

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS ÁGRARIAS E
ENGENHARIAS - CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ANDRESSA RIBEIRO VICENTINI

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE EM PLANTAS DA
FAMÍLIA RUBIACEAE NA MATA ATLÂNTICA**

**ALEGRE-ES
2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecária: Claudia Regina da Rocha Oliveira – CRB-6 ES-000576/O

V633p Vicentini, Andressa Ribeiro, 1993-
 Prospecção de inibidores da acetilcolinesterase em plantas da família
Rubiaceae na Mata Atlântica / Andressa Ribeiro Vicentini. – 2017.
 90 f. : il.

 Orientador: Juliana Aparecida Severi.
 Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

 1. Farmacologia veterinária. 2. Inibidores enzimáticos. 3. Rubiaceae -
Mata Atlântica. I. Severi, Juliana Aparecida. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 619

ANDRESSA RIBEIRO VICENTINI

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE EM PLANTAS DA
FAMÍLIA RUBIACEAE NA MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em: Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas. Orientador (a): Prof. (a) Dr. (a): Juliana Aparecida Severi.

ALEGRE-ES

2017

ANDRESSA RIBEIRO VICENTINI

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE EM PLANTAS DA
FAMÍLIA RUBIACEAE NA MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em: Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas. Orientador (a): Prof. (a) Dr. (a): Juliana Aparecida Severi.

Aprovado em 25 de julho de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof (a). Dr (a) Juliana A. Severi
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador (a)

Prof (a). Dr (a) Tatiana T. Carrijo
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof (a). Dr (a) Marcos S. Zanini
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Início meu agradecimento à Deus, ele que inseriu em minha vida pessoas tão especiais nesse período, sem as quais, eu certamente, não teria conseguido chegar até aqui.

À minha família, em especial meu pai Gilmar Sabadini Vicentini e minha avó Dolores Genovez Ribeiro, agradeço imensamente o apoio de sempre, vocês que me ensinaram a ser a pessoa dedicada e que corre atrás dos seus interesses sempre. Obrigada por toda a educação que me ajudou a ser uma pessoa do bem hoje.

Aos meus irmãos e em especial à minha irmã Letícia, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho. Obrigada pela confiança e desculpe pela ausência em muitas circunstâncias!

Ao meu querido namorado, Jean Caon, sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada também à toda a família Caon por serem tão importantes na minha vida.

Às minhas amigas, de vida e de república, por só quererem o meu bem e me valorizarem tanto como pessoa. Obrigada pela amizade!

À minha orientadora Juliana A. Severi, é claro, que acreditou em meu potencial de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disponível e disposta a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento. Fez-me enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação. Você não foi somente orientadora, mas, em muitos momentos, amiga. É minha referência profissional. Obrigada por tudo!

Aos colaboradores deste trabalho, alunos de graduação: Taiana e Karol, pós graduação: Filipe Leitte, pós doc.: Karina Fraige, Dr^o: Marcelo Tangerina, ao prof. Dr^o Marcos Zanini, técnicas de laboratório: Sandra, Jerusa, Magda e Eduardo (que me salvaram inúmeras vezes...rs), a Prof. Dr^a Tatiana T. Carrijo que se prontificou em identificar e registrar todas as espécies vegetais trabalhadas nesse projeto...meu muitíssimo obrigada! Sem vocês nada disso seria possível!

Agradeço, também, à FAPES pelo apoio financeiro.

NINGUÉM VENCE SOZINHO... OBRIGADA A TODOS!

“ É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”
Martin Luther King

RESUMO

VICENTINI, A. R. **Prospecção de inibidores da acetilcolinesterase em plantas da família Rubiaceae na Mata Atlântica**. 2017. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

O neurotransmissor acetilcolina e a enzima acetilcolinesterase são mediadores de fundamental importância na regulação de inúmeras funções fisiológicas relacionadas ao Sistema Nervoso Central e Periférico. Determinadas patologias animais estão estritamente relacionadas ao comprometimento da via colinésterásica, como: *miastenia gravis*, *botulismo* e *paralisia do carrapato*. Dessa maneira, apesar de ainda não terem cura, a estratégia farmacológica mais eficaz empregada consiste no uso de fármacos anticolinésterásicos para evitar a degradação da acetilcolina. Assim, esta pesquisa objetivou realizar um estudo integrado de caracterização química e avaliação farmacológica de espécies da família Rubiaceae coletadas, potencialmente úteis como fonte de fármacos anticolinésterásicos, por apresentarem em sua constituição compostos quimicamente ativos, segundo dados da literatura. Para isso, foram realizados dois protocolos de avaliação da atividade anticolinésterásica, pelo método de cromatografia em camada delgada e avaliação espectrofotométrica, além dos ensaios de prospecção fitoquímica dos extratos. Foram estudadas 25 espécies da família Rubiaceae, pertencentes a 8 gêneros distintos, que resultaram em 28 amostras. Para cada uma das espécies foram obtidos dois extratos de naturezas polares diferentes. Acerca da atividade anticolinésterásica, das amostras testadas, 5 apresentaram atividade considerada promissora segundo padrões de classificação da literatura para ambos os métodos testados, destas destacam-se: *Faramea campanella*, *Faramea martiana*, *Psychotria carthagenensis*, *Psychotria 1* e *Rudgea coronata Saint-hilaire*. Cada um dos gêneros ativos apresentou uma constituição química específica segundo resultados da avaliação fitoquímica.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Inibidores. Rubiaceae

ABSTRACT

VICENTINI, A. R. **Prospecção de inibidores da acetilcolinesterase em plantas da família Rubiaceae na Mata Atlântica**. 2017. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

The neurotransmitter acetylcholine and the enzyme acetylcholinesterase are mediators of fundamental importance in the regulation of innumerable physiological functions related to the Central and Peripheral Nervous System. Certain animal pathologies are strictly related to the involvement of the cholinergic pathway, such as myasthenia gravis, botulism and tick paralysis. Thus, although they have not yet been cured, the most effective pharmacological strategy employed is the use of anticholinesterase drugs to avoid the degradation of acetylcholine. Thus, this research aimed to conduct an integrated study of chemical characterization and pharmacological evaluation of collected Rubiaceae family species, potentially useful as a source of anticholinesterase drugs, as they present in their constitution chemically active compounds, according to literature data. Two protocols were used to evaluate the anticholinesterase activity, using the thin layer chromatography method and spectrophotometric evaluation, as well as the phytochemical prospection of the extracts. It was studied 25 species of the Rubiaceae family, belonging to 8 distinct genera, which resulted in 28 samples. For each of the species two extracts of different polar natures were obtained. Regarding the anticholinesterase activity of the tested samples, 5 presented promising activity according to literature classification standards for both tested methods, of which the following stand out: *Faramea campanella*, *Faramea martiana*, *Psychotria carthagenensis*, *Psychotria* sp. new 1^a and *Rudgea coronata Saint-hilaire*. Each of the active genera presented a specific chemical constitution according to the results of the phytochemical evaluation.

Key-words: Acetylcholinesterase. Inhibitors. Rubiaceae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da neurotransmissão colinérgica..	17
Figura 2. Estrutura da acetilcolina..	18
Figura 3. Estrutura tridimensional da enzima acetilcolinesterase..	19
Figura 4. Estrutura dos anticolinesterásicos utilizados na terapêutica.....	20
Figura 5. Estrutura dos anticolinesterásicos naturais.	21
Figura 6. Mecanismos de ação dos anticorpos Anti-AChR na Miastenia Gravis.	24
Figura 7. Bloqueio da transmissão de acetilcolina na fenda sináptica pela toxina botulínica	26
Figura 8. Subfamílias e tribos da família Rubiaceae.....	28
Figura 9. Distribuição dos principais constituintes nas três subfamílias: Ixoroideae (IXO), Cinchonoideae (CIN), Rubioideae (RUB)..	29
Figura 10. Compostos isolados no gênero <i>Faramea</i>	31
Figura 11. Compostos isolados a partir de <i>G. herbacea</i>	32
Figura 12. Compostos isolados a partir do gênero <i>Margaritopsis</i>	33
Figura 13. Compostos isolados a partir do gênero <i>Palicourea</i>	38
Figura 14. Alcalóides em plantas do gênero <i>Psychotria</i>	44
Figura 15. Números de compostos isolados de <i>Psychotria</i> sp. distribuídos em classes de metabólitos secundários entre 1974-2012.	45
Figura 16. Exemplos de outras classes de compostos isolados em plantas do gênero <i>Psychotria</i>	47
Figura 17. Compostos isolados a partir do gênero <i>Rudgea</i>	49
Figura 18. Compostos isolados a partir do gênero <i>Simira</i>	51
Figura 19. Reação da enzima acetilcolinesterase com o acetato de 1-naftila e a formação subsequente do diazônio de coloração púrpura..	54
Figura 20. Formação do ânion amarelo do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a tiocolina e o íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato.....	55
Figura 21. Espécies coletadas em campo.	58
Figura 22. Análise cromatográfica (CCD) dos extratos brutos hexânicos.....	64
Figura 23. Análise cromatográfica (CCD) dos extratos brutos metanólicos.....	65
Figura 24. A. Ensaio qualitativo de inibição da acetilcolinesterase: Extratos metanólicos.	67
Figura 25. Ensaio qualitativo de inibição da acetilcolinesterase: Extratos hexânicos	67
Figura 26. Avaliação quantitativa da atividade anticolinesterásica das amostras ativas (50- 400 µg/mL).....	70
Figura 27. Agrupamento dos tratamentos segundo o teste de scott knott.	73

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

Ach- Acetilcolina

AchE- Acetilcolinesterase

AchEI- Inibidores da Acetilcolinesterase

BT- Botulismo

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

EH- Extrato hexânico

EM-Extrato metanólico

FM- Fase móvel

JNM- Junção neuromuscular

LE- Líquido extrator

MG- Miastenia gravis

PC- Paralisia do carrapato

Rf- Fator de retenção

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP- Sistema Nervoso Periférico

UV- Radiação no ultravioleta

Vis- Radiação no visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Panorama químico representativo de compostos isolados de espécies do gênero <i>Faramea</i>	30
Tabela 2. Panorama químico representativo de compostos isolados de espécies do gênero <i>Margaritopsis</i>	32
Tabela 3. Panorama químico representativo de compostos isolados de espécies do gênero <i>Palicourea</i>	34
Tabela 4. Panorama químico representativo dos alcalóides isolados de espécies do gênero <i>Psychotria</i>	40
Tabela 5. Exemplos de substâncias pertencentes a outras classes de metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Psychotria</i>	45
Tabela 6. Panorama químico representativo de compostos isolados de espécies do gênero <i>Rudgea</i>	47
Tabela 7. Panorama químico representativo de compostos isolados de espécies do gênero <i>Simira</i>	50
Tabela 8. Espécies obtidas em coleta.....	57
Tabela 9. Rendimento dos extratos obtidos a partir da etapa de extração pelo método 3.59	
Tabela 10. Principais sistemas eluentes utilizados na etapa de otimização de fase móvel destinada à análise dos extratos n-hexânicos por Cromatografia em Camada Delgada...60	
Tabela 11. Principais sistemas eluentes utilizados na etapa de otimização de fase móvel destinada à análise dos extratos metanólicos por Cromatografia em Camada Delgada...60	
Tabela 12. Ordem de aplicação das amostras para todos os ensaios feitos em placas de sílica.....	61
Tabela 13. Compostos de metabólitos secundários presentes de forma majoritária em cada espécie.....	63
Tabela 14. Resultados dos ensaios de AChEI para os métodos qualitativo e quantitativo.	68
Tabela 15. Comparação de médias dos extratos metanólicos (400µg/mL) segundo o teste de scott knott, média da porcentagem de inibição e desvio padrão.	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 Via colinesterásica na junção neuromuscular (JNM)	16
2.1.1 Acetilcolinesterase	18
2.1.2 Inibidores da acetilcolinesterase	19
2.2 Implicações terapêuticas na área da saúde animal.....	22
2.2.1 <i>Miastenia Gravis</i>	23
2.2.2 <i>Botulismo e Paralisia do carrapato</i>	25
2.3 Família Rubiaceae.....	26
2.3.1 Constituintes químicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 Coleta do material vegetal.....	52
3.2 Preparação dos extratos vegetais	52
3.3 Prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos vegetais.....	53
3.4 Avaliação da atividade inibitória da acetilcolinesterase	54
3.5 Análise dos dados	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Coleta do material vegetal	57
4.2 Preparação dos extratos vegetais	59
4.3 Prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos vegetais.....	59
4.4 Avaliação da atividade inibitória da acetilcolinesterase	66
4.4.1 Avaliação da atividade inibitória da acetilcolinesterase sobre os extratos ativos 70	
2.1 Análise de dados	71
3. CONCLUSÃO	74
4. REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE	89
1. Análise estatística dos dados de inibição.	89

1. INTRODUÇÃO

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor responsável pelo envio de sinais do Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP), amplamente envolvida com funções cognitivas como a modulação do sono, estado de vigília, aprendizado e memória. Além disso, atua também controlando atividades primordiais dos mecanismos que não estão sob consciência, como a circulação, a temperatura corporal, a digestão, a sudorese e o metabolismo, por exemplo (JUNIOR, *et al*, 2004; GOLAN, 2009).

A ACh juntamente com toda sua via metabólica de síntese, degradação e atuação está envolvida direta ou indiretamente em diversas doenças, como: miastenia gravis, botulismo e paralisia do carrapato, além das que afetam os seres humanos, como a doença de Alzheimer e o Parkinson. Todas as doenças citadas possuem algum tipo de tratamento, porém sem a cura, restringindo a clínica à sintomatologia. Mesmo assim a terapêutica farmacológica não é ampla, tornando as opções de tratamento escassas (QUINN, *et al.*, 2005; JUEL & MASSEY, 2005; SATHASIVAM, 2011; ALMEIDA, 2011).

Dentro do contexto da busca por novos fármacos para o tratamento de doenças a bioprospecção a partir de produtos de origem natural ganha destaque. O Brasil é um dos países com maior riqueza de espécies de plantas no mundo, representando um arsenal de substâncias químicas potencialmente ativas. Dentro deste vasto ecossistema encontram-se as plantas da família Rubiaceae Juss., uma das maiores dentro das angiospermas. No Brasil existem cerca de 120 gêneros e 1.400 espécies já descritas (Flora do Brasil 2020, 2017).

Sob o ponto de vista farmacológico e econômico a família Rubiaceae apresenta várias espécies de interesse como, por exemplo: A *Coffea arabica* L. planta de grande importância cultural e medicinal, possui como principal constituinte químico a cafeína, utilizada em várias formulações farmacêuticas, com propriedades estimulante do sistema nervoso central, vasoconstritora, broncodilatadora e diurética. A *Cephaelis ipecacuanha* Rich. amplamente utilizada como emético, anti-helmíntico e expectorante, propriedades que estão relacionadas com a presença do alcaloide emetina. Os variados ativos vegetais pertencentes à espécie *Uncaria tomentosa* (Willd) DC.. que no ano de 1977, foram responsáveis pela introdução de mais de 50 produtos no mercado farmacêutico nos Estados Unidos. Muitas espécies de plantas da família Rubiaceae apresentam substâncias químicas de grande potencial farmacológico, visto isso, a busca por novos

compostos com atividades biológicas nessa família vem sendo cada vez mais explorada (SIMÕES, *et al.*, 2001; MORS, *et al.*, 1995; LEMAIRE, *et al.*, 1999).

Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa foi realizar uma caracterização químico-farmacológica de espécies vegetais de Rubiaceae da região de Mata Atlântica, coletadas na reserva florestal de Mata das flores, município de Castelo, ES, a fim de encontrar novas moléculas bioativas úteis ao tratamento das doenças que envolvem a via colinesterásica.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Via colinesterásica na junção neuromuscular (JNM)

A acetilcolina (ACh) é um mediador químico que se encontra em todo o cérebro, responsável pelo envio de sinais no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP) e nas junções neuromusculares (JNM). Faz parte do sistema parassimpático, associado ao controle motor, à cognição (modulação do sono, estado de vigília, aprendizado e memória), na contração da musculatura lisa, dilatação dos vasos sanguíneos e ainda regulação dos batimentos cardíacos, digestão, sudorese e o metabolismo (JUNIOR, *et al*, 2004; GOLAN, 2009).

A ACh é sintetizada no citoplasma da célula pela enzima colina acetiltransferase (ChTA) a partir dos substratos colina e acetilcoenzima A, esta enzima catalisa a transferência do grupo acetil provinda da acetil-CoA para a molécula de colina. A maior parte da ACh, após ser sintetizada, é armazenada e transportada em vesículas sinápticas, sendo seu transporte dentro da vesícula mediado por uma ATPase que bombeia prótons para dentro da vesícula. A medida que ocorre a captação de ACh, esses prótons são bombeados para fora através de um canal co-transportador de ACh/H⁺. Para que ocorra liberação da ACh na fenda sináptica é necessário que haja estímulo pré-sináptico, no qual implicará em um potencial de ação que faz com que os canais de Ca²⁺ se abram aumentando seu influxo para o neurônio. Com as concentrações de Ca²⁺ altas no neurônio as vesículas contendo ACh se fundem na membrana plasmática, liberando a ACh na fenda sináptica (GOLAN, *et al*, 2014).

Após sua liberação na fenda sináptica a ACh se liga aos seus receptores pré e pós-sinápticos que são classificados como muscarínicos e nicotínicos. A ativação dos receptores muscarínicos no SNP tem ações que incluem a redução da frequência e força da contração cardíaca, o relaxamento de vasos sanguíneos periféricos e a constrição das vias respiratórias. No SNC, estão envolvidos em funções cognitivas como memória, aprendizado e atenção, em respostas emocionais, na modulação do estresse, no sono e na vigília. São cinco tipos de receptores muscarínicos, M1, M2, M3, M4, M5 que são acoplados à proteína G e que estão envolvidos com regulações enzimáticas e abertura de canais de K⁺. Já os receptores nicotínicos são canais iônicos permeáveis a cátions que regulam a liberação e a ativação de neurotransmissores nas regiões pré- e pós-

sinápticas, podendo controlar a eficácia da transmissão sináptica. Os receptores N1, N3 e N5, juntamente com os receptores nicotínicos pós-sinápticos, são receptores excitatórios, que irão causar a despolarização celular. Os receptores N2 e N4 são inibitórios, que causarão a hiperpolarização da célula. Os receptores pré-sinápticos nicotínicos permitem a entrada de Ca^{2+} para o neurônio, fazendo com que a fusão das vesículas contendo ACh aumente, conseqüentemente aumentando sua liberação na fenda sináptica. Entretanto, os receptores N2 e N4 pré-sinápticos impedem a entrada de Ca^{2+} no neurônio, diminuindo a fusão das vesículas na membrana e, conseqüentemente, diminuindo sua liberação na fenda sináptica (GOLAN, *et al*, 2014; VENTRURA, *et al*, 2010).

Paralelamente, a ACh na JNM não ligada a receptores é metabolizada em colina e acetato, através da ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) que está ancorada dentro da fenda sináptica, possui como principal papel fisiológico a interrupção da transmissão do impulso nervoso através da hidrólise da ACh (SILMAN & SUSSMAN, 2005).

Todo o processo de transmissão sináptica da ACh (figura 1) já descrito ocorre dentro de milésimos de segundo exigindo da enzima AChE uma interação precisa com o substrato, para que o impulso não se propague mais do que o devido, sendo AChE uma das principais enzimas de regulação da atividade e permanência da acetilcolina na fenda sináptica (ALDUNATE, 2004; VENTURA, 2010).

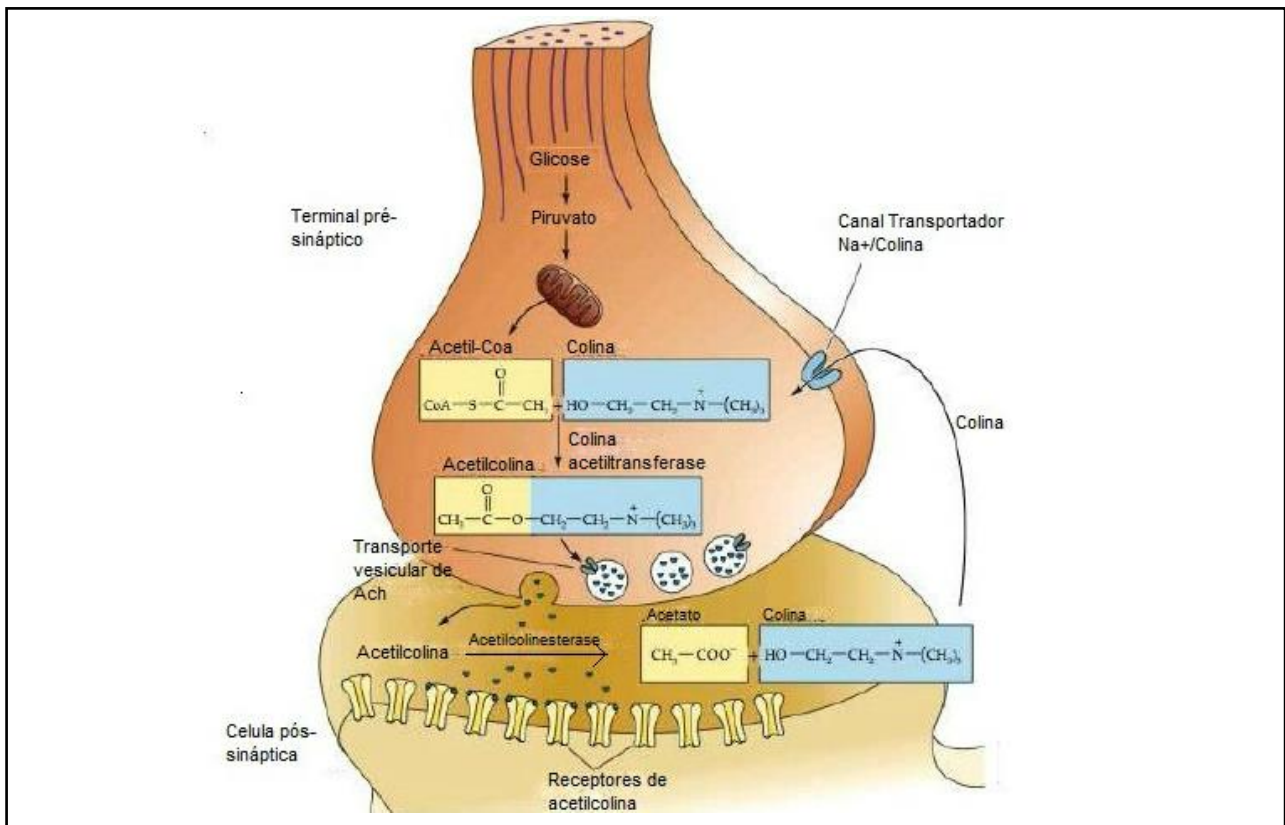


Figura 1. Esquema representativo da neurotransmissão colinérgica. FONTE: PURVES & WILLIAMS, 2001, com modificações.

2.1.1 Acetilcolinesterase

A AChE possui cerca de 320.000 dalton possui dois tipos de cadeias polipeptídicas ($\alpha 2\beta 2$), é uma enzima éster hidrolase que possui alta afinidade pela acetilcolina (figura 2) (GRINGAUZ, 1997).

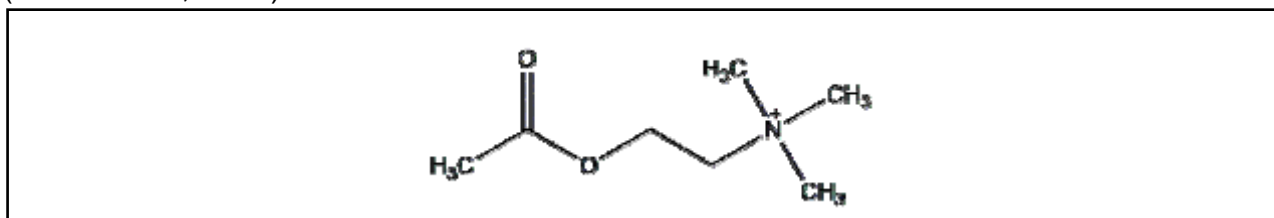


Figura 2. Estrutura da acetilcolina. FONTE: GRINGAUZ, 1997.

A atividade dessa enzima é dada por duas regiões principais, o chamado sítio ativo e o sítio periférico de ligação de colina, assim designado por estar distante (14 angstrom) do sítio ativo principal (figura 3). O sítio ativo da AChE é composto por uma tríade catalítica constituída dos aminoácidos serina, histidina e glutamato (Serina-200, Histidina-440 e Glutamato-327) que hidrolisa a molécula de ACh através de um ataque nucleofílico da serina da enzima ao carbono carbonílico da ACh, formando um intermediário que é estabilizado por ligações de hidrogênio, produzindo assim a colina livre e uma serina acetilada. A colina formada a partir da metabolização da ACh é reabsorvida pela membrana pré-sináptica e reutilizada para a síntese de novas moléculas de acetilcolina, este sítio se encontra localizado na parte inferior da enzima, chamada de cavidade aromática, assim denominada por possuir mais de 50% de sua composição provinda de anéis aromáticos. A cavidade aromática possui resíduos aromáticos que ocupam cerca de 70% do espaço da cavidade contribuindo para os dois locais de ação da enzima, os aminoácidos Trp84 e Phe330 estão relacionados ao chamado sítio catalítico aniônico, próximo ao sítio ativo, já os aminoácidos Tirosina-70, Tirosina-121 e Triptofano-279 estão relacionados ao sítio ativo periférico aniônico (HAREL, *et al.*, 1993; JUNIOR, *et al.*, 2004; SILMAN & SUSSMAN, 2008).

