantas cardiotoxicas para ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1239–1249, 2018.

<https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5548>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Produtos naturais como fontes de novos medicamentos nas quase quatro décadas de 01/1981 a 09/2019. **Revista de Produtos Naturais**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

<https://doi/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

OLIVEIRA NETO, T. S.; RIET-CORREA, F.; LEE, S. T., COOK, D.; BARBOSA, F. M. S.; SILVA NETO, J. F.; LUCENA, R. B. Poisoning in goats by the monofluoroacetate-containing plant *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae). **Toxicon**, v. 135, p. 12–16, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.05.025>

OLIVEIRA, A. R. M. D.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, p. 1971–1974, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700048>

PARK, S. Y. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 10, p. 1589–1609, 2010.

<https://doi.org/10.1007/s12272-010-1010-y>

PIETRO, M. E.; MANNU, A.; MELE, A. NMR determination of free fatty acids in vegetable oils. **Processes**, v. 8, n. 4, p. 410, 2020.

<https://doi.org/10.3390/pr8040410>

PRINCE, M.; BRYCE, R.; ALBANESE, E.; WIMO, A.; RIBEIRO, W.; FERRI, C. P. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's & dementia**, v. 9, n. 1, p. 63–75. e2, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>

PUNDIR, C. S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 19–31,

2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.025>

RAAL, A.; MEOS, A.; HINRIKUS, T.; HEINÄMÄKI, J.; ROMĀNE, E.; GUDIENĒ, V.; JAK-TAS, V.; KOSHOVYI, O.; KOVALEVA, A.; FURSENCO, C.; CHIRU, T.; NGUYEN, H. T. Dragendorff's reagent: Historical perspectives and current status of a versatile reagent introduced over 150 years ago at the University of Dorpat, Tartu, Estonia. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 7, p. 299–306, 2020.

<https://doi.org/10.1691/ph.2020.0438>

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522–531, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02080-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02080-2)

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

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0)

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 38–42, 2001.

<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2001000100008>

RIVIER, L.; LINDGREN, J. E. "Ayahuasca," the South American hallucinogenic drink: An ethnobotanical and chemical investigation. **Economic Botany**, v. 26, n. 2, p. 101–129, 1972.

<https://doi.org/10.1007/BF028607722>

ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, v. 1, p. 49–61, 2015.

<https://doi.org/10.15628/holos.2015.2492>

ROVA, J. H. E.; DELPRETE, P. G.; ANDERSSON, L.; ALBERT, V. A. A trnL-F cpDNA sequence study of the Condamineae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. **American journal of botany**, v. 89, n. 1, p. 145–159, 2002.

<https://doi.org/10.3732/ajb.89.1.1455>

SAKAI, S.; WRIGHT, S. J. Reproductive ecology of 21 coexisting *Psychotria* species (Rubiaceae): when is heterostyly lost? **Biological Journal of the Linnean Society**, v.

93, n. 1, p. 125–134, 2008.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00890.x>

SUMMERS, W. K.; MAJOVSKI, L. V.; MARSH, G. M.; TACHIKI, K.; KLING, A. Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. **New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 20, p. 1241–1245, 1986.

<https://doi.org/10.1056/NEJM198611133152001>

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por *Arrabidaea japurensis* (Bignoniaceae) em bovinos em Roraima. **Pesq. Vet. Bras**, v. 1, n. 1, p. 7–17, 1981.

[Vet002.pmd \(pvb.com.br\)](http://Vet002.pmd(pvb.com.br))

TWIGG, L. E.; MEAD, R. J.; KING, D. R. Metabolism of fluoroacetate in the skink (*Tiliqua rugosa*) and the rat (*Rattus norvegicus*). **Australian journal of biological sciences**, v. 39, n. 1, p. 1–16, 1986.

<https://doi.org/10.1071/BI9860001>

VALLI, M.; DOS SANTOS, R. N.; FIGUEIRA, L. D.; NAKAJIMA, C. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI, V. S. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of natural products**, v. 76, n. 3, p. 439–444, 2013.

<https://doi.org/10.1021/np3006875>

VEROTTA, L.; PILATI, T.; TATÒ, M.; ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; NUNES, D. S. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Psychotria colorata*. **Journal of Natural Products**, v.61, p.392–396, 1998.

<https://doi.org/10.1021/np9701642>

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>

VITARELLI, N. C.; SANTOS, M. Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria carthagenensis* Jacq.(Rubiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 923–928, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0102-33062009000400002>

WATKINS, P. B.; ZIMMERMAN, H. J.; KNAPP, M. J.; GRACON, S. I.; LEWIS, K. W. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. **JAMA**, v. 271, n. 13, p. 992–998, 1994.

<https://doi.org/10.1001/jama.271.13.992>

WEISSMANN, G. Aspirin. **Scientific American**, v. 264, n. 1, p. 84–91, 1991.

<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0191-84>

WINK, M. Evolution of toxins and antinutritional factors in plants with special emphasis on Leguminosae. **Poisonous plants and related toxins**, p. 1–25, 2004.

<https://doi.org/10.1079/9780851996141.0001>

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F.L.R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V.C.; WALTER, B.M.T.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, L.P., CAVALCANTI, T.B.; MANSANO, V.F.; FORZZA, R.C. Growing knowledge: An overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

<https://doi.org/10.1590/2175-7860201566417>

ZHOU, X.; LIU, Y. B.; HUANG, S.; LIU, Y. An LC-MS/MS method for the simultaneous determination of lycorine and galanthamine in rat plasma and its application to pharmacokinetic study of *Lycoris radiata* extract in rats. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, v. 34, p. 861–868, 2014.

<https://doi.org/10.1124/dmd.30.5.553>