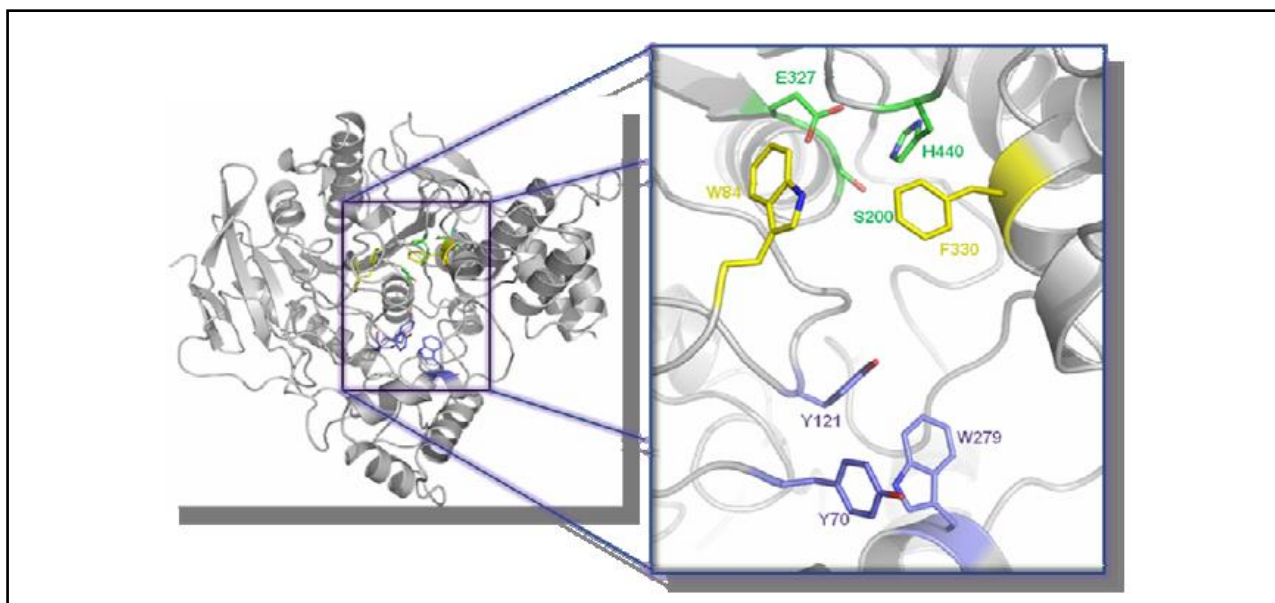


Figura 3. Estrutura tridimensional da enzima acetilcolinesterase. Em destaque o sítio ativo, incluindo a tríade catalítica (em verde), o sítio aniônico (amarelo) e o sítio periférico (azul). FONTE: SILMAN & SUSSMAN, 2008, adaptado de ALMEIDA, 2011.

A AChE é a enzima alvo para atuação de várias drogas terapêuticas, em particular para os fármacos utilizados para o tratamento de doenças que estejam ligadas a distúrbios colinérgicos como miastenia gravis, botulismo, paralisia do carrapato, doença de Alzheimer e o Parkinson.

2.1.2 Inibidores da acetilcolinesterase

Algumas doenças em animais que envolvem a disfunção da via colinérgica, como ocorre na miastenia gravis, botulismo e paralisia do carrapato, possuem como principal forma de tratamento o aumento da atividade do neurotransmissor acetilcolina, ocorrendo de uma forma similar em certas doenças humanas que envolvem a mesma via, como na doença de Alzheimer e Parkinson. Portanto, fármacos anticolinesterásicos podem ser utilizados para tratamento de ambas as enfermidades.

Segundo Shelton (2002), o tratamento em longo prazo como medida de suporte para a MG adquirida em cães consiste na administração de anticolinesterásicos de ação prolongada, como o brometo de piridostigmina (figura 4). Já para o botulismo e paralisia do carrapato encontra-se na literatura as citações dos agentes terapêuticos tetraetilamida e hidrocloreto de guanidina, os quais melhoram a liberação de neurotransmissores na JNM (QUINN, *et al.*, 2005).

Grande parte dos estudos relacionados a fármacos anticolinesterásicos estão envolvidos no tratamento da doença de Alzheimer. No momento apenas 4 fármacos são aprovados pela Food and Drug Administrations (FDA) nos Estados Unidos para uso terapêutico, são eles: tacrina (Cognex®), donepezil (Aricept®), rivastigmina (Exelon®) e a galantamina (Nivalin®) (figura 4) (ALMEIDA, 2011). Além desta limitação, outro entrave associado à terapêutica farmacológica diz respeito ao fato de os efeitos destes inibidores das colinesterases ocorrerem em uma janela terapêutica de apenas 30% a 60% de inibição da enzima. Some-isso aos graves efeitos colaterais frequentemente observados com uso destes fármacos, que são resultantes da hiperativação colinérgica periférica, como, i) efeitos adversos gastrintestinais: náuseas, vômitos, diarréia, anorexia, dispepsia, dor abdominal, hipersecreção ácida; ii) cardiovasculares: oscilação da pressão arterial, síncope, arritmia, bradicardia; iii) outros sintomas: tonturas, cefaléia, agitação, insônia, câimbras, sudorese, aumento da secreção brônquica e hepatotoxicidade (Magnie & Thomas, 1998).

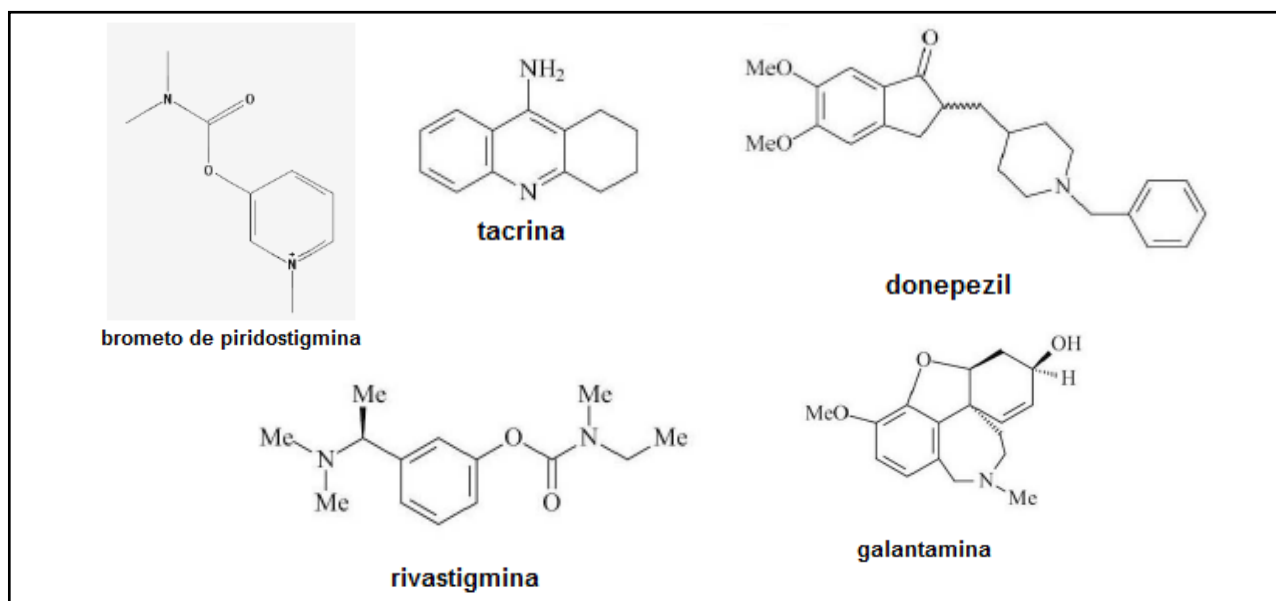


Figura 4. Estrutura dos anticolinesterásicos utilizados na terapêutica. FONTE: ALMEIDA, 2011; PUBCHEM, 2016.

Uma fonte alternativa e importante de compostos com atividade anticolinesterásica são as variadas espécies do reino vegetal. A galantamina, é o composto ativo do primeiro medicamento de origem vegetal utilizado para o tratamento da doença de Alzheimer, consiste em um alcalóide que foi isolado originalmente na espécie *Galanthus nivalis* L. (Amaryllidaceae), espécie ocorrente principalmente na Europa (HEINRICH & TEOH, 2004).

Na medicina tradicional chinesa é utilizada a espécie *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis (Lycopodiaceae) para problemas de memória. Desta planta foi isolado a alcalóide

huperzina A (figura 5), que se mostrou efetivo contra a atividade da acetilcolinesterase, possuindo um índice terapêutico superior ao da tacrina e fisostigmina, sugerindo ainda um efeito neuroprotetor em paciente com doença de Alzheimer (HOWES & HOUGHTON, 2003; ZANGARA, 2003; LIANG & TANG, 2004).

Na Nigéria a perda de memória é tratada com as espécies vegetais *Crinum jagus* J. Thompson (Amaryllidaceae) e *Crinum glaucum* A. Chew. (Amaryllidaceae), das quais são isolados os alcalóides hamaina e licorina (figura 5), substâncias que possuem efeito anticolinesterásico (HOUGHTON, *et al.*, 2004).

Da espécie *Tabernaemontana australis* Müll. Arg. (Apocynaceae), distribuída pela região da Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, puderam ser isolados sete alcalóides indólicos com atividade anticolinesterásica: coronaridina, voacangina, rupicolina, ibogamina, ibogalina, voacalotina e afinisina (figura 5), destes, os cinco primeiros demonstraram atividade em concentrações iguais aos dos padrões testados: fisostigmina e galantamina (0,01mM) (ANDRADE, *et al.*, 2005).

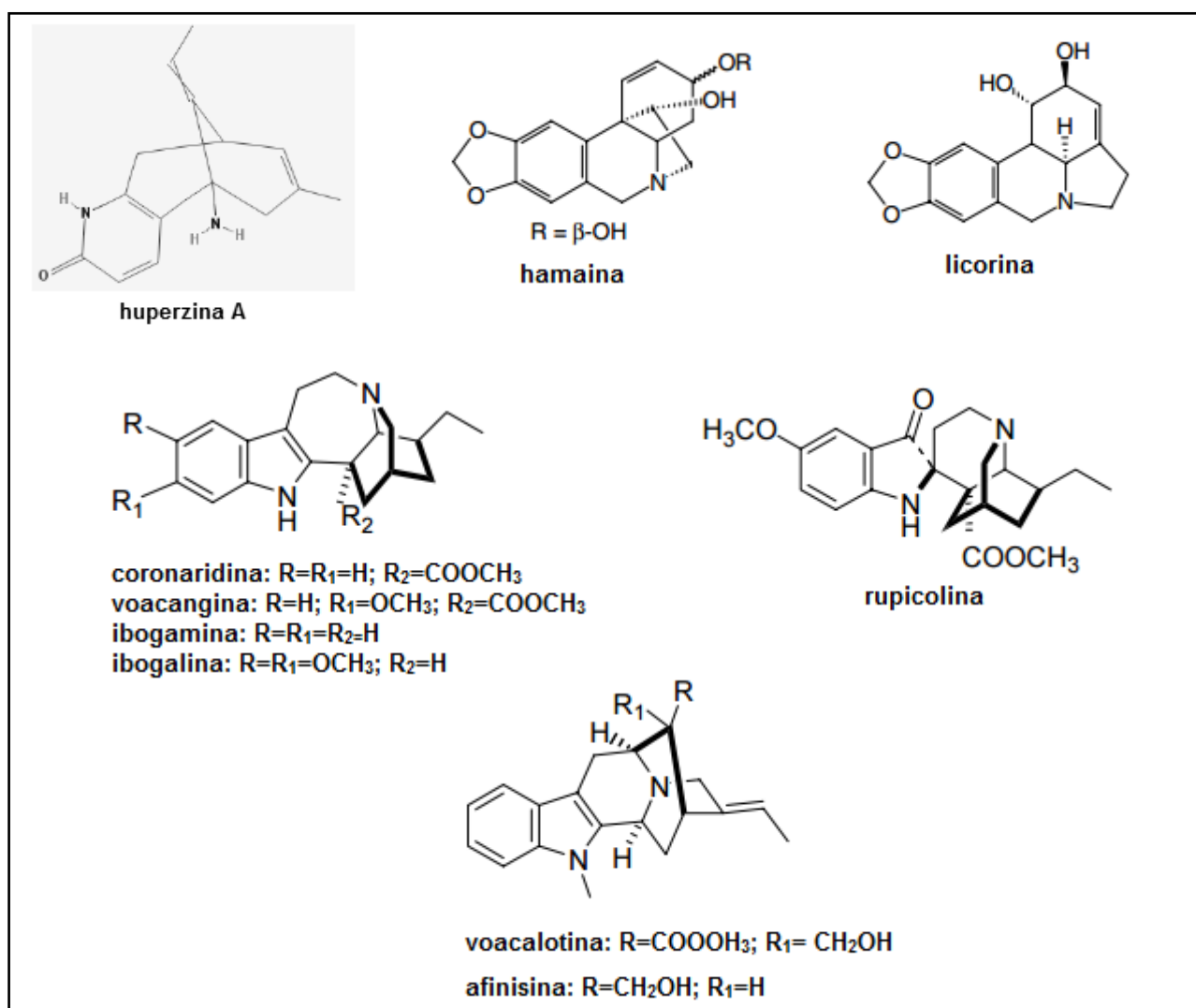


Figura 5. Estrutura dos anticolinesterásicos naturais.

Apesar da importância devida a atividade inibidora da acetilcolinesterase, as espécies citadas acima não são endêmicas do Brasil, os estudos com espécies nativas vem crescendo nos últimos anos e tem demonstrado resultados acerca da atividade inibidora da acetilcolinesterase importantes, porém, visto seu rico bioma em espécies vegetais, que representam um vasto arsenal de substâncias químicas potencialmente ativas, a pesquisa por novas moléculas com atividade anticolinesterásica ainda é escasso.

2.2 Implicações terapêuticas na área da saúde animal

O sistema nervoso (SN) dos animais, assim como no dos humanos, desempenha principalmente três funções básicas: a sensorial, na qual são processadas as informações que chegam ao SN, somática, que organiza as funções motoras e as funções corticais que processam as tomadas de decisões. Este sistema complexo possui neurônios e interneurônios que são responsáveis por conectarem todo o sistema e transmitir as informações que são responsáveis pelo desencadear dos processos mais avançados do SN. Neste contexto, a acetilcolina é um importante neurotransmissor que é encontrado em todos os animais, sendo o principal encontrado nas junções neuromusculares de vertebrados (GUERRA, *et al.*, 2010; MOYES & SCHULTE, 2010).

Nos animais ocorre a interação do SN com o ambiente, essa interação permite que estes consigam analisar o meio em que se encontram, produzir uma resposta para essa condição ou até mesmo aprender e memorizar esse ambiente (GUERRA, *et al.*, 2010).

Essas informações são transmitidas pelo sistema nervoso central (SNC) na forma de potenciais de ação ou os também chamados impulsos nervosos. A maioria dessa transmissão de sinais é dada por mediadores químicos, como os neurotransmissores. Destes destaca-se a acetilcolina, transmissor de ação aguda do SNC, esta por sua vez quando liberada pode excitar, inibir ou apenas sensibilizar um neurônio pós-sináptico (GUERRA, *et al.*, 2010).

Os animais necessitam analisar o ambiente em que se encontram constantemente, para que dessa forma possam perceber alterações e responder a elas. Os nervos sensoriais são os responsáveis por detectar essas alterações e os neurotransmissores responsáveis por levar a informação ao SNC e permitir com que o animal a entenda. Porém, nem toda a informação que é captada é processada, grande parte delas é filtrada para que não exceda o SNC, facilitando assim o seu processamento. O sistema sensorial

permite que o animal perceba sentidos de dor, de tato, audição, olfato, que sejam capazes de detectar sinais químicos como feromônios e percepção visual (GUERRA, *et al.*, 2010).

No contexto motor, de uma maneira geral, os animais podem se movimentar de três formas: ameboide, ciliar ou muscular. Cada um dos músculos é innervado por um neurônio dito motor que é derivado da medula espinhal. Sinapses colinérgicas formam nesses locais, junções neuromusculares, que promovem a geração dos potenciais de ação com a liberação de acetilcolina, a estimulação por esse neurotransmissor no músculo promove a contração muscular (GUERRA, *et al.*, 2010).

Ainda, a liberação de neurotransmissores no SNC interfere nas funções integrativas dos animais. O aprendizado, é conseguido quando o animal muda de comportamento baseado em experiências vividas. O aprendizado nos animais depende da plasticidade e da formação de novos neurônios. Estes possuem a capacidade de entender um estímulo que não é importante e ignorá-lo ou a responder de maneira gradual a um estímulo repetido (GUERRA, *et al.*, 2010).

A memória é também uma habilidade dos animais em resgatar informações, sendo extremamente importante para o aprendizado. A memória está relacionada com mudanças no padrão de atividade e conexão dos neurônios (GUERRA, *et al.*, 2010).

A cognição é uma função neural superior e complexa nos animais. Está relacionada a adaptação do animal em um ambiente, onde ele associa percepções do meio e memoriza elementos deste, como comida, amigos e inimigos e etc. A cognição envolve a memória sobre o espaço e a ocorrência de eventos nele (GUERRA, *et al.*, 2010).

Existem algumas doenças que afetam diretamente a via colinérgica nos animais, causando sérias consequências, exemplos dessas patologias são: Miastenia Gravis, Botulismo e Paralisia do carrapato.

2.2.1 *Miastenia Gravis*

A miastenia gravis é uma doença autoimune, sem causa bem definida. Sabe-se que nela ocorre a redução do número de receptores funcionais de acetilcolina na junção neuromuscular (DEWEY, *et al.*, 1997; BATMAZ, *et al.*, 1998). Muitos dos receptores sofrem degeneração pela ativação da via do complemento ou mesmo por ficarem ligados aos anticorpos (BREAZILE, 1996).

O principal sinal clínico da doença é a fraqueza muscular, que se agrava com o exercício e melhora com o repouso. Podem haver ainda perda da musculatura facial, dificuldade de deglutição e pneumonia por aspiração (MARTINS, 2013).

Como o número de receptores para acetilcolina é diminuído na MG a reação desse neurotransmissor com seus ligantes musculares fica significativamente reduzida (KORNEGAY & LORENZ, 2006), portanto o potencial de ação na placa motora não é forte o suficiente para estimular uma fibra muscular, resultando, portanto, em fraqueza muscular grave (VLEET, 2002; KORNEGAY & LORENZ, 2006). Estas alterações resultam em uma membrana pós-sináptica com uma estrutura mais simples (figura 6).

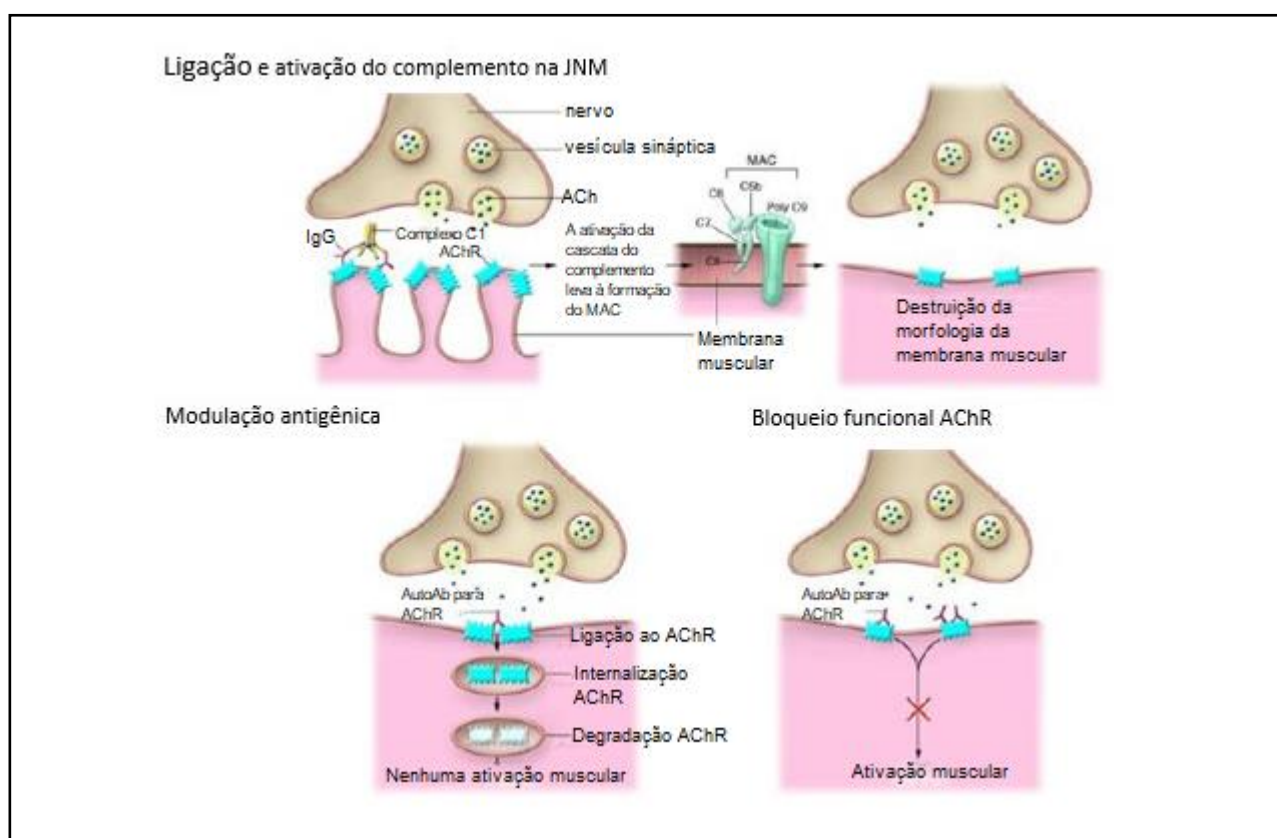


Figura 6. Mecanismos de ação dos anticorpos Anti-AChR na Miastenia Gravis. ACh- Acetilcolina; AChR- Receptor de acetilcolina; AutoAb- auto-anticorpos; IgG- Imunoglobulina G; MAC- complexo de ataque a membrana; NMJ- Junção neuromuscular. FONTE: CONTI-FINE, *et al.*, 2006, com modificações.

Rotineiramente a miastenia gravis em cães é confundida com outras doenças neurodegenerativas que apresentam paralisia flácida como principal sinal clínico (como a ação de hemoparasitas, toxoplasmose, neosporose e botulismo), portanto, como forma de obtenção de diagnóstico conclusivo para tal doença é realizado o seguinte procedimento: administração de sulfato de atropina, visando evitar possível existência de uma crise de excesso colinérgico (0,022 mg.kg⁻¹, via subcutânea), e após 10 minutos, infusão endovenosa de 20 µg.kg⁻¹ de anticolinesterásico (metilsulfato de neostigmina). Em caso

de melhora rápida no quadro de paresia em resposta à administração do anticolinesterásico, é confirmado o diagnóstico terapêutico e definitivo de miastenia gravis adquirida (GADÊLHA, *et al.*, 2015; NELSON & COUTO, 2010).

De fato, os anticolinesterásicos não influenciam no curso do processo patológico da miastenia gravis, eles apenas melhoram os sintomas da doença promovendo o aumento da força muscular, mesmo assim são considerados como primeira linha no tratamento sintomático (JUEL & MASSEY, 2005; SATHASIVAM, 2011).

2.2.2 Botulismo

O botulismo é causado por uma toxina secretada pelo *Clostridium botulinum*, geralmente os animais a adquirem por consumirem alimentos em degradação. O *C. botulinum* é um bacilo gram-negativo anaeróbico obrigatório, forma endósporos e é vastamente encontrado no solo ou na água (TORTORA, *et al.*, 2003).

A toxina botulínica é considerada uma neurotoxina, pois após ser absorvida no trato gastrointestinal age diretamente sobre a JNM colinérgica e nas junções periféricas, sendo a mais potente toxina biológica conhecida. Em todas as espécies, os sintomas da doença são os mesmos, levando cerca de sete a quatorze dias para iniciarem. É comum o animal apresentar pupilas dilatadas, mucosas secas, flacidez na língua e disfagia. Ainda pode haver falta de coordenação ao se movimentar seguida por paralisia flácida e decúbito. Os sinais de paralisia ou ainda falta de reflexos são causados pela diminuição da liberação de acetilcolina nas JNM pelas alterações pré-sinápticas causadas (QUINN, *et al.*, 2005; TAYLOR, 2010).

A neurotoxina botulínica age principalmente impedindo o impulso nervoso para o músculo, ela se liga aos receptores de membrana pré-sinápticos e mediada por eles entra na célula por endocitose onde essas vesículas de toxinas permanecem, esse processo interfere diretamente sobre a liberação da acetilcolina na fenda sináptica, culminando na falha do impulso nervoso (figura 7) (SARAIIVA, 1984; HIRSH & ZEE, 2003; CHRISMAN, *et al.*, 2005).

Quando acometidos pelo botulismo, os animais respondem negativamente ao teste ambulatorial do metilsulfato de neostigmina, sendo este um teste diferencial entre botulismo e miastenia gravis (GADÊLHA, *et al.*, 2015).

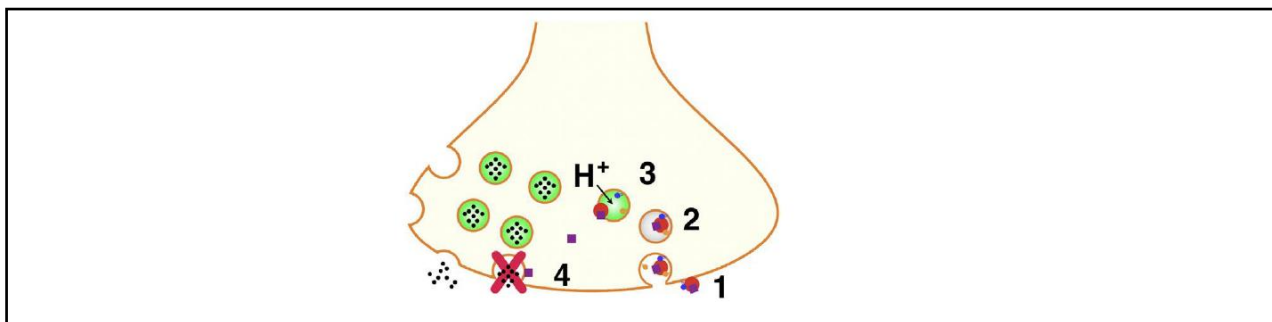


Figura 7. Bloqueio da transmissão de acetilcolina na fenda sináptica pela toxina botulínica. FONTE: ROSSETTO, *et al.*, 2013.

Infelizmente, não existe um tratamento para o botulismo, o que é feito na prática é o tratamento com medidas de suporte. Pode-se utilizar uma antitoxina específica, porém, para exercer seu efeito protetor ela deve alcançar a toxina antes dela se ligar os receptores de membrana (TAYLOR, 2010; TORTORA, 2003).

2.2.3 Paralisia do carrapato

De maneira semelhante ao botulismo, na paralisia do carrapato também ocorre o bloqueio da liberação de acetilcolina na JNM. Os carrapatos dos gêneros *Ixodes* e *Dermacentor* liberam uma toxina durante sua alimentação com sangue que ao ser absorvida causa prejuízos na transmissão do impulso neuromuscular ou na despolarização dos neurônios. O principal sintoma é a paralisia flácida (CHRISMAN, 2005).

Para diagnóstico da doença do carrapato, usualmente é realizado o teste de Coombs, que em caso positivo deve ser reagente e verificado a ixodidiose (GADÊLHA, *et al.*, 2015).

As medidas de suporte adotadas como tratamento medicamentoso para o botulismo e paralisia do carrapato é a utilização dos agentes terapêuticos tetraetilamida e hidrocloreto de guanidina, os quais melhoram a liberação de neurotransmissores na JNM (QUINN, *et al.*, 2005).

2.3 Família Rubiaceae

A busca por novos fármacos para o tratamento de doenças pode ser feita através de inúmeras estratégias, tendo destaque a bioprospecção a partir de produtos de origem

natural. De fato, sabe-se que pelo menos 70% dos fármacos disponíveis comercialmente foram originados direta ou indiretamente a partir de fontes naturais. Porém, dentre as milhões de espécies estimadas no planeta, somente uma pequena porcentagem foi investigada química ou biologicamente (MYERS, 2000; NEWMAN & CRAGG, 2007).

A diversidade de plantas no Brasil é uma das mais ricas do mundo, nela encontram-se cinco principais biomas: o Cerrado, Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Caatinga e o Pampa, estes diferentes biomas detêm uma vasta gama de espécies animais de microrganismos e de vegetais. Neste momento, são reconhecidas 46.439 espécies para a flora brasileira, que compreendem grande parte da flora mundial já descrita (SANDES & BLASI, 2000; SANT'ANA & ASSAD, 2001; Flora do Brasil 2020, 2017).

Possuindo ampla distribuição dentro destes ecossistemas encontram-se as plantas da família Rubiaceae, uma das maiores dentro das angiospermas e da ordem a que pertence, Gentianales, esta família possui cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies tropicais (ROVA, *et al.*, 2002; STRUWE, 2002; BOLZANI, *et al.*, 2001). No Brasil encontram-se cerca de 120 gêneros e 1.400 espécies, destacando a importância econômica, social e ornamental desta família em nosso país (SOUZA & LORENZI, 2008).

Visto sua riqueza a família Rubiaceae foi dividida em quatro subfamílias de acordo com a classificação de Robbrecht em 1988, nela foram considerados parâmetros morfológicos, anatômicos e de placentação. As categorias estabelecidas foram: Ixoroideae, Cinchonoideae, Antirrhoideae e Rubioideae. No entanto, segundo esse mesmo autor, a classificação das subfamílias, tribos (uma classe intermediária entre subfamília e gênero), gêneros e espécies ainda era falha devido à falta de informações morfológicas-anatômicas e de estudos de constituição química deixando a classificação para muitas espécies prejudicada (BOLZANI, *et al.*, 2001).

Posteriormente foi sugerido que essa família fosse dividida em apenas três subfamílias. Estudos fitoquímicos aliados aos parâmetros citados por Robbrecht permitiram distingui-las pelos seus perfis químicos e morfológicos, expondo correlações específicas destes parâmetros para as subfamílias Ixoroideae, Cinchonoideae e Rubioideae. Já na subfamília Antirrhoideae não foi evidenciado um marcador químico característico. De acordo com essas relações as subfamílias foram agrupadas em 42 tribos (figura 8) (BOLZANI, *et al.*, 2001; BREMER, 2009). Essa última classificação foi utilizada por Delprete & Jardim em 2012 como a principal estrutura para a discussão dos grupos taxonômicos de Rubiaceae.

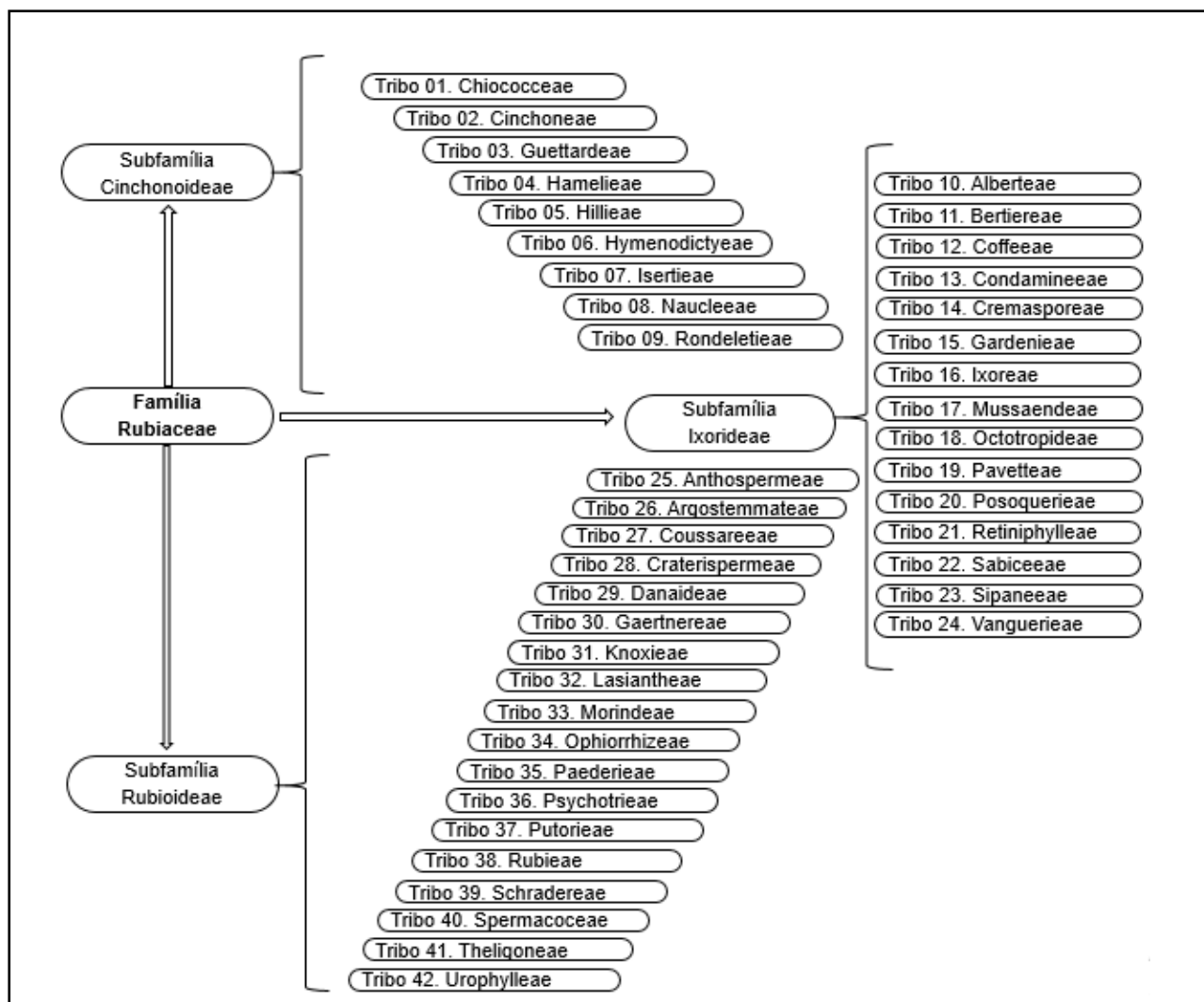


Figura 8. Subfamílias e tribos da família Rubiaceae. Fonte: adaptado de BREMER, 2009.

2.3.1 Constituintes químicos dos gêneros estudados

De uma maneira geral, a família Rubiaceae apresenta grande diversidade de substâncias (figura 9). O principal metabólito secundário considerado marcador químico das plantas da subfamília Ixoroideae são os iridóides, já para Cinchonoideae encontram-se predominantemente os alcaloides indólicos e em Rubioideae as antraquinonas (BOLZANI, *et al.*, 2001). Os iridóides glicosídicos são considerados metabólitos presentes em todas as subfamílias de Rubiaceae (HIROYUKI, *et al.*, 1988).

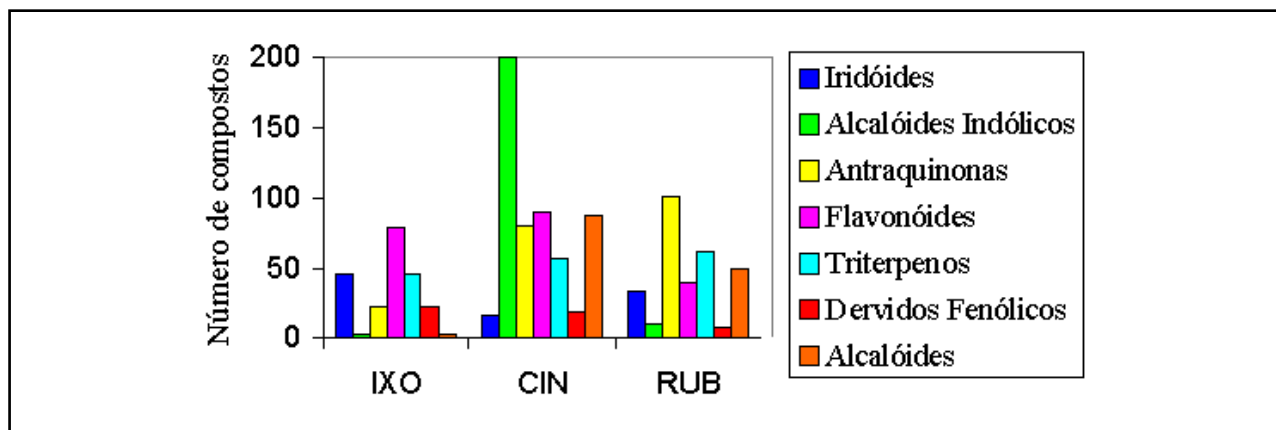


Figura 9. Distribuição dos principais constituintes nas três subfamílias: Ixoroideae (IXO), Cinchonoideae (CIN), Rubioideae (RUB). FONTE: BOLZANI, *et al.*, 2001.

Da família Rubiaceae já puderam ser identificadas e isoladas inúmeras substâncias das mais variadas classes de metabólitos secundários, possibilitando a obtenção de compostos de interesse comercial. Como exemplos destas substâncias podemos citar a cafeína obtida das espécies de *Coffea*, a emetina composto isolado de *Cephaelis ipecacuanha* utilizado largamente como antiemético e antiamebicida, a quinina extraída de *Cinchona ledgeriana* com atividade antimalárica e tônica, a quinidina e quinina de *Cinchona calisaya* que possuem atividade contra doenças infecciosas e parasitárias, os alcalóides de *Mitracarpus frigidus* com atividade leishmanicida, dentre outros (CORDEEL, *et al.*, 2001; SOUZA, *et al.*, 2013).

Das classes de metabólitos secundários encontrados em Rubiaceae ressaltam-se os alcalóides, que são importantes produtos desse metabolismo pelo seu valor farmacológico agregado sendo a fonte de várias moléculas bioativas já descritas. Até o ano de 2001, foi possível o isolamento de cerca de 680 alcalóides provindos do estudo de 181 espécies dessa família. As espécies de Rubiaceae produzem, até onde já é conhecido pela literatura, alcalóides pertencentes a mais de dez classes diferentes, onde se destacam os isoquinolínicos, quinolínicos e indólicos (CORDEEL, *et al.*, 2001).

Os perfis de distribuição de metabólitos secundários também podem ser agrupados de acordo com a ocorrência em seus devidos gêneros, como demonstrado a seguir.

2.3.1.1 Gênero *Alseis*

Trata-se de um gênero que possui hábitos arbóreos, com 11 espécies ocorrentes no Brasil, que se distribuem entre a Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, destas, apenas 5 são encontradas no domínio fitogeográfico da Mata Atlântica (Flora do Brasil 2020, 2017).

Apesar de existirem pesquisas acerca da anatomia botânica ou ainda estudos de atividade farmacológica em algumas espécies do gênero *Alseis* não foram encontrados dados nas bases de pesquisa utilizadas com relação a estudos de isolamento de compostos nesse gênero (TULLII, 2010; SLISH, 1999; 2004).

2.3.1.2 Gênero *Faramea*

Possui cerca de 90 espécies ocorrentes no Brasil, com hábitos arbustivo ou arbóreo, podem ser encontradas em varias regiões do país, desde o norte ao sul. No bioma da Mata Atlântica são encontras cerca de 50 espécies (Flora do Brasil 2020, 2017).

Os estudos de composição química nesse gênero ainda são escassos. Das espécies estudadas na literatura com avaliações desse porte podemos citar: *Faramea guianensis* (Aubl.) Bremek., *Faramea salicifolia* C.Presl. e *Faramea cyanea* Müll.Arg. (Tabela 1 e figura 10). Ainda pode-se destacar um estudo feito por Galardis, *et al.* (2014) que evidenciou que os principais compostos presentes em *Faramea occidentalis* (L.) A.Rich. eram alcalóides e cumarinas, porém sem isola-los.

Tabela 1. Panorama químico representativo de compostos isolados de espécies do gênero *Faramea*.

Espécie	Substância presente	Referência
<i>Faramea cyanea</i>	AN1; AN2; AN3; AN4; O1; O2; O3; O4.	FERRARI, <i>et al.</i> , 1985.
<i>Faramea guianensis</i>	F1; F2	SAUVAIN, <i>et al.</i> , 1994.
<i>Faramea salicifolia</i>	L1; CH1	ROSS, <i>et al.</i> , 1999.

*F= Flavonoide; AN= Antraquinona; L= Lignana; CH= Chalcona; O= outros.

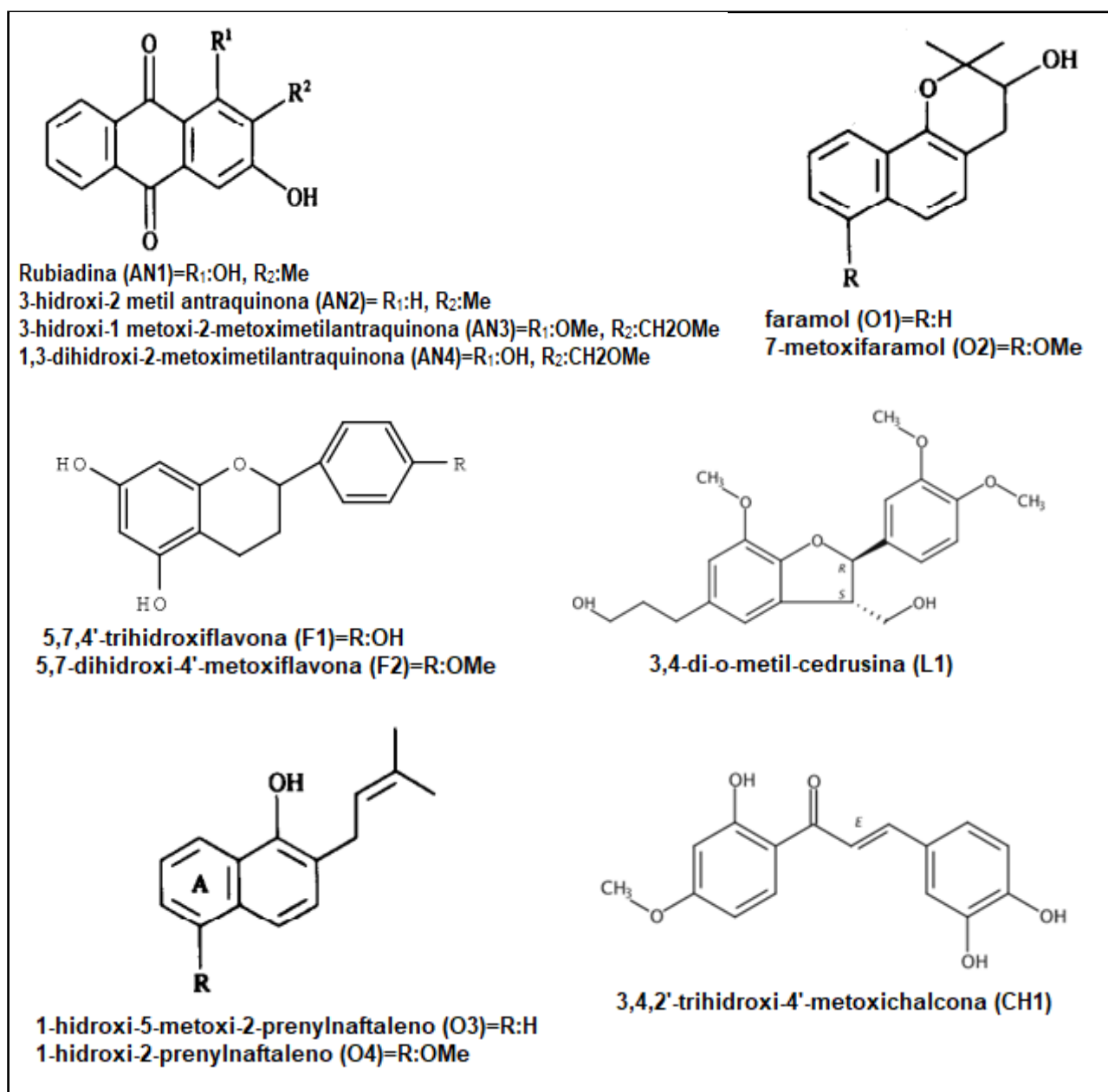


Figura 10. Compostos isolados no gênero *Faramaea*.

2.3.1.3 Gênero *Geophila*

Este gênero da família Rubiaceae é representado por 6 espécies no Brasil, distribuídas pelas regiões norte, nordeste, centro-oeste, sul e sudeste. No domínio fitogeográfico da Mata Atlântica apenas 2 são encontradas (Flora do Brasil 2020, 2017).

Existem poucos estudos acerca da constituição química das espécies desse gênero. Apenas um trabalho realizou o isolamento de substâncias a partir de espécies do gênero *Geophila*. Lou, *et al.*, (2011) avaliou em sua pesquisa a atividade hipoglicemiante na espécie *Geophila herbacea* (L.) Morong e evidenciou que essa ação estava

relacionada com a presença de um composto inédito (2- feniletil 2,6- dihidroxibenzoato) e três já conhecidos (benzil 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de metilo, friedelina e bergapteno) (figura 11).

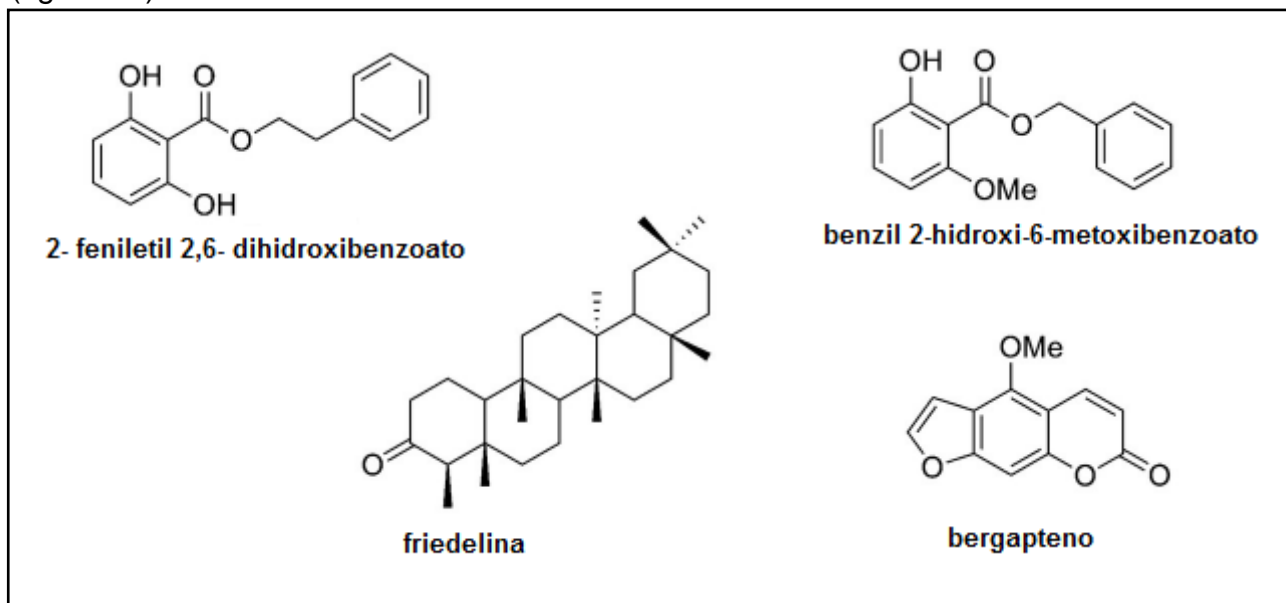


Figura 11. Compostos isolados a partir de *G. herbacea*.

2.3.1.4 Gênero *Margaritopsis*

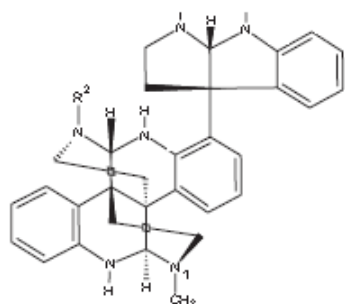
Consiste em um gênero relativamente pequeno, com 15 espécies ocorrentes em diversas regiões do Brasil e apenas 7 na Mata Atlântica, se caracterizam como arbustos ou pequenas árvores (Flora do Brasil 2020, 2017).

Acerca da constituição química deste gênero, duas espécies podem ser citadas: *Margaritopsis carrascoana* (Delprete & E.B.Souza) C.M. Taylor & E.B. Souza, o extrato de suas folhas apresentou forte atividade antioxidante e de inibição a enzima acetilcolinesterase (AChE), desta espécie puderam ser isolados dois novos alcalóides (A1 e A2) e dois já conhecidos (A3 e A4), alguns flavonoides (F1-F5) e uma neolignana (L1). De *Margaritopsis cymuligera* (Müll.Arg.) C.M. Taylor puderam ser isolados dois alcalóides pirrolidinoindólicos (A5 e A6) (Tabela 2 e figura 12) (NASCIMENTO, *et al.*, 2015 a,b; BRAND, *et al.*, 2012).

Tabela 2. Panorama químico representativo de compostos isolados de espécies do gênero *Margaritopsis*.

Espécie	Substância presente	Referência
<i>Margaritopsis carrascoana</i>	A1; A2; A3; A4; F1; F2; F3; F4; F5; L1	NASCIMENTO, <i>et al.</i> , 2015 a, b.
<i>Margaritopsis cymuligera</i>	A5; A6	BRAND, <i>et al.</i> , 2012.

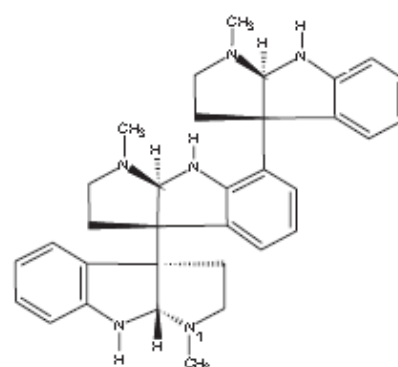
* A- alcalóide, F- flavonóide, L=lignana.



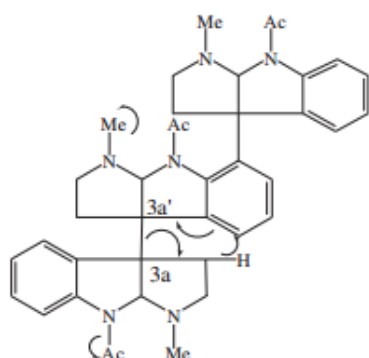
N-8''-formilcalicosidina (A1)=R₁:CHO, R₂:CH₃

N-8''-metil-N-1'-desmetilisocalicosidina (A2)=R₁:CH₃, R₂:H

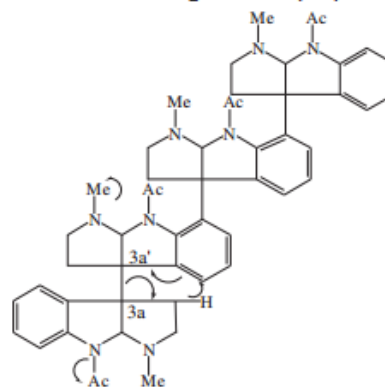
calicosidina (A3)= R₁:H, R₂:CH₃



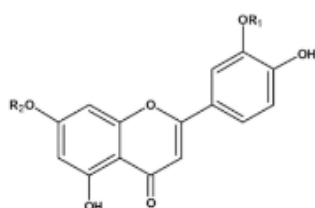
hodgkinsina (A4)



Na,Na',Na''-triacetil hodgkinsina (A5)



Na,Na',Na'',N'''-tetraacetil quadrigemina (A6)



R1	R2
F1 H	Rha 1-2Glu
F2 H	Api 1-6Glu
F3 OCH ₃	Api 1-6Glu
F4 H	Rha 1-2(Api 1-6) Glu
F5 H	Rha 1-2(Rha 1-6) Glu

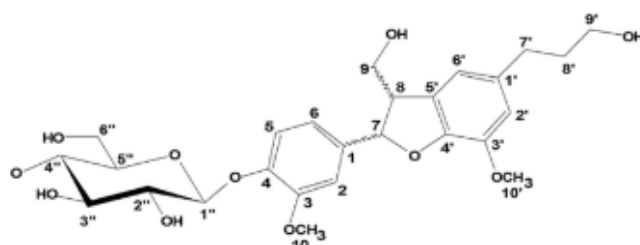
7-O-[[β-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosil] luteolina (F1)

7-O-[[β-D-glicopiranosil-(1→6)-β-D-apiofuranosil] luteolina (F2)

7-O-[[β-D-glicopiranosil-(1→6)-β-D-apiofuranosil] crisoeriol (F3)

7-O-[[β-D-apiofuranosil-(1→6)-[β-L-ramnopiranosil-(1→2)]-β-D-glicopiranosil] luteolina (F4)

7-O-[[α-L-ramnopiranosil-(1→6)-[β-L-ramnopiranosil-(1→2)]-β-D-glicopiranosil] luteolina (F5)



álcool 4-O-β-D-glicopiranosil-di-hidro-desidrodiconiferílico (L1)

Figura 12. Compostos isolados a partir do gênero *Margaritopsis*.

2.3.1.5 Gênero *Palicourea*

Este gênero da família Rubiaceae compreende 56 espécies ocorrentes no Brasil e 16 na Mata Atlântica. É representado por plantas de hábitos arbóreo ou arbustivo. No Brasil estão distribuídas do norte ao sul (Flora do Brasil 2020, 2017).

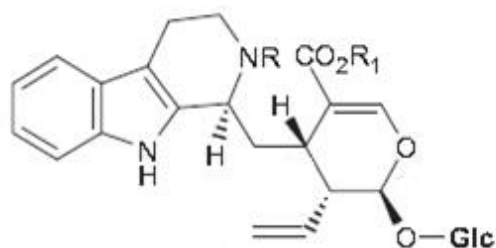
Apesar da notoriedade das características tóxicas relatadas para algumas espécies de *Palicourea*, muitas já possuem atividades biológicas importantes descritas na literatura. Como, por exemplo, a ação moluscicida de *P. nicotianaefolia* Cham. & Schltl., a inibição dos efeitos nocivos às células causada pelo vírus HIV de *P. condensata* Standl. e as atividades antioxidante e contra células de melanoma humano em *P. rígida* Kunth. As atividades citadas para espécies desse gênero estão relacionadas principalmente com a presença de alcalóides indólicos e quinolínicos (COELHO, *et al.*, 2007; MENDES, *et al.*, 1984; BOKESCH, *et al.*, 2001; GARCIA, *et al.*, 1997; ROSA, *et al.*, 2010; SOARES, *et al.*, 2012).

Um levantamento bibliográfico sobre os estudos de composição química das espécies do gênero *Palicourea* revelou uma diversidade de metabólitos secundários presentes, como demonstrado na tabela 3 e figura 13.

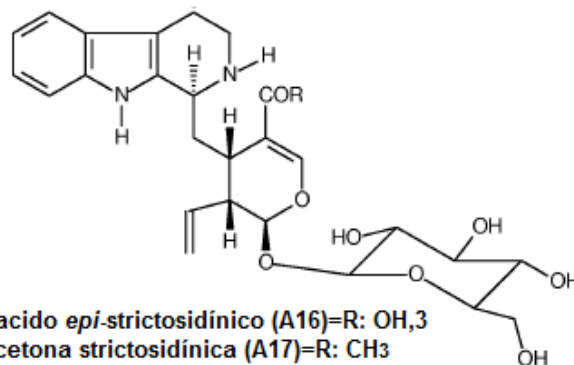
Tabela 3. Panorama químico representativo de compostos isolados de espécies do gênero *Palicourea*.

Espécie	Substância presente	Referência
<i>Palicourea acuminata</i>	A1; A2; A3; A4; A5; A6; A7; A8.	BERGER, <i>et al.</i> , 2012.
<i>Palicourea adusta</i>	A9; A10; A11; A12; A13; A14.	VALVERDE, <i>et al.</i> , 1999.
<i>Palicourea alpina</i>	A15.	WOO-MING, <i>et al.</i> , 1975.
<i>Palicourea condensata</i>	PPC1.	BOKESCH, <i>et al.</i> , 2001.
<i>Palicourea coriacea</i>	A16; A17; A15, A1; T1; E1; E2; E3; E4, A15; AN1; AC1; AC2; E5 e E6	NASCIMENTO, <i>et al.</i> , 2006; SILVA, <i>et al.</i> , 2008.
<i>Palicourea crocea</i>	A18; A19	DUESMAN, <i>et al.</i> , 2004;
<i>Palicourea demissa</i>	E1; E2; T2; C1; C2; C3; AC3; AC4; AC5.	EL-SEEDI, 1999.
<i>Palicourea fendleri</i>	A20; A15	NAKANO & MARTIN, 1976.
<i>Palicourea marcgravii</i>	A21; A22; AM1.	KEMMERLING, 1996; MORITA, <i>et al.</i> , 1989.
<i>Palicourea ovalis</i>	A15	GARCIA, <i>et al.</i> , 1997.
<i>Palicourea rígida</i>	T3, T4, T5, IR1, IR2; F1; F2; F3, A23.	ALVES, <i>et al.</i> , 2016; ROSA, <i>et al.</i> , 2010; SOARES, <i>et al.</i> , 2012.

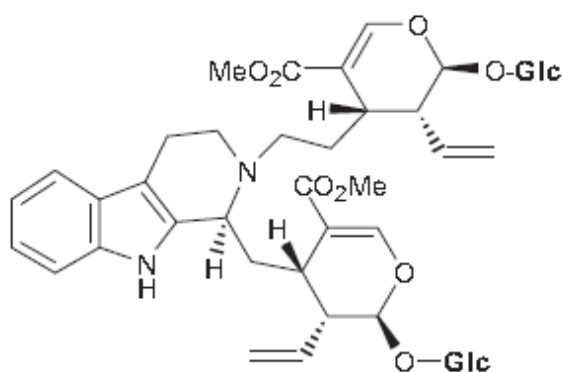
* A= alcalóide, PPC= peptídeo cíclico, T= terpeno, ES= éster, AN= antraquinona, AC=ácido carboxílico, E= esteroide, C=cumarinas, AM= amina, IR=iridóide, F=flavonóide.



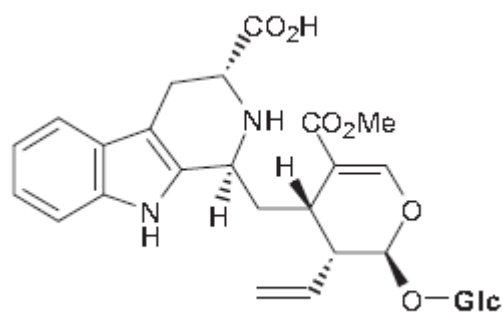
ácido estrictosidinico (A1)=R, R1: H
 estrictosidina (A2)=R: H, R1: Me
 palicoside (A3)=R: Me, R1: H



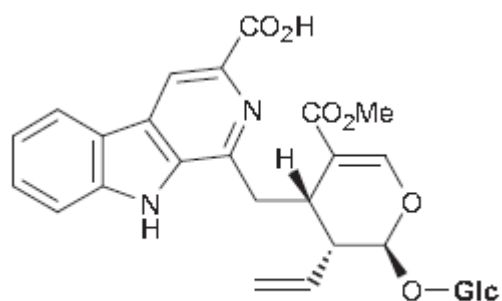
ácido *epi*-strictosidinico (A16)=R: OH,3
 cetona strictosidinica (A17)=R: CH3
 ácido estrictosidinico (A1)=R: OH



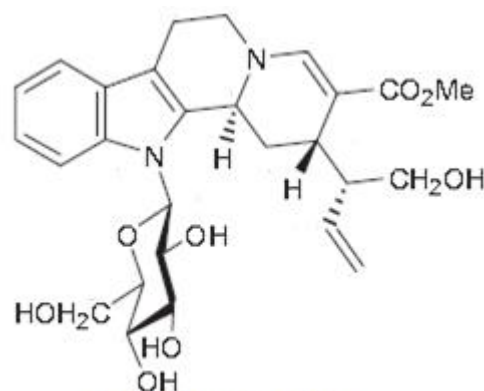
bahienoside B (A4)



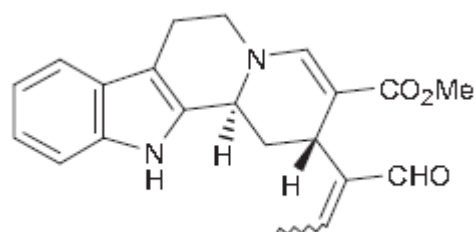
5α-carboxystrictosidina (A5)



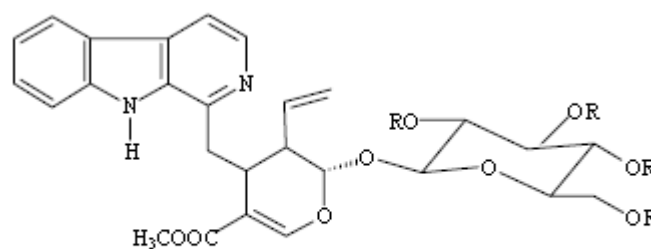
desoxycordifolina (A6)



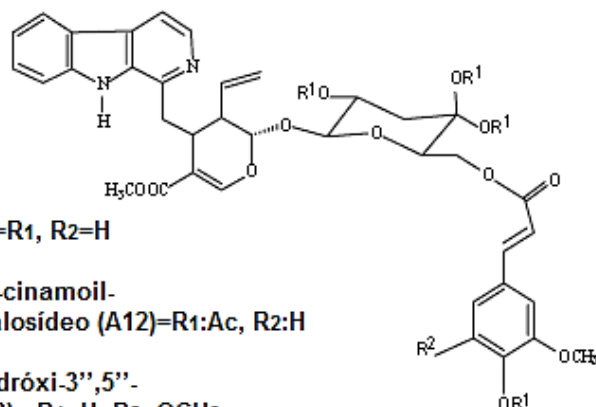
lagambosideo (A7)



vallesiachotamina (A8)



lialosideo (A9)= R:H
tetra-(O)-acetil-lialosideo (A10)= R:Ac

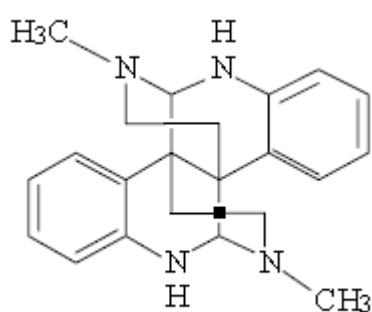


metoxi-lialosídeo (A11)=R1, R2=H

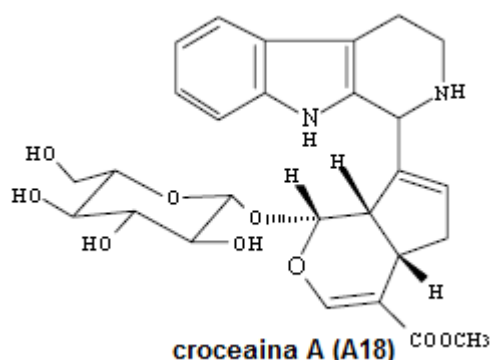
(E)-tetra-(O-acetil)-O-(6')-cinamoil-4''-hidróxi-3''-metoxi-lialosídeo (A12)=R1:Ac, R2:H

(E)-O-(6')-cinamoil-4''-hidróxi-3'',5''-dimetoxi-lialosídeo (A13)= R1: H, R2: OCH3

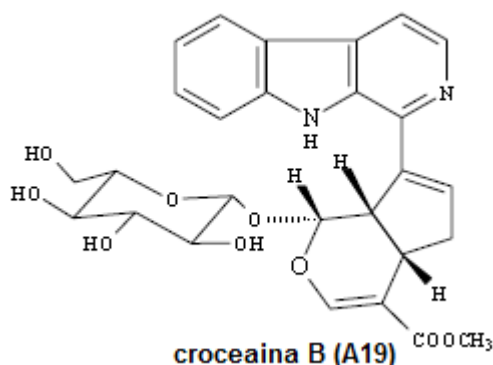
(E)-tetra-(O-acetil)-O-(6')-cinamoil- 4''-hidróxi-3'',5''-dimetoxi-lialosídeo (A14)= R1:Ac, R2: OCH3



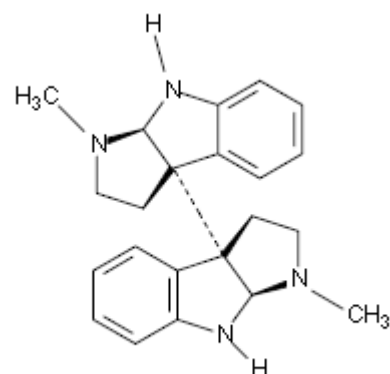
calicantina (A15)



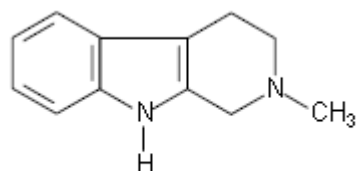
croceaina A (A18)



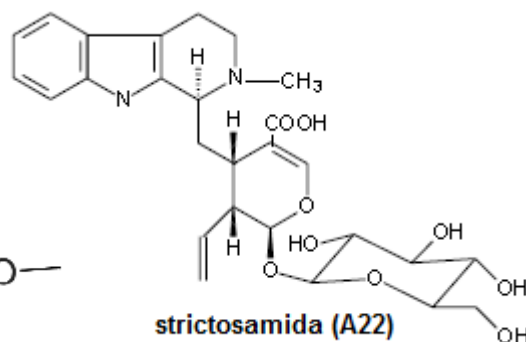
croceaina B (A19)



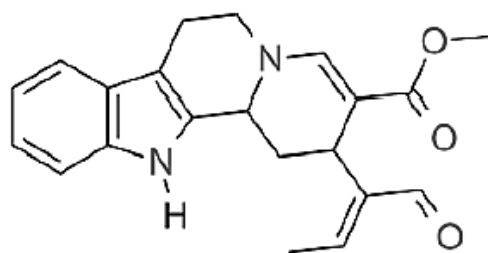
chimonantina (A20)



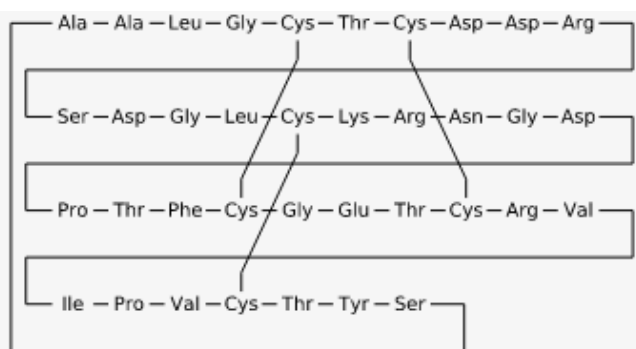
2-metiltetraidro-β-carbolina (A21)



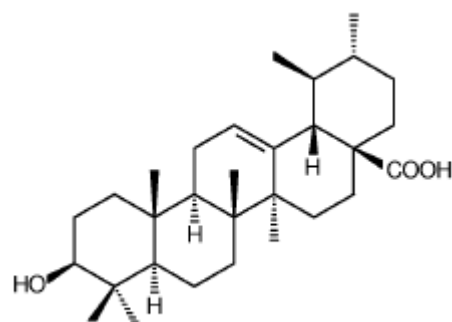
strictosamida (A22)



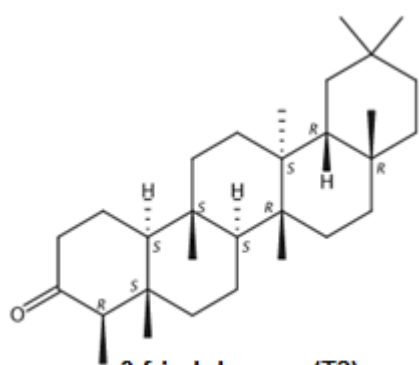
vallesiachotamina (A23)



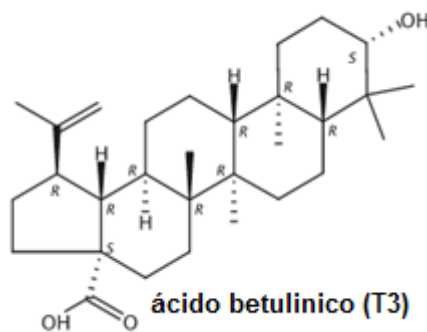
palicoureina (PPC1)



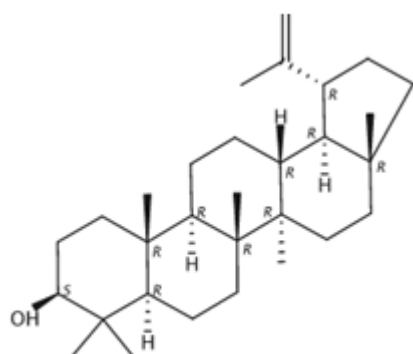
ácido ursólico (T1)



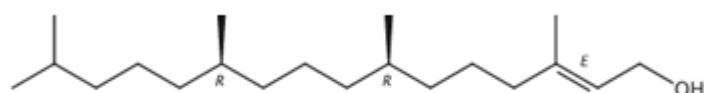
3-friedelanona (T2)



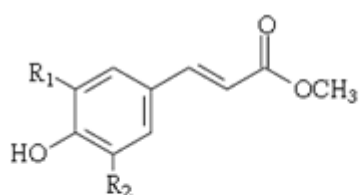
ácido betulínico (T3)



lupeol (T4)



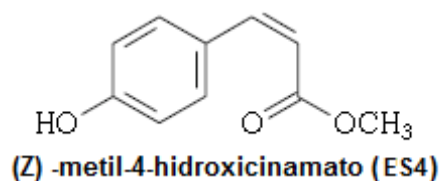
fitol (T5)



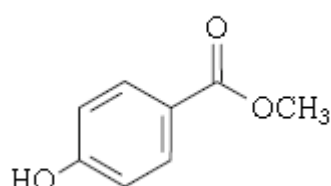
(E) -metil-4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato (ES1)=R1, R2: OCH3

(E) -metil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (ES2)=R1:H, R2: CH3

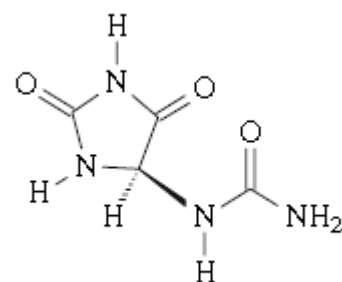
(E) -metil-4-Hidroxicinamato (ES3)=R1, R2: H



(Z) -metil-4-hidroxicinamato (ES4)



alantoína (ES6)



metil 4-hidroxi-benzoato(ES5)

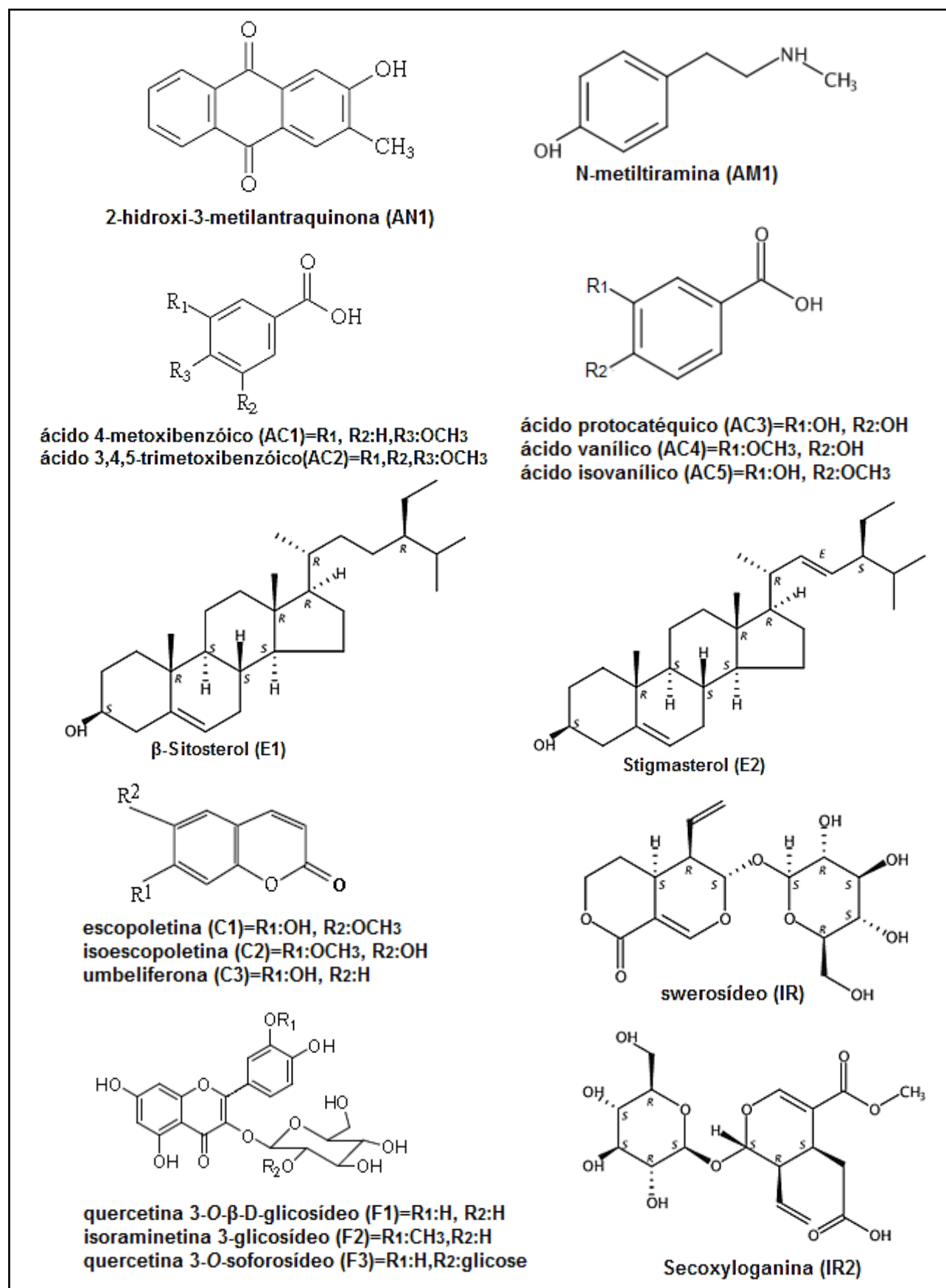


Figura 13. Compostos isolados a partir do gênero *Palicourea*.

2.3.1.6 Gênero *Psychotria*

É um dos maiores e mais diversificados gêneros dentro da família Rubiaceae, possui 252 espécies registradas no Brasil e 109 ocorrentes na Mata atlântica. As formas de vida encontradas vão desde arbusto, árvore, erva, trepadeira à subarbusto. Estão distribuídas do norte ao sul do país (Flora do Brasil 2020, 2017).

Quando é considerada a constituição química destas espécies, pode-se observar a presença, principalmente, de alcalóides indolmonoterpênicos, destacam-se também os alcalóides polindólicos, triptamínicos e os β -carbonílicos (SOLIS, *et al.*, 1993; FARIAS, 2006).

É sabido que plantas da tribo Psycotrieae são as principais produtoras de alcalóides, pelo fato de que todos os estudos fitoquímicos com os gêneros que pertencem a esta tribo resultaram no isolamento de alguma classe deste metabólito (WIJNSMA, VERPOORTE, 1986). Desta ampla classe de compostos destacam-se os alcalóides polindólicos, presentes principalmente na subespécie *Psychotria*, considerados o maior grupo de metabólitos encontrados no gênero. São compostos poliméricos resultantes da condensação de duas (alcalóides quinolínicos) ou mais (alcalóides pirrolidinoindolínicos) unidades de N_b -metil-triptamina ou de alcalóides triptamínicos (ADJIBADÉ, *et al.*, 1992; McKENNA, *et al.*, 1984). Vários deles já puderam ser isolados, tais como a isopsicotridina C e psicotridina, quadrigemina A e B a partir de *Psychotria forsteriana* A. Gray (ROTH, *et al.*, 1986). A quimonantina, hodgkinsina, quadrigemina C, calicantina e isocalicantina a partir de *P. colorata* (Willd. ex Schult.) Müll.Arg. (VEROTTA, *et al.*, 1998; CARVALHO, 1993). Quimonantina, hodgkinsina, quadrigemina, psicotridina e psicopentamina de *Psychotria rostrata* Blume (TAKAYAMA, *et al.*, 2004; LAJIS, *et al.*, 1993). Os alcalóides determinados em *P. oleoides* (Baill.) Schltr. hodgkinsina, isopsicotridina A e B, psicotridina, quadrigemina I, oleoidina e caledonina (JANNIC, *et al.*, 1999). Além de compostos quinolínicos como glomerulatina A, B e C de *P. glomerulata* (Donn. Sm.) Steyerm. (SOLIS, *et al.*, 1997).

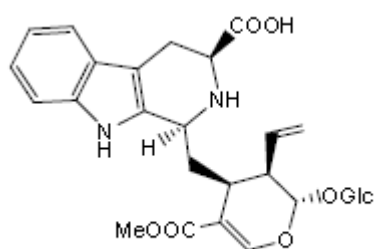
Outras classes de alcalóides também são observadas neste gênero, como alcalóides triptamínicos, indol monoterpênicos e Isoquinolínicos monoterpênicos. Uma análise feita com 15 espécies do gênero *Psychotria* no sul do Brasil, por cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos, demonstrou a presença de grupos cromóforos típicos de alcalóides indol monoterpênicos e β - carbonílicos em quatorze das espécies estudadas (LOPES, *et al.*, 2004).

Em um levantamento bibliográfico realizado (tabela 4 e figura 14) puderam ser agrupadas as principais classes de alcalóides isolados de espécies do gênero *Psychotria* que foram relacionadas com algum tipo de atividade biológica descrita na literatura, como exemplo da *P. colorata* a que foi conferida atividade analgésica, *P. viridis* Ruiz & Pav. com ação alucinógena, *P. forsteriana* com atividade citotóxica, *P. brachyceras* Müll.Arg. com propriedades anti-inflamatórias, *P. umbellata* Vell. com atividade analgésica e antidepressiva e a *P. suterella* Müll.Arg. altamente tóxica (ELISABETSKY, *et al.*, 1995; SOUZA, 2011; ROTH, *et al.*, 1986; NASCIMENTO, *et al.*, 2007; BOTH, *et al.*, 2005; SANTOS, *et al.*, 2001).

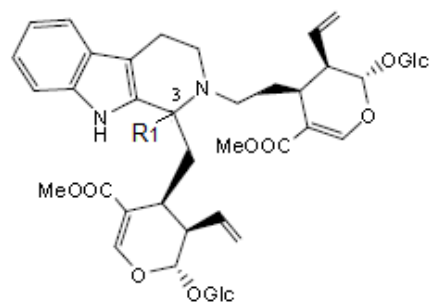
Tabela 4. Panorama químico representativo dos alcalóides isolados de espécies do gênero *Psychotria*.

Espécie	Alcalóide presente	Referência
<i>P. acuminata</i>	A1; A2; A3; A4	BERGER <i>et al.</i> , 2012.
<i>P. bahiensis</i>	A5; A6; A7; A8; A1; A9; A2	PAUL <i>et al.</i> , 2003.
<i>P. brachyceras</i>	A10	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2007.
<i>P. colorata</i>	A11; A12; A13; A14; A15; (-)- A16; A17; A18	VEROTTA <i>et al.</i> , 1998; 1999.
<i>P. forsteriana</i>	A19; A12; A20; A13; A15; A21; A22; A16; A17	ADJIBADE <i>et al.</i> , 1992; BERETZ <i>et al.</i> , 1985.
<i>P. glomerulata</i>	A23; A24; A25	SOLIS <i>et al.</i> , 1997
<i>P. ipecacuanha</i>	A26; A27	GARCIA <i>et al.</i> , 2005.
<i>P. leiocarpa</i>	A28	FRAGOSO, 2007.
<i>P. myriantha</i>	A29	FARIAS, 2006.
<i>P. oleoides</i>	A12; A14; A30; A15; A31; A32; A33; A34; A35	LIBOT <i>et al.</i> , 1987; JANNIC <i>et al.</i> , 1999; GUÉRITTE- VOEGELEIN <i>et al.</i> , 1992.
<i>P. rostrata</i>	A11; A12; A36; A13; A37; A22; A16; A38	TAKAYAMA <i>et al.</i> , 2004; LAJIS <i>et al.</i> , 1993.
<i>P. suterella</i>	A39	SANTOS <i>et al.</i> , 2001.
<i>P. umbellata</i>	A40	BOTH <i>et al.</i> , 2002; KERBER <i>et al.</i> , 2008.
<i>P. viridis</i>	A41; A42	CALLAWAY <i>et al.</i> , 2005; SOUZA, 2011).

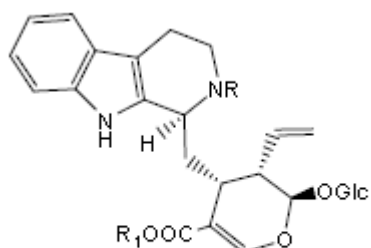
*A= Alcalóide



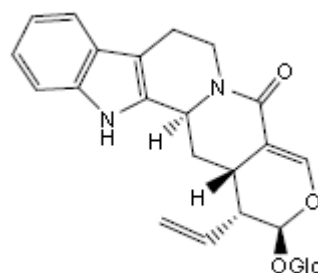
5α-carboxiestricosidina (A1)



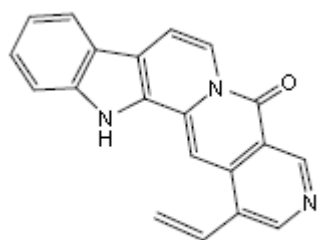
bahienosida A (A9)= R1:H-3 aβ
bahienosida B (A2)= R1: H-3 aa



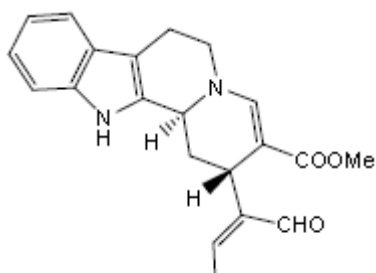
ácido estrictosidínico (A3)= R,R1:H
estricosidina (A4)=R: H, R1: Me



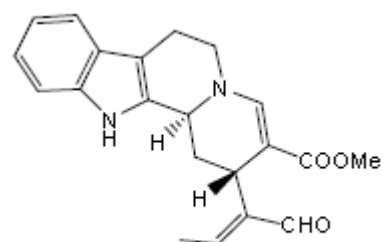
estricosamida (A5)



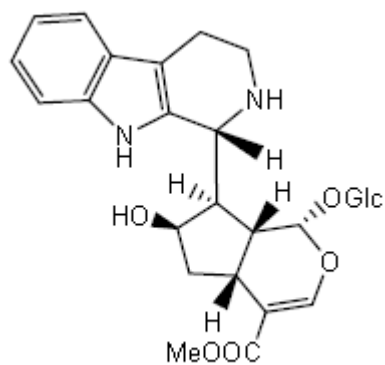
angustina (A6)



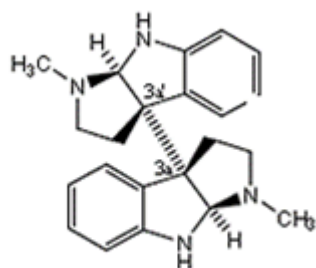
(E)-valesiacotamina (A7)



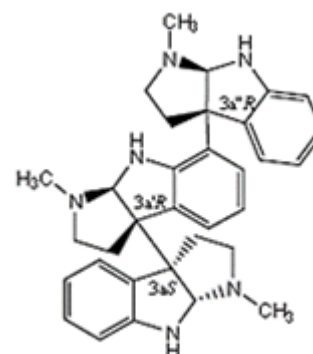
(Z)-valesiacotamina (A8)



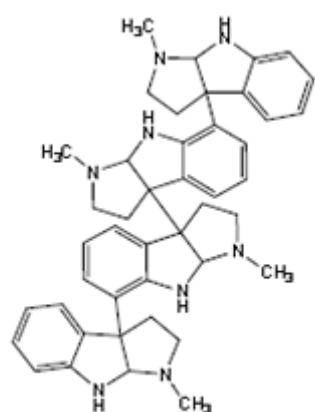
Braquicerina (A10)



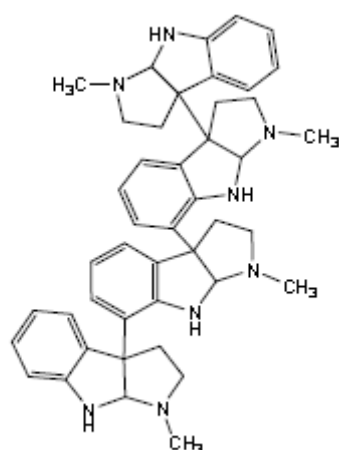
(+)-quimonantina (A11)



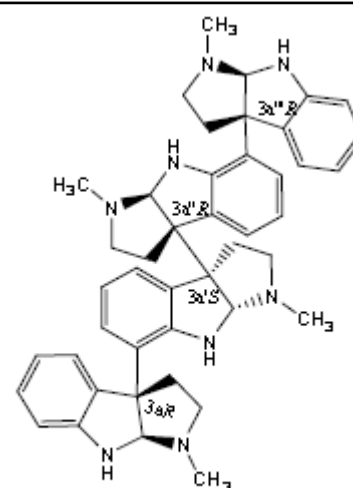
hodgkinsina (A12)



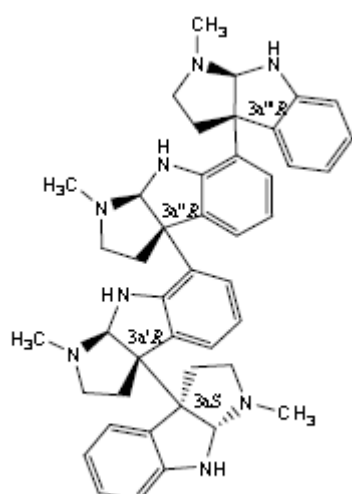
quadrigemina A (A20)



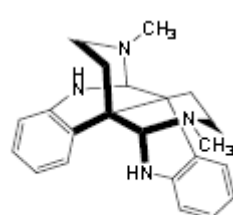
quadrigemina B (A13)



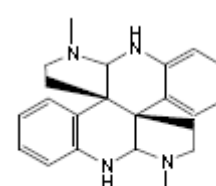
quadrigemina C (A14)



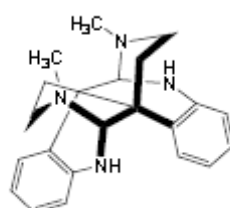
quadrigemina I (A30)



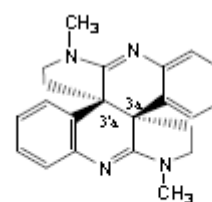
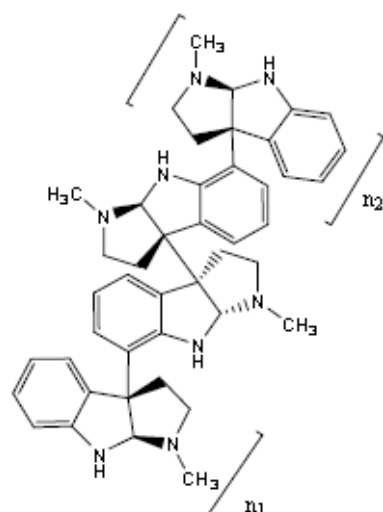
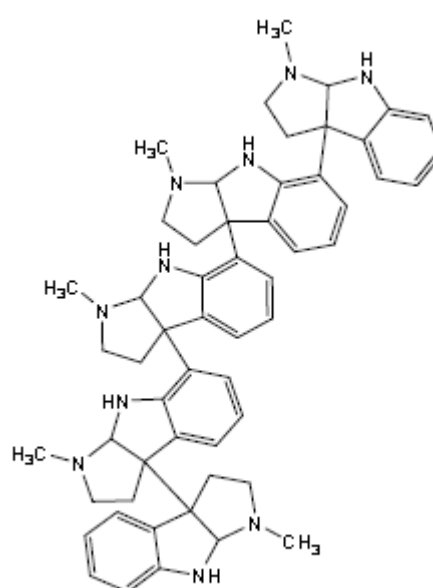
(-)-calicantina (A16)



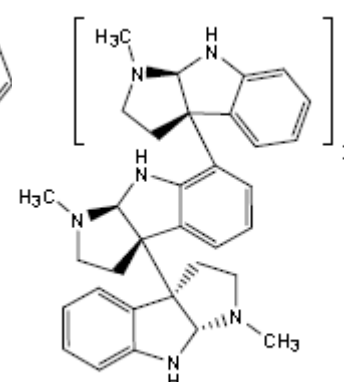
iso-calicantina (A17)



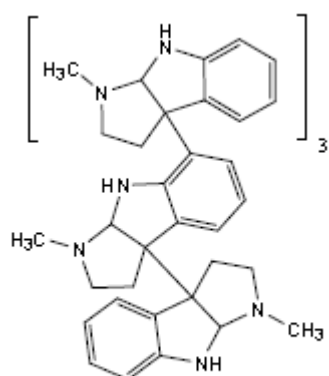
(+) -calicantina (A22)

(8-8a),(8'-8'a) tetradesidroisocalicantina
3a(R), 3'a(R) (A18)psicotridina (A15) = N1:1 e N2: 2 ou
N1:2 e N2: 1

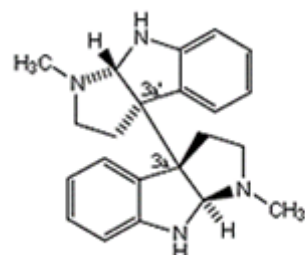
isopsicotridina A (A31)



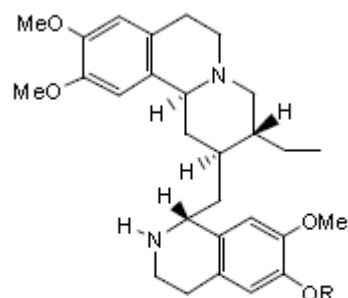
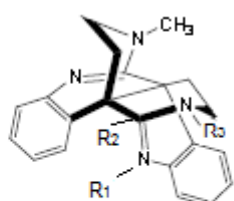
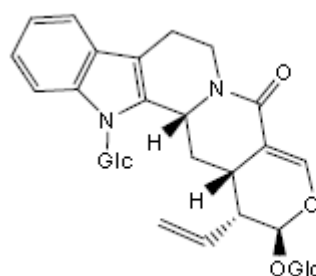
isopsicotridina B (A32)



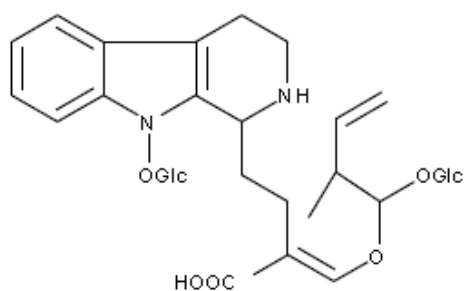
isopsicotridina C (A21)



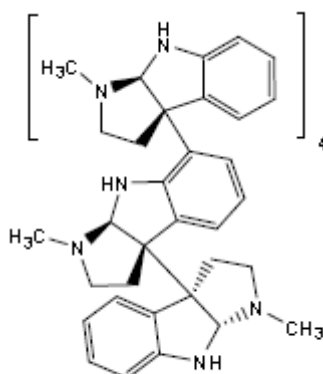
meso-quimonantina (A19)

cefaelina (A26)= R:H
emetina (A27)= R:Meglomerulatina A (A23)= R1:-, R2:-, R3: CH3
glomerulatina B (A24)=R1:-, R2:-, R3: H
glomerulatina C (A25)=R1:H, R2: H, R3: CH3

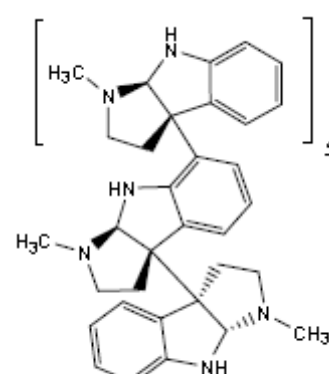
N-β-D-Glicopiranosilvincosamida (A28)



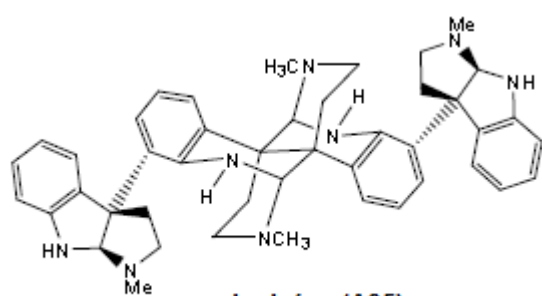
miariantosina A (A29)



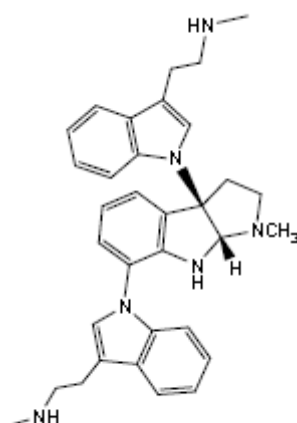
oleoidina (A33)



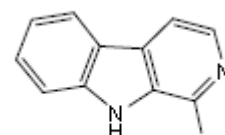
caledonina (A34)



psicoleina (A35)



psicotrimina (A36)



harmano (A41)

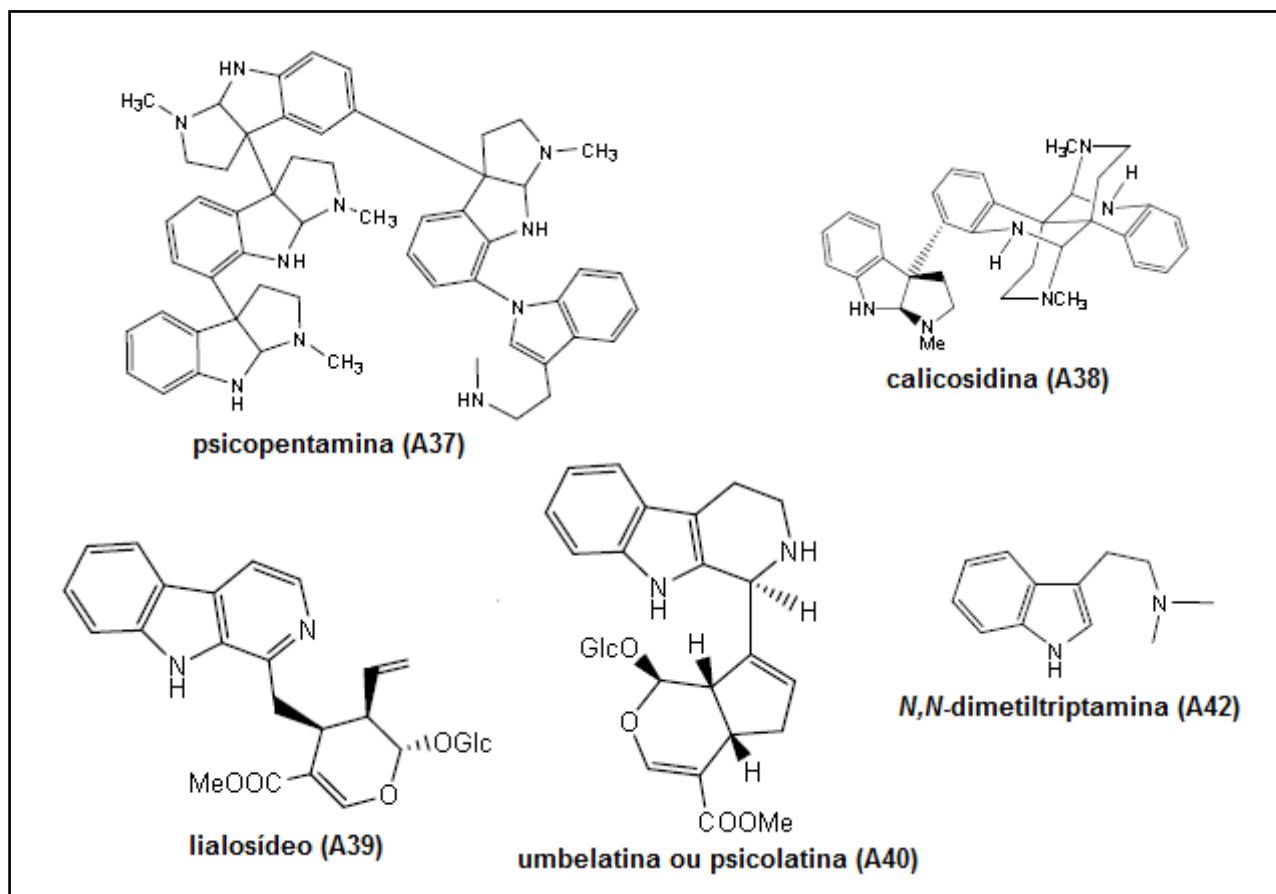


Figura 14. Alcalóides em plantas do gênero *Psychotria*.

Moraes (2013) considerou que no período de 1974-2012 60% dos compostos estudados do gênero *Psychotria* eram alcalóides, 40% correspondem a outras classes de compostos isolados (Figura 15) tais como triterpenos, peptídeos cíclicos (ciclotídeos), flavonoides, cumarinas, dentre outros. Atualmente um maior número de compostos de outras classes de metabolitos já puderam ser isolados, como exemplificado na tabela 5 e figura 16.

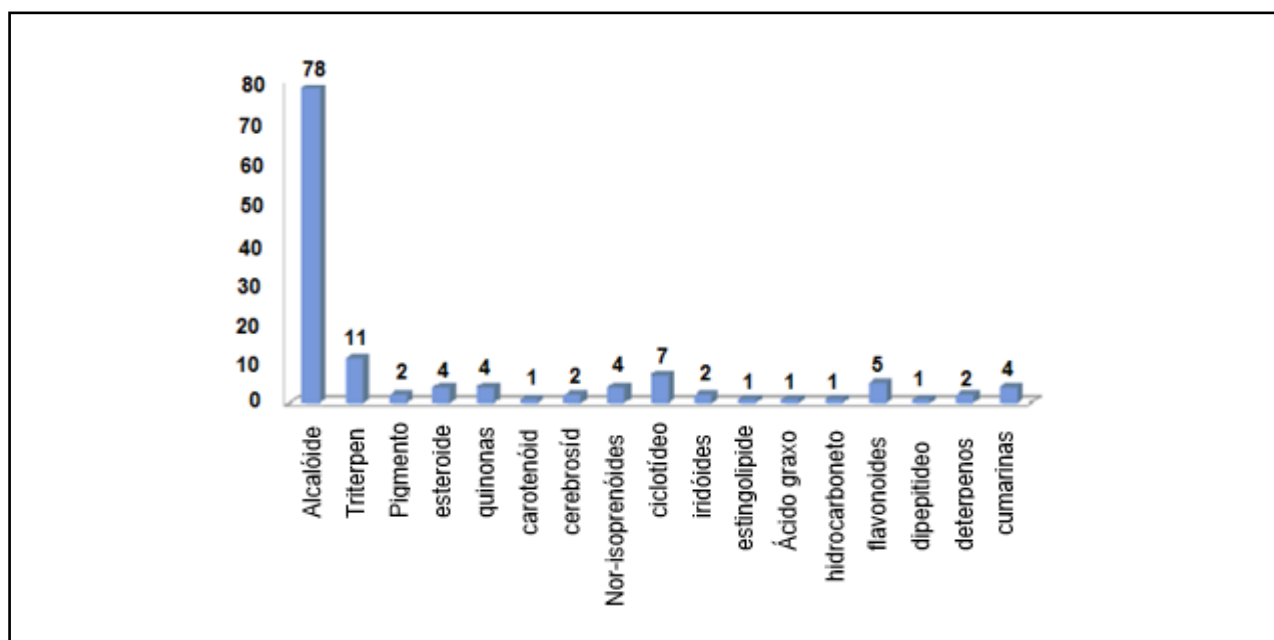
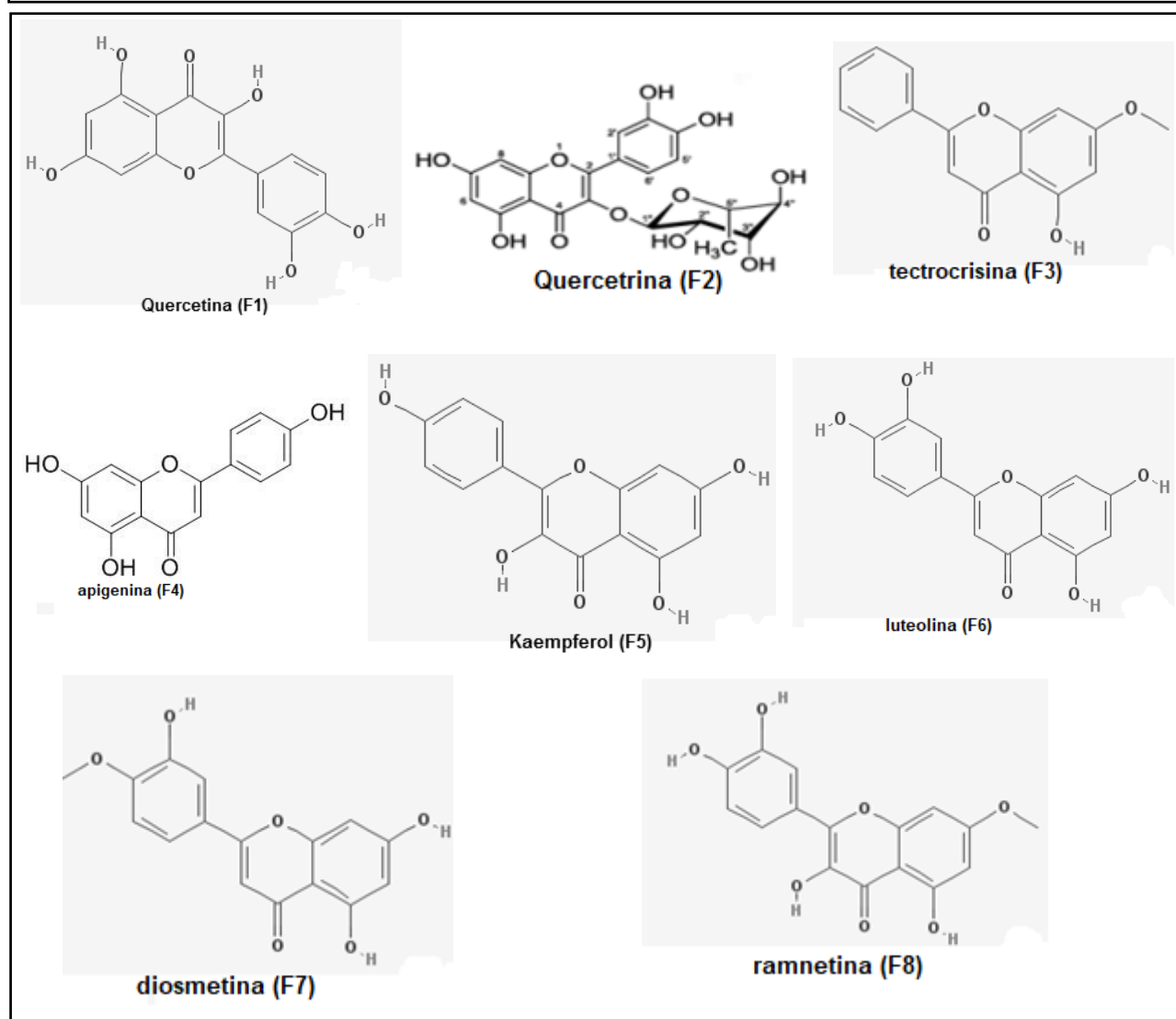
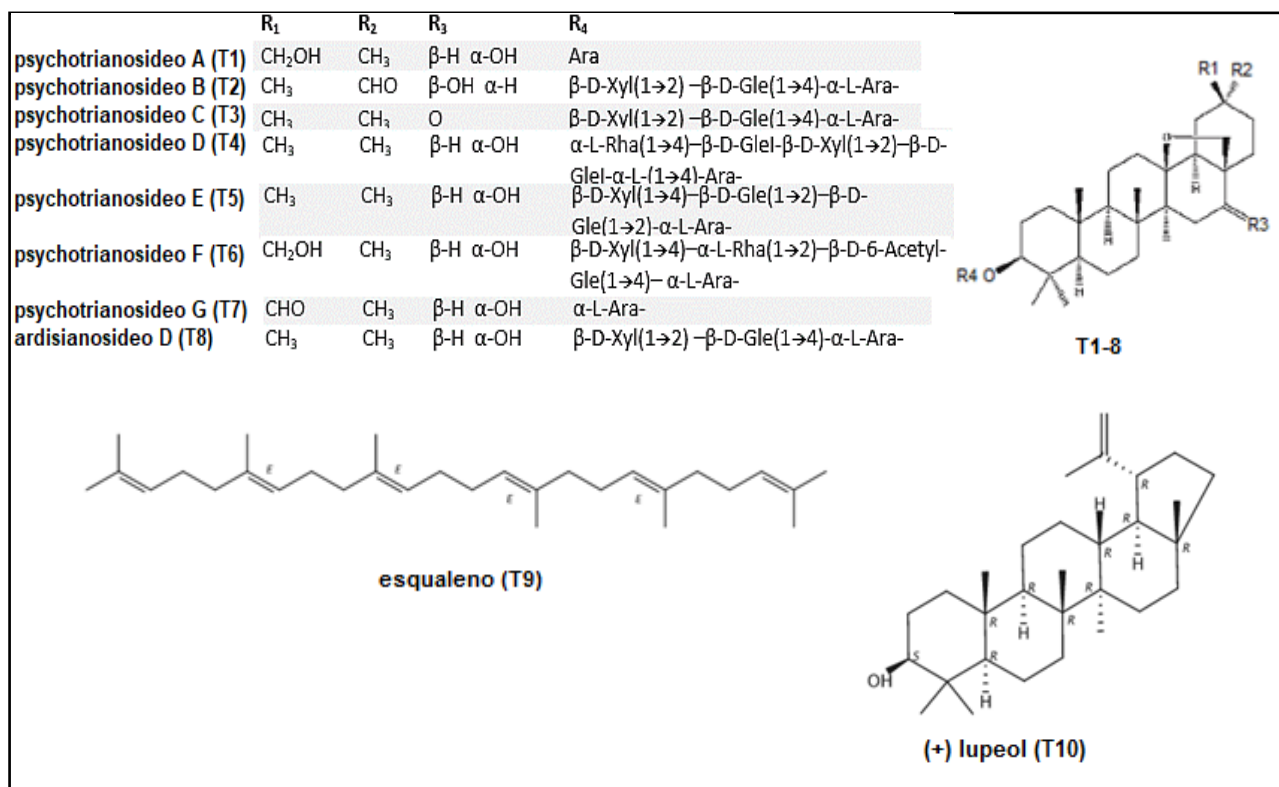


Figura 15. Números de compostos isolados de *Psychotria* sp. distribuídos em classes de metabólitos secundários entre 1974-2012. FONTE: MORAES, 2013.

Tabela 5. Exemplos de substâncias pertencentes a outras classes de metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Psychotria*.

Substância	Espécie	Referências
Triterpenos		
Psychotrianosideo A, B, C, D, E, F, G (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7)	<i>Psychotria</i> sp.	ZHANG <i>et al.</i> , 2013.
Ardisianosideo D (T8)	<i>Psychotria</i> sp.	ZHANG <i>et al.</i> , 2013.
Esqualeno (T9)	<i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	MORENO <i>et al.</i> , 2014.
Lupeol (T10)	<i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	MORENO <i>et al.</i> , 2014.
Flavonóides		
Quercetina (F1)	<i>Psychotria spectabilis</i> Steyerl.;	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2008.
Quercetrina (F2)	<i>Psychotria spectabilis</i> Steyerl.	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2008.
Tectochrysin (F3)	<i>Psychotria straminea</i>	FU <i>et al.</i> , 2015.
Apigenina (F4)		
Kaempferol (F5)		
Luteolina (F6)		
Diosmetina (F7)		
Rhamnetina (F8)		
Cumarinas		
Escopoletina (C1)	<i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	MORENO <i>et al.</i> , 2014.
Umbeliferona (C2)	<i>Psychotria spectabilis</i> Steyerl.	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2008
Psoraleno (C3)	<i>Psychotria spectabilis</i> Steyerl.	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2008
7-hydroxycoumarina (C4)	<i>Psychotria straminea</i>	FU <i>et al.</i> , 2015.
7-methoxycoumarina (C5)	<i>Psychotria straminea</i>	FU <i>et al.</i> , 2015.

*T= triterpenos; F= flavonóides; C= cumarinas.



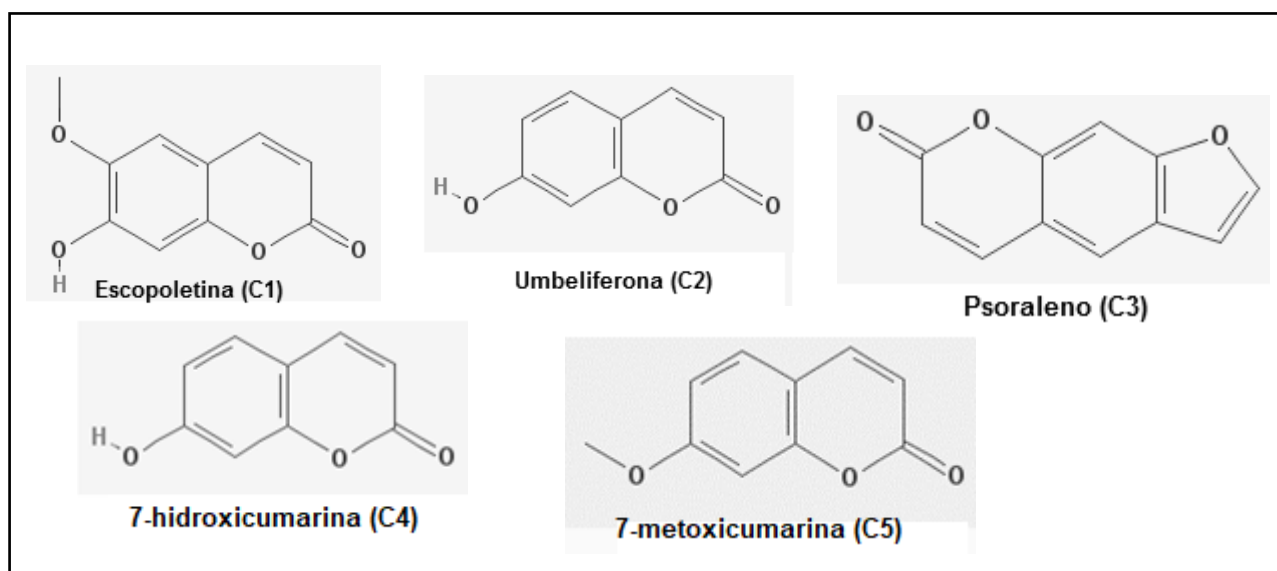


Figura 16. Exemplos de outras classes de compostos isolados em plantas do gênero *Psychotria*.

2.3.1.7 Gênero *Rudgea*

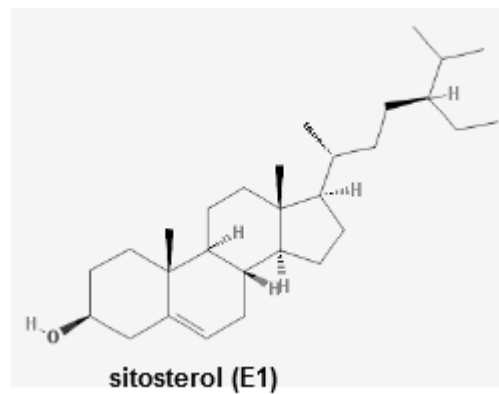
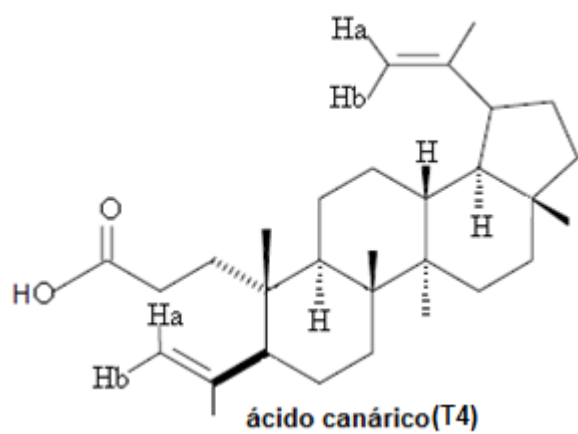
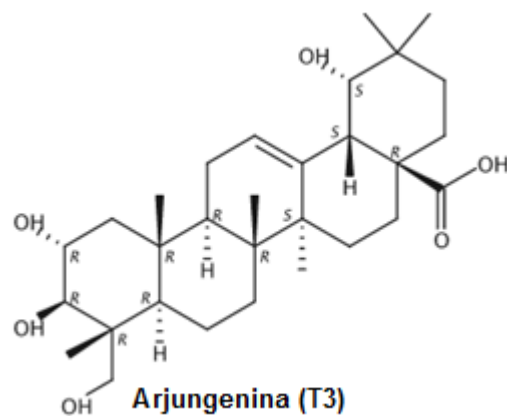
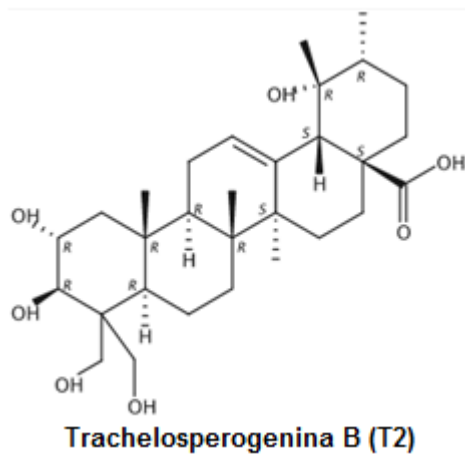
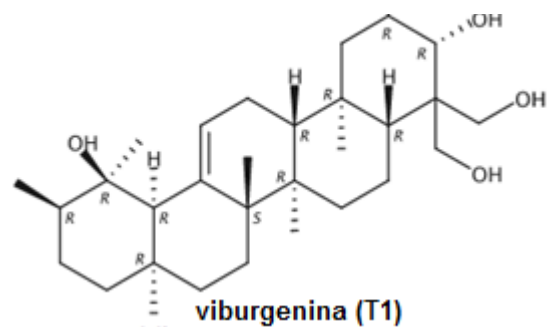
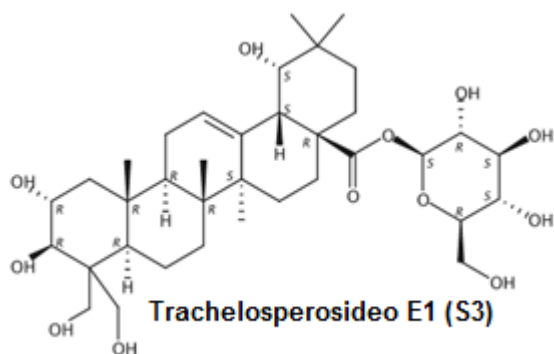
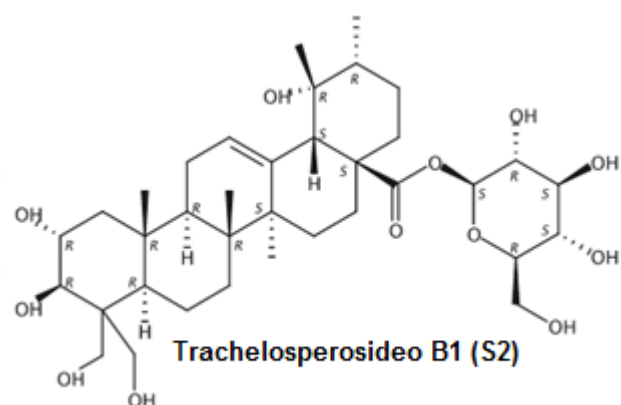
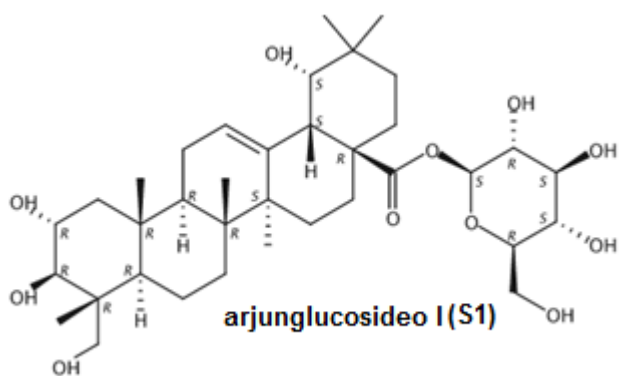
Consiste em um gênero de hábitos arbustivo ou arbóreo e que possui 68 espécies registradas no Brasil, com 41 representantes na Mata Atlântica, distribuídas em várias regiões do país (Flora do Brasil 2020, 2017).

Sobre estudos de isolamento de compostos químicos nesse gênero três espécies podem ser citadas, como demonstrado na tabela 6 e na figura 17.

Tabela 6. Panorama químico representativo de compostos isolados de espécies do gênero *Rudgea*.

Espécie	Substância presente	Referência
<i>Rudgea cornifolia</i>	A1	SCHINNERL, <i>et al.</i> , 2012.
<i>Rudgea jasminoides</i>	T4; E1; E2; AC1; AC2.	LOPES, <i>et al.</i> , 1999.
<i>Rudgea viburnioides</i>	T1; S1; S2; S3; T2; T3.	YOUNG, <i>et al.</i> , 1998.

* T= terpeno, S=saponina, E=esteroide, AC= ácido carboxílico, A= alcalóide.



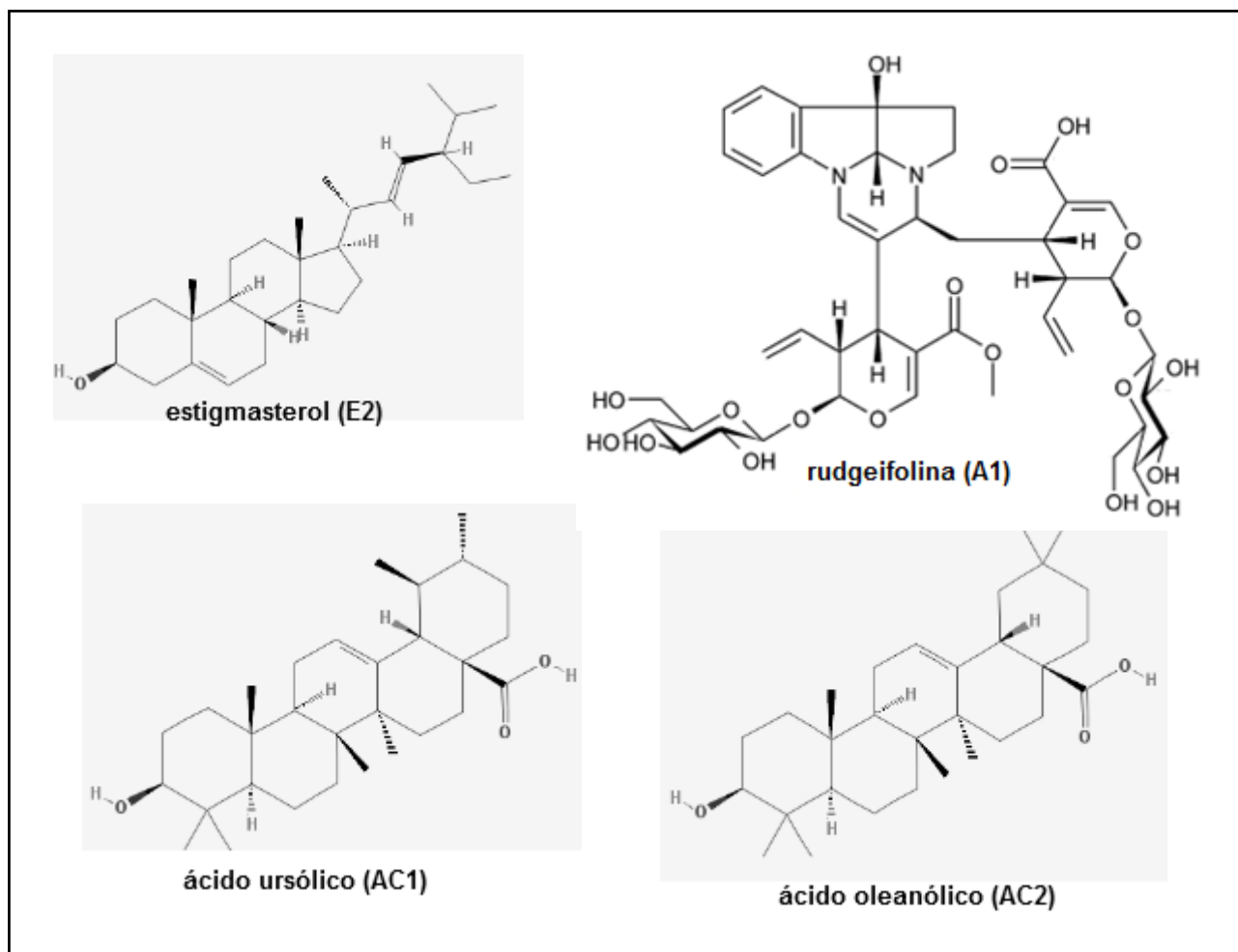


Figura 17. Compostos isolados a partir do gênero *Rudgea*.

2.3.1.8 Gênero *Simira*

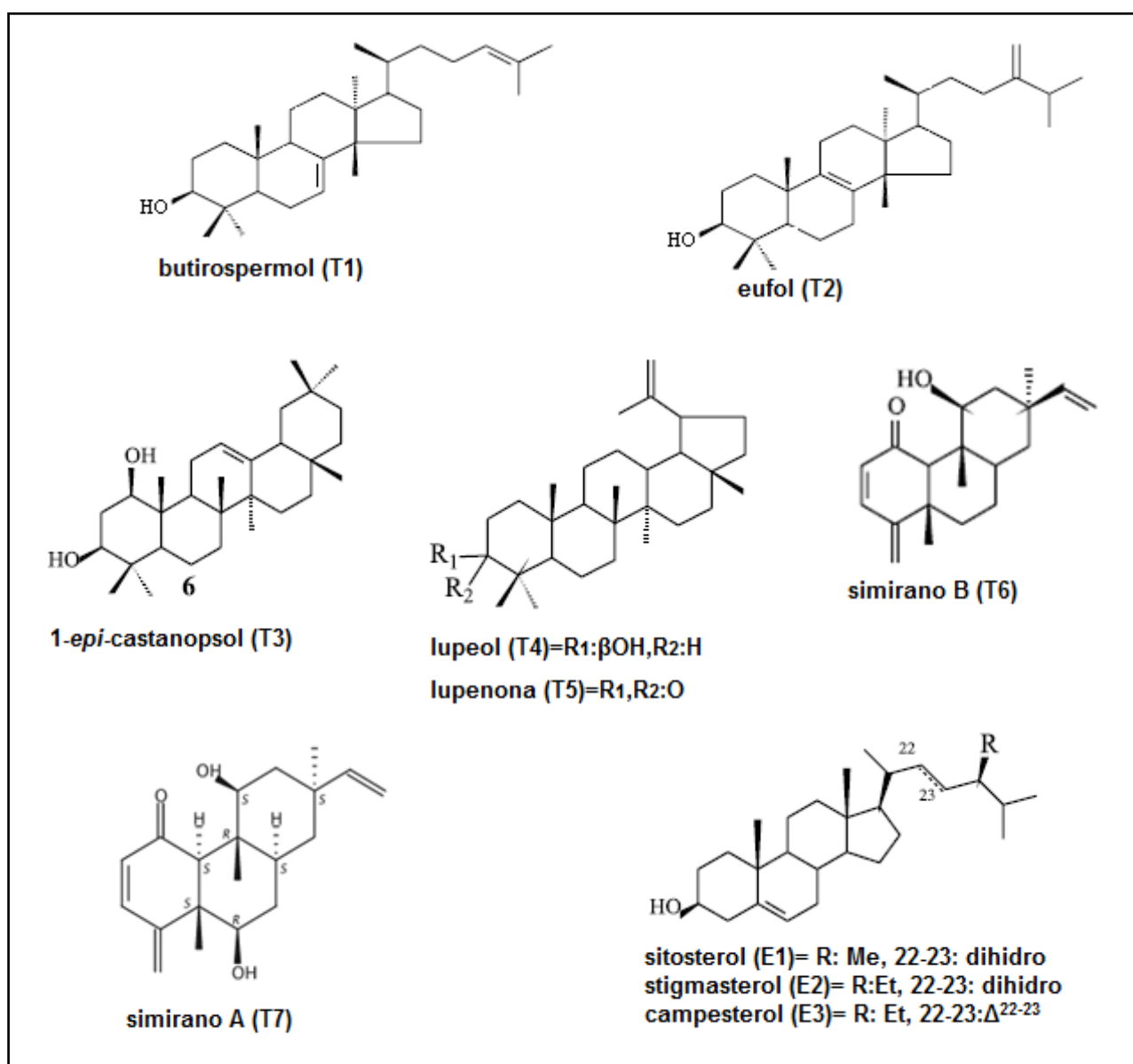
Esse gênero é representado por 19 espécies no Brasil, das quais 10 ocorrem na Mata Atlântica, possuem hábito arbóreo e podem ser encontradas nas regiões do norte ao sul do Brasil (Flora do Brasil 2020, 2017).

Sobre a constituição química dessas espécies uma classe marcadora de metabólitos que pode ser citada, são os alcalóides β -carbonílicos (CAPASSO, *et al.*, 2002). Os compostos isolados de espécies do gênero *Simira* apresentados na literatura foram agrupados na tabela 7 e ilustrados na figura 18.

Tabela 7. Panorama químico representativo de compostos isolados de espécies do gênero *Simira*.

Espécie	Substância presente	Referência
<i>Simira eliezeriana</i>	T7; T6; E1; E2; E3; A1; O1; O2; L2.	ARAÚJO, <i>et al.</i> , 2011; CASTRO & LOPES, 1986.
<i>Simira glaziovii</i>	T1; T2; T3; T4; T5; T6; S1; A1; A2; E1; E2; E3; L1; C1; C2; C3.	ALVES, <i>et al.</i> , 2001; ARAÚJO, <i>et al.</i> , 2012; BASTOS, <i>et al.</i> , 2002.
<i>Simira maxonii</i>	A1; A3.	HASBUN, <i>et al.</i> , 1989.
<i>Simira salvadorensis</i>	A1.	ARNASON, <i>et al.</i> , 1983.

* T= terpeno, E=esteróide, A= alcalóide, S= saponina, L=lignana, C=cumarinas, O=outros.



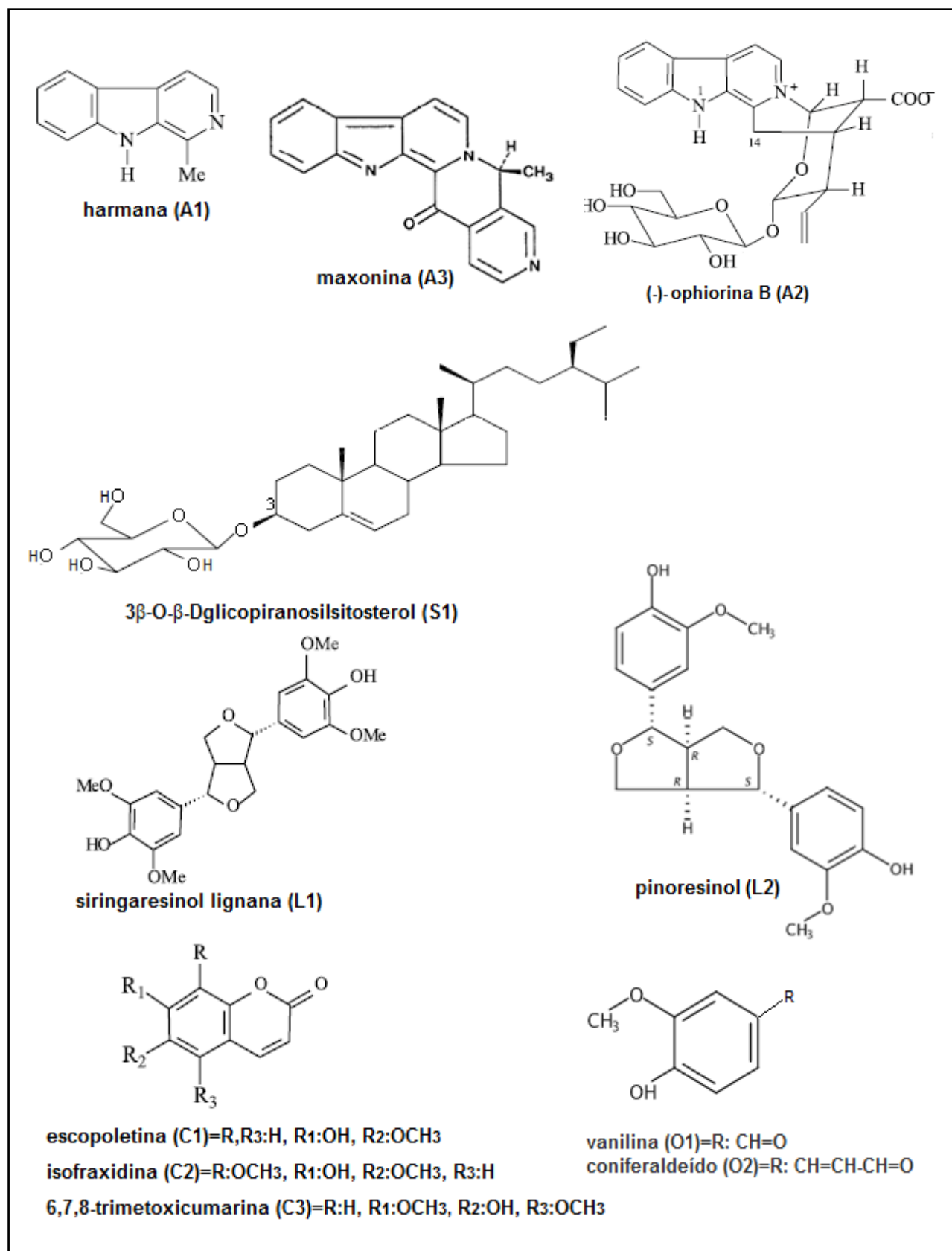


Figura 18. Compostos isolados a partir do gênero *Simira*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

As espécies vegetais da família Rubiaceae selecionadas para este projeto foram coletadas no parque estadual de Mata das Flores, município de Castelo-ES, com base em sua possível constituição química, segundo dados de revisões de literatura e disponibilidade de material em campo. As coletas foram realizadas no período da manhã, nos meses de agosto e setembro de 2015. Uma parte do material vegetal florido foi destinado ao preparo de exsiccatas que foram depositadas no Herbário VIES – Subcuradoria Alegre/Jerônimo Monteiro para documentação. O restante foi levado ao Laboratório de Produção Farmacêutica do CCENS-UFES, Alegre-ES, onde foram processados para a produção dos extratos a serem investigados. Esta etapa foi feita por meio de colaboração firmada com a pesquisadora colaboradora do projeto, Prof^a Dra. Tatiana Tavares Carrijo do CCENS-UFES, que já dispõe de licença de coleta junto ao Instituto Estadual de Meio Ambiente (IEMA), inscrita sob código 005-2012.

3.2 Preparação dos extratos vegetais

Primeiramente, as espécies vegetais foram lavadas em água corrente, separadas e identificadas em sacos de papel. Foram secas em estufa de circulação de ar forçado à 45°C, durante 7 dias. Na etapa de extração, o material desidratado foi pulverizado em liquidificador doméstico. As drogas vegetais obtidas de cada planta foram pesadas para posterior cálculo de rendimento. Posteriormente, foi preciso otimizar um processo extrativo que fosse adequado para obtenção de uma máxima quantidade de extratos vegetais, visto que as plantas em questão são espécies novas e, portanto, a quantidade inicial de material vegetal para análise foi pequena.

Método 1: A primeira forma de extração testada foi a maceração, operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período determinado, sob a agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Este processo foi feito em duas etapas: na 1^a foi utilizado como líquido extrator n-hexano, na proporção de 1:25 (peso/volume), visando a obtenção de extratos

com constituintes mais apolares. Foram realizadas três macerações de 72 horas cada. Na segunda etapa foi utilizado o metanol como líquido extrator, nas mesmas condições anteriores, visando a aquisição de extratos com constituintes polares. O macerado foi filtrado e assim obtiveram-se as soluções extrativas, estas foram transferidas para recipientes devidamente identificados e tarados, sendo posteriormente concentrados em capela de exaustão.

Método 2: As drogas vegetais residuais provindas do método 1 foram submetidas a turbólise, em liquidificador doméstico, utilizando metanol como líquido extrator na proporção de 1:25 (peso/volume), visando aumentar o rendimento para os extratos polares, a mistura obtida a partir desse processo foi acondicionada em erlenmeyers identificados (um para cada amostra) e deixado em repouso por 24 horas. As soluções foram filtradas em sistema a vácuo com auxílio de kitassato e funil de buchner. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador.

Método 3: O terceiro método utilizado foi o da percolação, nele ocorre extração exaustiva das substâncias ativas. A planta é colocada em um percolador através do qual é passado o líquido extrator. As drogas vegetais foram submetidas a extração em percolador, novamente com metanol nas mesmas condições de proporção anteriores. Fez-se quantos ciclos de extração fossem necessários até que não se observasse mais a saída de líquido contendo constituintes do material vegetal. Os percolados foram concentrados em rotaevaporador, transferidos para frascos de vidro âmbar e levados para secagem completa em capela de exaustão. Finalmente foram armazenados ao abrigo da luz e umidade.

3.3 Prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos vegetais

Os extratos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para isso, estes foram solubilizados, em seus respectivos LE, na concentração de 20 mg/mL, com auxílio de ultrassom e aplicados sobre cromatoplasmas de sílica gel 60 (0,22 µm de espessura de filme, F254) com uso de capilar de vidro. Após aplicação dos extratos sobre as cromatoplasmas, foi feita a otimização da fase móvel para melhor visualização dos constituintes presentes. A eluição foi feita no modo ascendente, unidirecionalmente. Após a eluição, as placas foram secas e reveladas empregando um revelador geral (anisaldeído sulfúrico) e dois específicos (FeCl_3 e Dragendorff) e visualizadas sob luz

ultravioleta de 254 e 360 nm, bem como no visível a fim de determinar o Fator de Retenção das principais bandas presentes nos extratos.

3.4 Avaliação da atividade inibitória da acetilcolinesterase

A avaliação da atividade inibitória sobre a enzima AchE foi feita inicialmente por meio do método de bioautografia adaptado de Marston *et al.* (2002). Este teste baseia-se na clivagem do acetato de 1-naftila pela acetilcolinesterase para formar o composto 1-naftol que, por sua vez, reage com o sal de fast blue B resultando na coloração púrpura do diazônio (figura 19). A placa de CCD permanece coberta por uma coloração púrpura e a inibição da enzima resulta em manchas incolores.

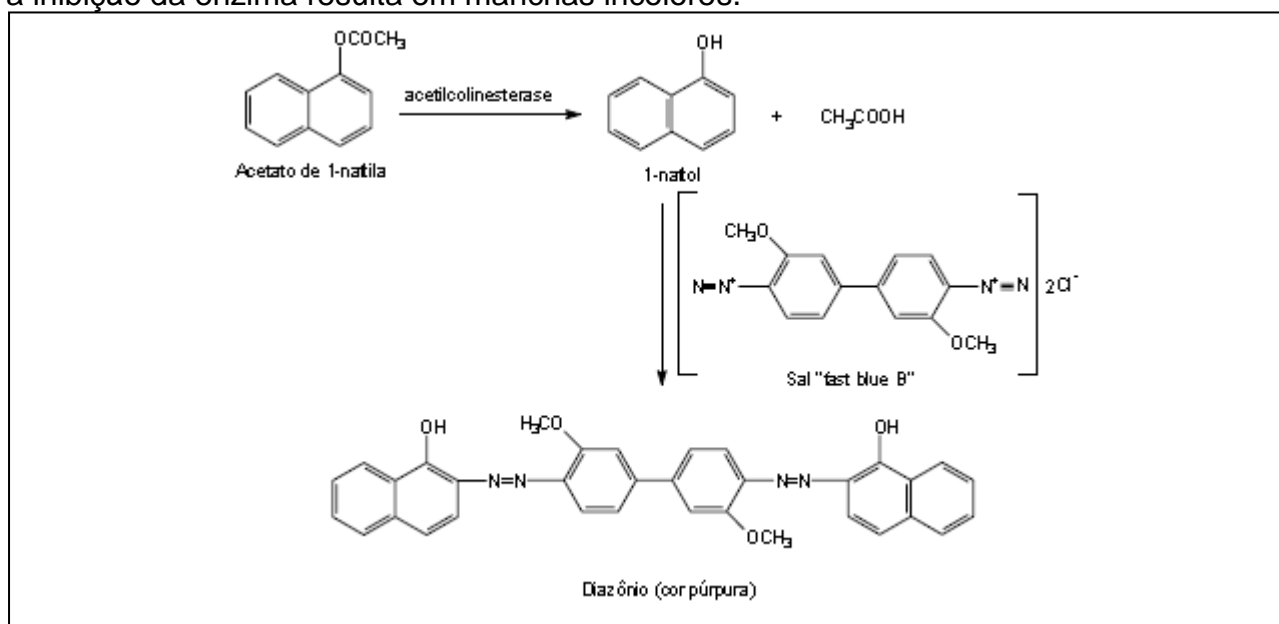


Figura 19. Reação da enzima acetilcolinesterase com o acetato de 1-naftila e a formação subsequente do diazônio de coloração púrpura. Fonte: SEBBEN, 2005.

Para isso, foi preparada uma solução estoque de enzima (Sigma- C3389-2 KU) (1000 U/mL), dissolvida em tampão Tris HCl (Amresco- 0234- ultra pure grade) pH 7,8, contendo albumina bovina para conferir estabilidade enzimática. As amostras (extratos) foram dissolvidas e aplicadas com auxílio de micropipetas sobre placas cromatográficas revestidas com sílica gel 60. Após eluição em sistema solvente adequado para separação das bandas, as placas foram secas, nebulizadas com a solução enzimática e incubadas em atmosférica úmida por 20 minutos à 37 °C. Após incubação, a placa foi aspergida com 1 mL de solução etanólica de acetato de naftila (2,5 mg/mL) e 3 mL de Fast Blue (3,2 mg/mL), recentemente preparadas.

As amostras também foram analisadas em microplacas de 96 poços pelo método espectrofotométrico de Ellman, modificado por Rhee et al. (2001). O método de Ellman é baseado na taxa de hidrólise da Ach pela AChE dando origem à tiocolina, que reage com o ânion carboxilato do DTNB, formando o 2-nitrobenzoato 5-mercaptotiocolina e um ânion de coloração amarela, o 5-tio-2-nitrobenzoato, que é quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 405 nm. Rhee e colaboradores, em 2001, adaptaram esse método para microplacas de Elisa, podendo assim utilizar um menor volume de solução e analisar um maior número de amostras de uma só vez (figura 20) (Ellman, *et al.*, 1961).

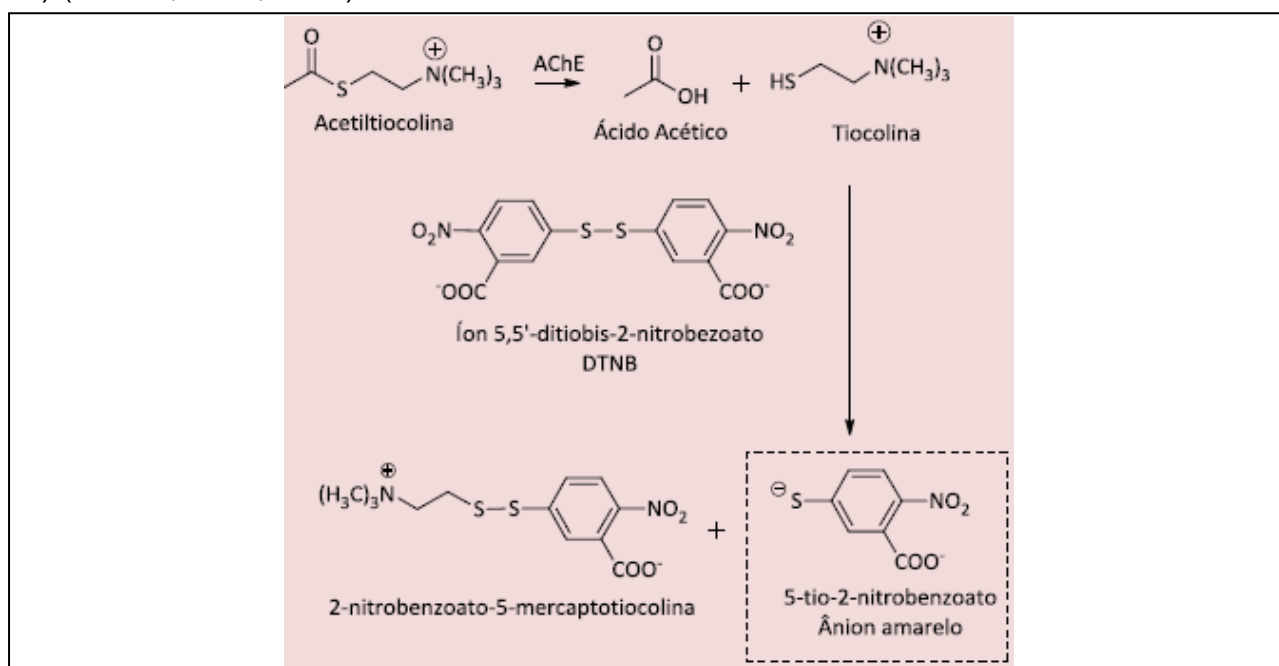


Figura 20. Formação do ânion amarelo do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a tiocolina e o íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato.

Em cada poço das microplacas foi adicionado 25 μL de acetilcolina iodada (15 mM), 125 μL de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) (2,8 mM) (Sigma- D8130), 50 μL de tampão Tris-HCl (50 mM) pH 8,0, contendo 0,1% de BSA (Albumina do Soro Bovino) e 25 μL das amostras na concentração de 4 mg/mL (concentração final no ensaio de 400 $\mu\text{g/mL}$). Metanol e tris-HCl foram usados como controle negativo e tacrina e galantamina (1,56 $\mu\text{g/mL}$), como inibidores padrões. A absorvância foi medida em quadruplicata a 405 nm, com intervalos de 5 minutos entre as leituras. Após essas leituras, serão adicionados aos poços 25 μL de acetilcolinesterase (Sigma- C3389-2 KU) (0,22 U/mL). As absorvâncias foram medidas novamente 4 vezes, a 405 nm, com intervalos de 5 min. Aumentos na absorvância devido à hidrólise espontânea do substrato serão corrigidos pela subtração da taxa de reação antes da adição da enzima.

3.5 Análise dos dados

A porcentagem de inibição enzimática obtida pela análise quantitativa, foi calculada pela comparação das taxas das amostras com os controles utilizando o programa Microsoft® Excel através da fórmula: % atividade enzimática= Abs da amostra*100/ média Abs do branco (controle negativo); % inibição da atividade= 100- %atividade enzimática. Com os valores obtidos foi construído um gráfico de % inibição da atividade enzimática x concentração das amostras ativas em µg/mL. Serão considerados inibidores potentes aqueles que demonstrarem no mínimo 50% de inibição, moderados de 30-50% e fracos menos de 30% de inibição (Vinutha, *et al.*, 2007). Para o cálculo do IC50 foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% da atividade enzimática.

Os dados de inibição da atividade colinesterásica para todos os 30 tratamentos (28 amostras + 2 padrões) foram submetidos à análise de variância, sendo que as médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste de agrupamento de Scott e Knott a 5% de significância, submetidos a análise pelo programa R®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta do material vegetal

Foram obtidas 25 espécies de plantas (figura 21, tabela 8) pertencentes aos gêneros: *Alseis* (1), *Faramea* (5), *Geophila* (1), *Margaritopsis* (1), *Palicourea* (1), *Psychotria* (10), *Rudgea* (5) e *Simira* (1). Destaca-se neste grupo 5 novas espécies de *Psychotria* que ainda estão em fase de identificação para confirmação botânica. Na tabela 8 segue a documentação voucher para as espécies coletadas.

Tabela 8. Espécies obtidas em coleta.

	Nome científico	Voucher
1	<i>Alseis floribunda</i> Schott.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 42
2	<i>Faramea campanella</i> Müll. Arg.	T. T. Carrijo <i>et al.</i> , 1684
3	<i>Faramea oligantha</i> Müll. Arg.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 99
4	<i>Faramea involucellata</i> Müll. Arg.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 97
5	<i>Faramea martiana</i> Müll. Arg.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 10
6	<i>Faramea multiflora</i> A. Rich.	T. T. Carrijo <i>et al.</i> , 1763
7	<i>Geophila repens</i> (L.) I. M. Johnst.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 49
8	<i>Margaritopsis cephalantha</i> (Müll.Arg.) C.M.Taylor	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 50
9	<i>Palicourea blanchetiana</i> Schldl.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 142
10	<i>Psychotria octocuspis</i> Müll.Arg.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 31
11	<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 52
12	<i>Psychotria hastisepala</i> Müll. Arg.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 130
13	<i>Psychotria rhytidocarpa</i> Müll. Arg.	T. T. Carrijo <i>et al.</i> , 1786
14	<i>Psychotria</i> 1	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 27
15	<i>Psychotria</i> 2	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 27
16	<i>Psychotria</i> 3	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 27
17	<i>Psychotria</i> 4	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 27
18	<i>Psychotria</i> 5	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 27
19	<i>Psychotria stelarlis</i> Müll. Arg.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 31
20	<i>Rudgea coronata</i> (Vell.) Müll. Arg.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 60
21	<i>Rudgea coronata</i> (Vell.) Müll.Arg. subsp. <i>coronata</i>	F. Torres-Leite <i>et al.</i> 60)
22	<i>Rudgea coronata</i> subsp. <i>saint-hilairei</i> (Standl.) Zappi	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 12
23	<i>Rudgea reflexa</i> Zappi	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 82
24	<i>Rudgea</i> sp. 1	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 05
25	<i>Simira viridiflora</i> (Allemão & Saldanha) Steyerm.	F. Torres-Leite <i>et al.</i> , 87



Figura 21. Espécies coletadas em campo, ordem de identificação segundo a tabela 8.

4.2 Preparação dos extratos vegetais

Os rendimentos obtidos a partir do processo de extração das espécies vegetais foram apresentados na tabela 9. Verificou-se que os extratos metanólicos apresentaram maior rendimento quando comparado aos extratos n-hexânicos, o que provavelmente está relacionado às diferenças no metabolismo das espécies selecionadas.

Tabela 9. Rendimento dos extratos obtidos a partir da etapa de extração pelo método 3.

Nº	Nome científico	Droga vegetal (g)	Extrato n-hexânico	Extrato metanólico
1	<i>Alseis floribunda</i>	4,39 g	0,072 g (1,64%)	1,04g (23,67%)
2	<i>Faramea campanella</i>	0,86 g	0,005 g (0,58%)	0,005g (0,58%)
3	<i>Faramea oligantha</i>	3,69 g	0,0586 g (1,59%)	0,313 g (8,48%)
4	<i>Faramea involuclata</i>	0,89 g	0,018 g (2,01%)	0,106g (11,82%)
5	<i>Faramea martiana</i>	13,48 g	0,192 g (1,42%)	2,209g (16,38%)
6	<i>Faramea multiflora</i>	1,64 g	0,04 g (2,44%)	0,107g (6,52%)
7	<i>Geophila repens</i>	0,29 g	0,0049 g (1,68%)	0,075 g (25,77%)
8	<i>Margaritopsis cephalantha</i>	1,55 g	0,0215 g (1,38%)	0,762 (48,88%)
9	<i>Palicourea blanchetiana</i>	4,22 g	0,079 g (1,87%)	1,003g (23,78%)
10	<i>Psychotria octocuspis</i>	1,01 g	0,014 g (1,38%)	0,303 g (29,97%)
11	<i>Psychotria carthagenensis</i>	2,35 g	0,017 g (0,72%)	0,645g (27,49%)
12	<i>Psychotria hastisepala</i>	2,98 g	0,0655 g (2,19%)	0,677 g (22,71%)
13	<i>Psychotria rhytidocarpa</i>	5,02 g	0,054 g (1,07%)	0,985g (19,62%)
14	<i>Psychotria 1</i>	1,05 g	0,0123 g (1,17%)	0,263 g (24,95%)
15	<i>Psychotria 2</i>	0,94 g	0,0053 g (0,56%)	0,262 g (27,81%)
16	<i>Psychotria 3</i>	1,78 g	0,0047 g (0,26%)	0,4305 g (24,16%)
17	<i>Psychotria 4</i>	2,62 g	0,0597 g (2,28%)	0,593 g (22,61%)
18	<i>Psychotria 5</i>	1,55 g	0,017 g (1,09%)	0,298g (19,22%)
19	<i>Psychotria stelarisi</i> M	1,88 g	0,019 g (1,01%)	0,306g (16,22%)
20	<i>Rudgea coronata</i>	0,99 g	0,02 g (2,01%)	0,182g (18,33%)
21	<i>Rudgea coronata coronata</i>	1,34 g	0,015 g (1,12%)	0,914g (68,31%)
22	<i>Rudgea coronata saint-hilaire</i>	0,58 g	0,005 g (0,86%)	0,033g (5,68%)
23	<i>Rudgea reflexa</i>	7,07 g	0,1073 g (1,52%)	0,7766 g (7,20%)
24	<i>Rudgea sp. 1</i>	5,47 g	0,0465 g (0,85%)	0,877 g (16,03%)
25	<i>Simira viridiflora</i>	10,73 g	0,13 g (1,21%)	1,888g (17,59%)

4.3 Prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos vegetais

Com o intuito de realizar uma separação mais eficaz dos compostos presentes nos extratos, foi feita a otimização do sistema eluente para melhor visualização dos constituintes presentes, utilizando as fases móveis descritas nas tabelas 10 e 11 e sílica como fase estacionária.

Tabela 10. Principais sistemas eluentes utilizados na etapa de otimização de fase móvel destinada à análise dos extratos n-hexânicos por Cromatografia em Camada Delgada.

Método	Composição	Proporção
1	n-hexano	100%
2	n-hexano: acetato de etila	90:10
3	n-hexano: acetato de etila	85:15
4	n-hexano: acetato de etila	80: 20
5	n-hexano: acetato de etila	70:30

Tabela 11. Principais sistemas eluentes utilizados na etapa de otimização de fase móvel destinada à análise dos extratos metanólicos por Cromatografia em Camada Delgada.

Método	Composição	Proporção
1	clorofórmio: metanol	90:10
2	clorofórmio: metanol	80:20
3	diclorometano: metanol	96:4
4	diclorometano: metanol	95:5
5	diclorometano: metanol	90:10
6	diclorometano: metanol	80:20
7	diclorometano: metanol	70:30
8	diclorometano: metanol + dietilamina	70:30: gotas

A mistura de solventes orgânicos que se mostrou mais adequada para visualização das bandas nas cromatoplasmas foram: Para os extratos hexânicos (n-hexano: Acetato de etila 85:15), figura 22-pag. 64, já para os extratos metanólicos a fase móvel escolhida foi (diclorometano: metanol 80:20), figura 23-pag. 65, seguindo a ordem de aplicação constante na tabela 12.

A análise cromatográfica dos extratos brutos hexânicos (figura 22, tabela 13) utilizando como revelador anisaldeído sulfúrico permitiu a observação de bandas com coloração essencialmente violácea. Segundo Wagner & bladt (2009), bandas com essa coloração são indicativos de compostos de natureza terpênica, o que já é esperado devido ao solvente utilizado no processo extrativo ser extremamente apolar. Ainda, conclui-se que as amostras não possuem compostos de procedência fenólica ou alcalóides devido à ausência de bandas características nas placas reveladas com reveladores específicos.

Tabela 12. Ordem de aplicação das amostras para todos os ensaios feitos em placas de sílica.

Nº	Amostra (espécie)
1	<i>Psychotria 1</i>
2	<i>Psychotria 2</i>
3	<i>Psychotria 3</i>
4	<i>Psychotria 4</i>
5	<i>Psychotria 5</i>
6	<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.
7	<i>Psychotria octocuspis</i>
8	<i>Psychotria rhytidocarpa</i>
9	<i>Psychotria hastisepala</i> Müll. Arg.
10	<i>Psychotria stelarisi</i> Müll. Arg.
11	<i>Faramea involucellata</i> Müll. Arg.
12	<i>Faramea campanella</i> Müll. Arg.
13	<i>Faramea martiana</i> Müll. Arg.
14	<i>Faramea multiflora</i> A. Rich.
15	<i>Faramea oligantha</i> Müll. Arg.
16	ERRO- (<i>Faramea oligantha</i> + <i>Psychotria 4</i>)
17	<i>Rudgea sp. 1</i>
18	<i>Rudgea reflexa</i>
19	<i>Rudgea reflexa 2</i>
20	<i>Rudgea coronata saint-hilaire</i>
21	<i>Rudgea coronata</i> (Vell.) Müll. Arg
22	<i>Rudgea coronata coronata</i>
23	<i>Margaritopsis cephalantha</i>
24	<i>Margaritopsis cephalantha 2</i>
25	<i>Alseis floribunda</i> Schott.
26	<i>Geophila repens</i> (L.) I. M. Johnst.
27	<i>Simira viridiflora</i>
28	<i>Palicourea blanchetiana</i> Schltldl.

* O número 2 representa amostras de duas coletas diferentes. As placas dos extratos hexânicos possuem apenas 27 amostras pois não se tem o "erro".

Com a análise cromatográfica dos extratos brutos metanólicos (figura 23, tabela 13) foi possível concluir que as amostras do gênero *Psychotria* (1 a 10) possuem compostos majoritariamente de natureza alcaloídica, o que é observado nas bandas de coloração azul na placa revelada com anisaldeído sulfúrico. Complementariamente, quando usado o revelador específico para alcalóides, Dragendorff, pode-se observar a aparecimento de bandas (em destaque) de coloração castanho ou castanho-alaranjadas (Vis.) e Rf's na região de 0, 0,17; 0,31 e 0,61, resultados que segundo a Wagner & bladts (2001) são indicativos da presença de alcalóides na amostra. Ainda, segundo esse mesmo autor, alcalóides podem emitir fluorescência azul ou verde-azulada na região de UV em comprimento de onda de 365nm (onda longas) e pouca ou nenhuma fluorescência em 254 nm (ondas curtas) o que também é observado para as amostras desse gênero. Os

dados encontrados corroboram com o que é descrito na literatura para espécies do gênero *Psychotria*.

Para as espécies do gênero *Faramea* (11 a 16), quando aplicado um revelador geral observam-se, sob luz visível, bandas que variam entre amarelo, verde e azul. Quando observadas no ultravioleta (254, 360 nm) podem ser notados compostos que emitem fluorescência da mesma coloração, sugerindo a presença de flavonóides. Segundo Wagner & Blatt (2001) extratos de flavonóides contêm frequentemente ácidos fenol carboxílicos, por exemplo: ácido caféico e ácidos clorogênicos e ainda cumarinas como a escopoletina que formam zonas fluorescentes azuis. A presença de bandas escuras utilizando como revelador cloreto férrico (FeCl_3) caracterizam a presença de compostos fenólicos na amostra, o que reforça a natureza essencialmente flavonoídica das amostras de *Faramea* (Wagner & Blatt, 1996). Ainda pode-se notar a ausência de alcalóides nessas amostras uma vez que não foram encontradas bandas características quando revelado com revelador de Dragendorff. Os resultados de prospecção para esse gênero estão de acordo com o que foi encontrado por Sauvain (1994), que evidenciou flavonóides como principais constituintes de espécies de *Faramea*.

As espécies do gênero *Rudgea* (17 a 22), demonstraram bandas de coloração violácea quando utilizado o revelador geral (anisaldeído). As bandas de Rf mais alto, aproximadamente 0,61, são indicativos de compostos de natureza terpênica, por outro lado bandas com esta mesma coloração, porém com Rf mais baixo, aproximadamente 0,17 são indicativas para saponinas devido à maior retenção sobre a sílica. Saponinas quando tratadas com anisalaldeído sulfúrico podem emitir zonas fluorescentes azuis, violetas ou verdes, como observado na placa em UV 365 nm (Wagner & Blatt, 2001). Esses dados são correspondentes aos encontrados por Lopes (1999) e Young (1998) com estudo das espécies *Rudgea jasminoides* e *Rudgea viburnioides*, respectivamente. Não foram encontradas bandas características para compostos fenólicos e alcalóides utilizando os reveladores específicos, com exceção da amostra de número 20, que tem um indicativo de alcalóide no ponto de aplicação.

As amostras da espécie *Margaritopsis* (23 e 24) demonstraram bandas com Rf alto, de aproximadamente 0,56 e 0,70 e de coloração violácea, indicativo de compostos de natureza terpênica. Terpenos, com exceção do ácido caféico e seus derivados não emitem fluorescência na região do UV. Pode-se observar também bandas retidas no ponto de aplicação da amostra, que quando reveladas com reagente de Dragendorff, apresentaram coloração alaranjada, subjetivo para presença de alcalóides na amostra. De acordo com dados da literatura, espécies desse gênero possuem essencialmente

alcalóides e flavonóides, devido ao fato de existirem ainda poucos estudos acerca da constituição química desse gênero muitos compostos ainda são desconhecidos, o que pode justificar a pequena divergência de resultado encontrada (WAGNER & BLADT, 2001; NASCIMENTO, *et al.*, 2015 a, b; BRAND, *et al.*, 2012).

Para a espécie do gênero *Alseis* (25), quando aplicado um revelador geral observa-se, sob luz visível, regiões de coloração amarela esverdeada e zonas escuras quando revelado com FeCl₃, indicando a presença de flavonóides.

Para a espécie do gênero *Geophila*, amostra 26, observam-se bandas de Rf alto, aproximadamente 0,56 e 0,70 e com coloração violácea quando aplicado revelador geral, indicativo da presença de terpenóides, ainda pode-se observar uma banda de coloração avermelhada retida no ponto de aplicação, porém com o uso dos reveladores empregados a indicação de classe de metabólito à que este composto pertence se torna inconclusiva, existindo a necessidade de utilizar outros reveladores específicos.

Para as espécies de *Simira* (amostra 27) e *Palicourea* (28), propõe-se compostos de natureza essencialmente terpênica, como no caso anterior essas amostras apresentam bandas de coloração violácea e de Rf alto que sugere a presença dessa classe de metabólitos.

Tabela 13. Compostos de metabólitos secundários presentes de forma majoritária em cada espécie.

Amostra	Extratos Metanólicos				Extratos hexânicos			
	T	F	A	S	T	F	A	S
1 a 10	-	-	+	-	+	-	-	-
11 a 16	-	+	-	-	+	-	-	-
17 a 22	+	-	+	+	+	-	-	-
23 e 24	+	-	+	-	+	-	-	-
25	-	+	-	-	+	-	-	-
26	+	-	-	-	+	-	-	-
27	+	-	-	-	+	-	-	-
28	+	-	-	-	+	-	-	-

T: terpenóides, F: flavonóides, A: Alcalóides, S: Saponinas, +: presente, -: ausente.

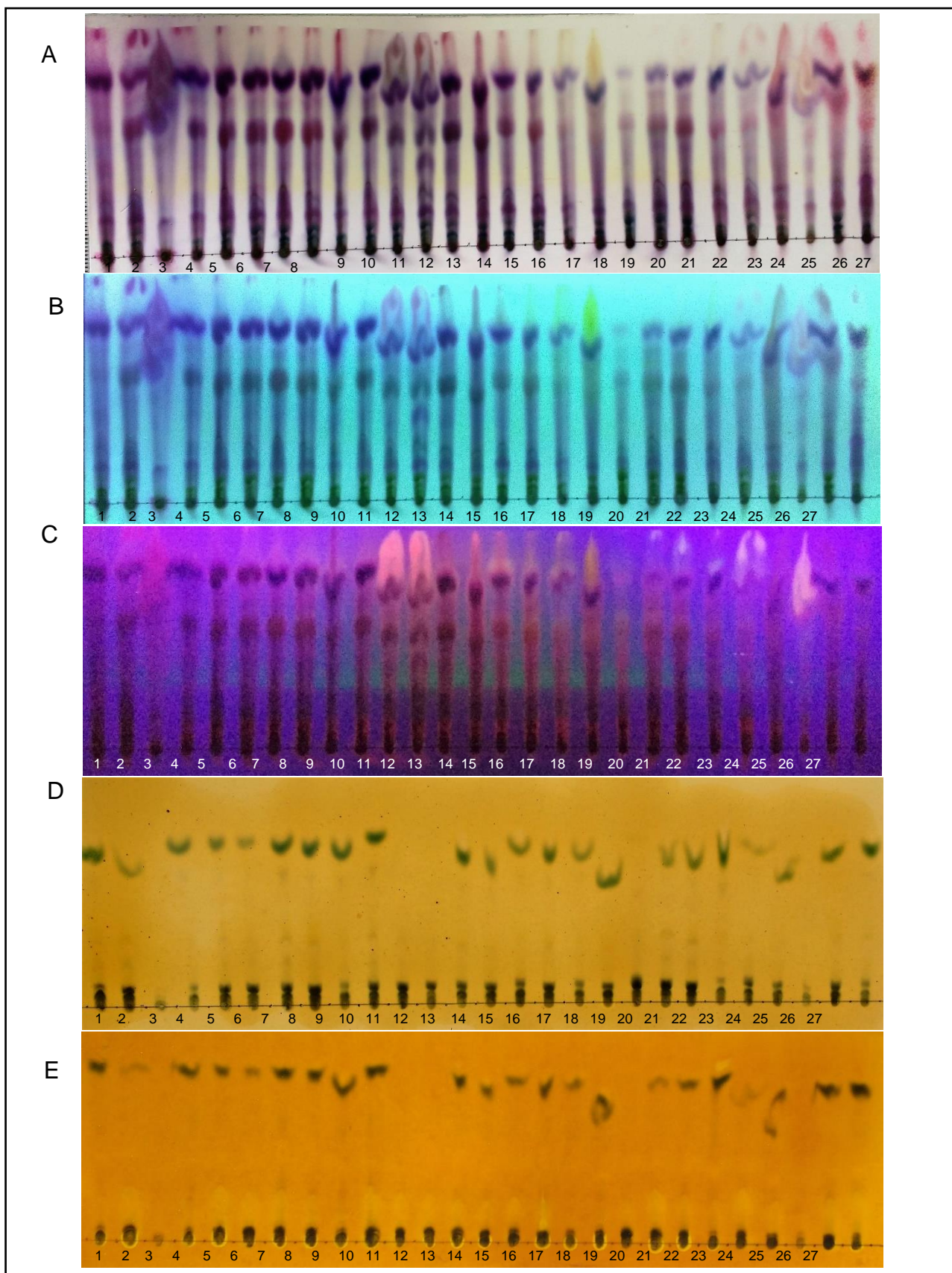


Figura 22. Análise cromatográfica (CCD) dos extratos brutos hexânicos. Fase móvel: hexano: acetato de etila (85:15), A: Revelador: anisaldeído sulfúrico, após aquecimento (100° C), B/C: visualizadas sob luz ultravioleta de 254/360 nm, D e E: Revelador: FeCl₃, Dragendorff.

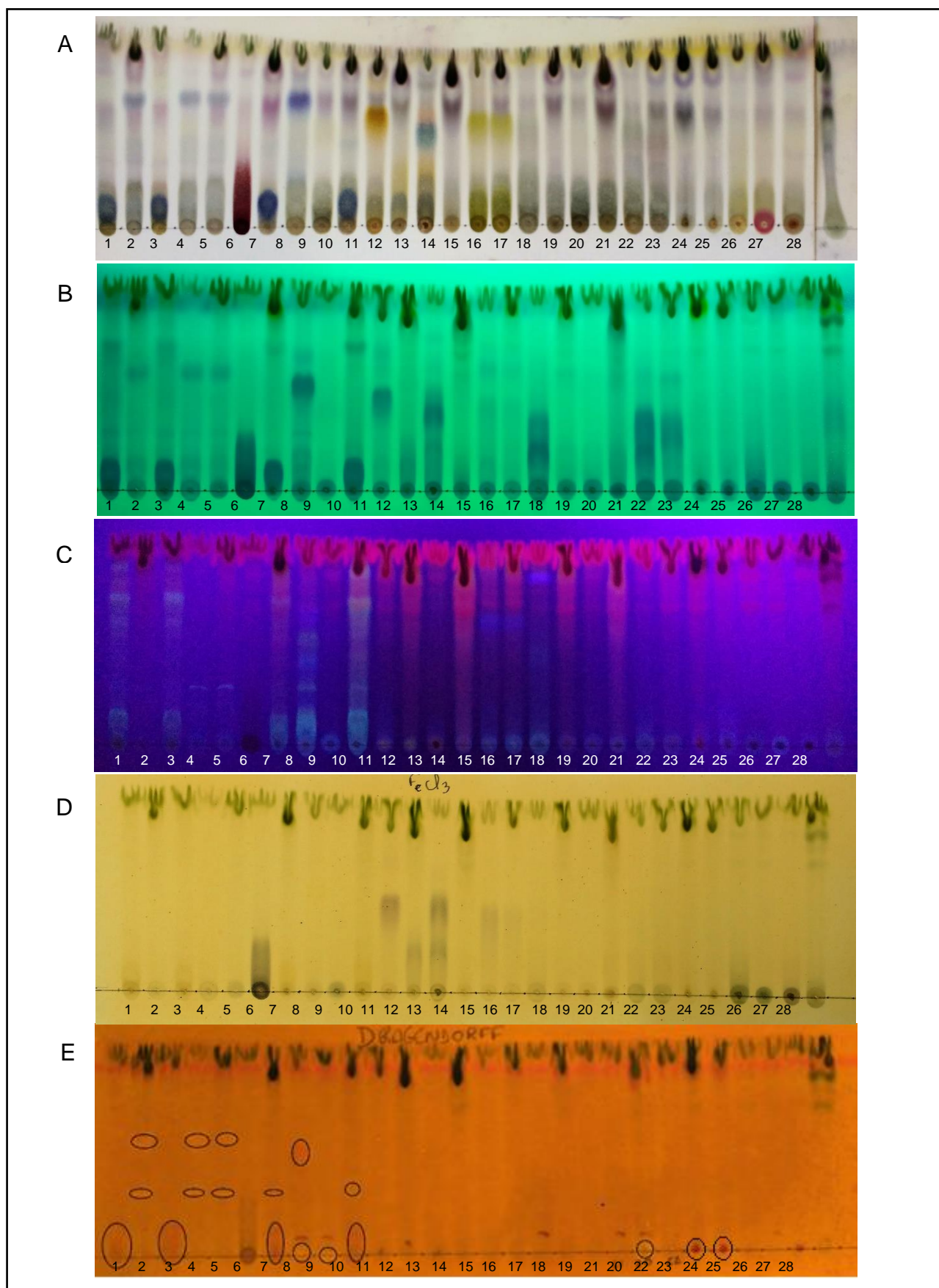


Figura 23. Análise cromatográfica (CCD) dos extratos brutos metanólicos. Fase móvel: diclorometano: metanol (80:20), A: Revelador: anisaldeído sulfúrico, após aquecimento (100°C), B/C: visualizadas sob luz ultravioleta de 254/360 nm, D e E: Revelador: FeCl_3 , Dragendorff.

4.4 Avaliação da atividade inibitória da acetilcolinesterase

Um levantamento bibliográfico realizado em diversas fontes (SciFinder scholar, Science direct, PubMed, etc) mostrou que para as espécies trabalhadas neste estudo, pesquisas de bioprospecção são ainda insipientes ou mesmo inexistentes, o que constitui em um instigante alvo de investigações químico-farmacológicas.

A atividade de AChEI de extratos de plantas, para o método espectrofotométrico, é classificada de acordo com Vinutha *et al.* (2007) como: inibidores potentes onde houver uma inibição superior a 50%, inibidores moderados com inibição de 30-50% e inibidores fracos abaixo de 30% de inibição. De acordo com essa classificação (Tabela 14), as amostras mais representativas são compostas pelos extratos metanólicos: 1 e 6 com atividade alta (57,18 e 56,67, respectivamente) e 3, 7, 10 e 24 com atividade moderada (49,46; 32,31; 35,23; 32,47, respectivamente), na concentração 400 µg/mL. Para os extratos hexânicos não houve atividade considerada promissora, segundo esse teste. Acredita-se que alguns fatores possam interferir os resultados dessa avaliação, como a baixa solubilidade das soluções de extratos hexânicos no tampão utilizado.

A cromatografia em camada delgada dos extratos brutos metanólicos e hexânicos reveladas para atividade anticolinesterásica utilizando o método de Marston *et al.* (2002), método qualitativo, mostrou quais bandas de compostos apresentam atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase. A atividade no ensaio biológico qualitativo é considerada presente (+) ou ausente (-).

Para a análise dos extratos metanólicos (figura 24) foram usados dois padrões como controle positivo, Galantamina e Tacrina, das amostras testadas as que desenvolveram uma atividade mais promissora, tomando como padrão de comparação o tamanho do halo de inibição formado, foram: 12, 13 e 20, com Rf's de aproximadamente 0,0; 0,17; 0,37, respectivamente, as demais marcadas foram classificadas com atividade média. Já para os extratos hexânicos (figura 25), pode-se notar uma região de inibição principal com Rf de aproximadamente 0,33, comum para todas as amostras. Extratos hexânicos apresentam naturalmente em sua constituição compostos com natureza de baixa polaridade, como terpenos, óleos essenciais e outras. Acredita-se que nas áreas onde houve formação de halos de inibição exista uma substância comum para as amostras testadas, diferenciando a intensidade de inibição de cada uma pela concentração desse composto na amostra.

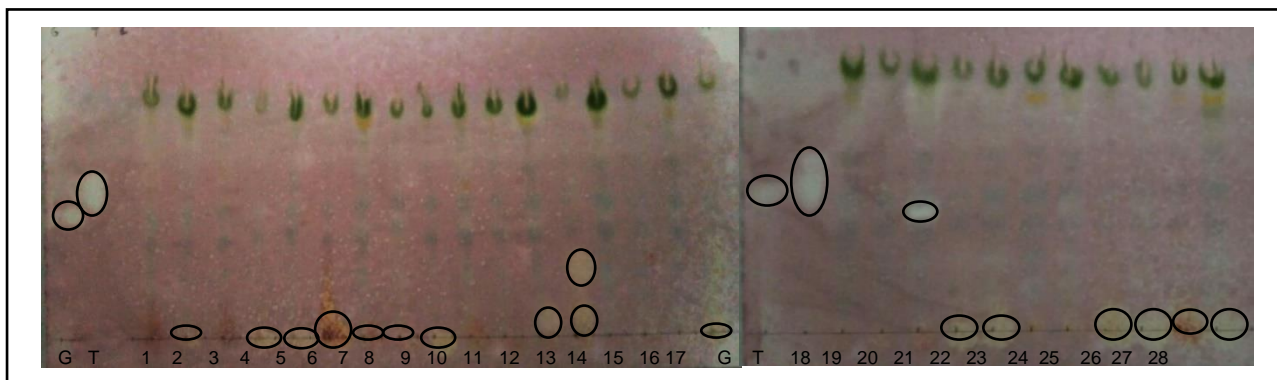


Figura 24. Ensaio qualitativo de inibição da acetilcolinesterase (AChEI). G/T: controle positivo (G: galantamina, T: Tacrina [20 µg/mL]); 1 a 28: Extratos metanólicos (segundo a ordem de aplicação constante na tabela 12; [20 mg/mL]). Sistema de eluição: diclorometano: metanol (80:20 v/v).

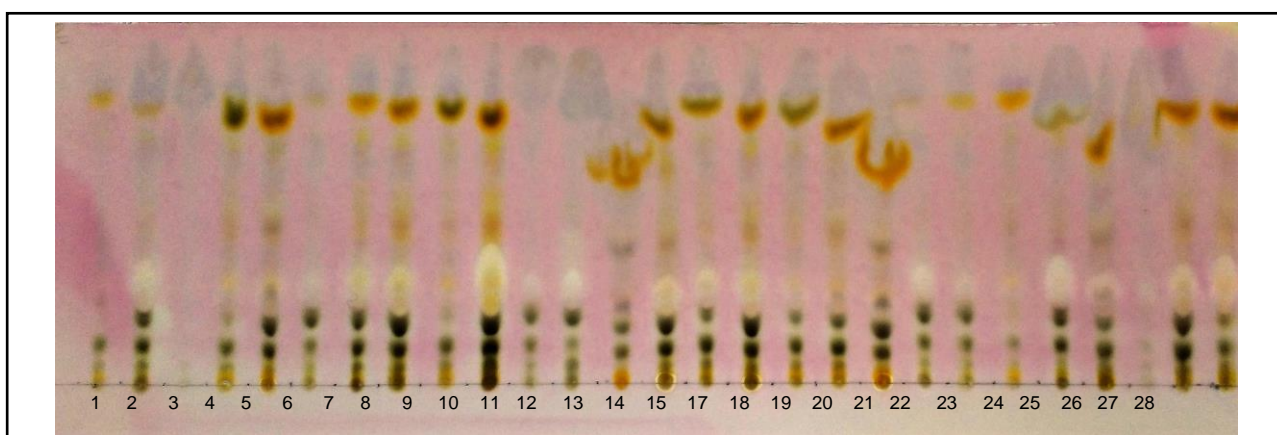


Figura 25. Ensaio qualitativo de inibição da acetilcolinesterase (AChEI). 1 a 27: Extratos hexânicos (segundo a ordem de aplicação constante na tabela 12; [20 mg/mL]). Sistema de eluição: n-hexano: Acetato de Etila (85:15 v/v).

Tabela 14. Resultados dos ensaios de AChEI para os métodos qualitativo e quantitativo.

Amostra	Extratos Metanólicos			Extratos hexânicos		
	% inibição da AchE	Intensidade de AChEI	CCD	% inibição da AchE	Intensidade de AChEI	CCD
1	57,18	Alta	-	-	Ausente	+
2	27,51	Baixa	+	7,22	Baixa	+
3	49,46	Média	-	15,91	Baixa	-
4	18,75	Baixa	+	-	Ausente	+
5	19,50	Baixa	+	6,10	Baixa	+
6	56,67	Alta	+	26,61	Baixa	+
7	32,31	Média	+	10,57	Baixa	+
8	28,44	Baixa	+	13,68	Baixa	+
9	9,53	Baixa	+	2,62	Baixa	+
10	35,23	Média	-	4,20	Baixa	+
11	19,88	Baixa	-	25,33	Baixa	+
12	24,58	Baixa	+	9,11	Baixa	+
13	13,88	Baixa	+	0,52	Baixa	-
14	19,97	Baixa	-	24,80	Baixa	+
15	19,27	Baixa	-	10,88	Baixa	+
16	21,06	Baixa	-	**	Baixa	**
17	14,84	Baixa	+	2,87	Baixa	+
18	22,60	Baixa	-	9,20	Baixa	+
19	14,37	Baixa	-	7,52	Baixa	-
20	26,75	Baixa	+	-	Ausente	-
21	19,40	Baixa	+	19,97	Baixa	+
22	15,99	Baixa	+	2,74	Baixa	+
23	18,18	Baixa	-	-	Ausente	+
24	32,47	Média	-	4,82	Baixa	+
25	21,80	Baixa	+	5,96	Baixa	+
26	25,20	Baixa	+	5,72	Baixa	+
27	8,36	Baixa	+	5,63	Baixa	+
28	21,95	Baixa	+	7,50	Baixa	+
29 - GAL	74,42	Alta	+	**	**	**
30 - TAC	97,90	Alta	+	**	**	**

Intensidade alta: destaque em sombreado forte, intensidade média: destaque em sombreado fraco. **: não testado. +: atividade presente, -: atividade ausente. Fonte: Vinutha *et al.* (2007).

Pode-se observar com as análises realizadas que os resultados de inibição foram divergentes para os dois protocolos experimentais testados (CCD e espectrofotométrico). Respostas semelhantes foram encontradas por Borba (2012) realizou um *screening* para a atividade AchEI em várias espécies vegetais, nessa avaliação os extratos metanólicos de plantas como *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e *Hymenaea courbaril* L. demonstraram uma alta atividade no método em CCD (+++) e atividade média-baixa no teste em microplaca (37,51 e 18,19 % inibição, respectivamente).

Esse fato pode ser explicado pelas hipóteses postuladas por Giovanni *et al.* (2008), neste trabalho foram testados 138 compostos frente a inibição da enzima AchE,

destes 15% foram classificados como ativos com o ensaio de microplaca, mas mostraram-se inativos por CCD e cerca de 2% foram medidos ativos por CCD mas mostraram ser inativos com o ensaio de microplaca. Os autores destacam que as diferenças dos resultados não estão relacionadas à classe química dos compostos analisados, muito menos devida a diferença do método colorimétrico utilizado.

Contudo, quando avaliado as diferenças no processo experimental, os compostos ativos, em solução, no método em microplaca que não desenvolveram atividade em CCD (15%) foi evidenciada uma influência da pré-incubação sobre sua atividade. Foi observado que, quando o método em microplaca era sujeito a uma pré-incubação, 10 dos compostos que eram anteriormente ativos (e inativos em TLC) tiveram uma diminuição importante de sua atividade, com percentagens de inibição resultantes inferiores a 50%. Por conseguinte, a sua perda de atividade durante a pré-incubação parece estar relacionada à degradação que esses compostos sofrem ao permanecer pelo tempo da incubação em solução tampão aquosa de pH 7,4.

Para o ensaio em CCD, os mesmos resultados foram encontrados com e sem utilização da pré-incubação, demonstrando que esse não é um fator interferente para os compostos ativos neste ensaio. Contudo, como pressuposto anteriormente, como os compostos ativos em microplaca sofreram degradação, os mesmos não poderiam ser observados na CCD, conseqüentemente, a influência da pré-incubação sobre a atividade desses compostos não pôde ser reproduzida pela CCD (GIOVANNI, *et al.*, 2008).

Mesmo que a instabilidade das substâncias em solução tampão não causasse a perda de atividade no processo de pré- incubação, ainda pode ocorrer interação dos compostos e da enzima AchE com a sílica da placa de CCD. De fato, a adsorção da AChE em placas de sílica pode resultar numa alteração da conformação da enzima e, como consequência, na acessibilidade alterada da enzima para inibidores. De fato, um comportamento cinético diferente da AChE entre estados imobilizado e livre foi relatado por outros autores (BARTOLINI, *et al.*, 2005; SAHIN, *et al.*, 2005) e mudanças estruturais no nível secundário e terciário na adsorção em superfícies de sílica foram também relatadas para outras enzimas (KOUTSOPOULOS, *et al.*, 2007).

No presente caso, a adsorção de AChE sobre sílica resultaria numa conformação menos favorável para interação com os seis compostos que se mostraram inativos por CCD embora fossem identificados como ativos em solução e, por outro lado, numa conformação mais favorável para interação com os três compostos que foram mais ativos por CCD do que com o ensaio de microplaca.

Segundo Giovanni *et al.* (2008), ambos os ensaios de rastreio para a atividade inibitória de AChE utilizados são considerados adequados para a identificação de novos ativos. O ensaio de CCD é vantajoso para o rastreio de extratos brutos de plantas, uma vez que permite a separação e a detecção de compostos ativos ao mesmo tempo. Isto permite um fácil acompanhamento do processo de isolamento e purificação. O ensaio de microplacas é mais apropriado para o rastreio de bibliotecas de compostos naturais sintéticos e / ou isolados, uma vez que permite a possibilidade de automatização e o fácil manuseamento de grandes quantidades de amostras.

4.4.1 Avaliação da atividade inibitória da acetilcolinesterase sobre os extratos ativos

Com base nos resultados obtidos nos testes preliminares, os extratos metanólicos (EM) de *Psychotria 1*, *Psychotria 3*, *Psychotria carthagenensis*, *Psychotria stellaris*, *Psychotria octocusps* e *Margaritopsis cephalantha* foram selecionados para estudos de relação dose-atividade e cálculo do IC_{50} (figura 26).

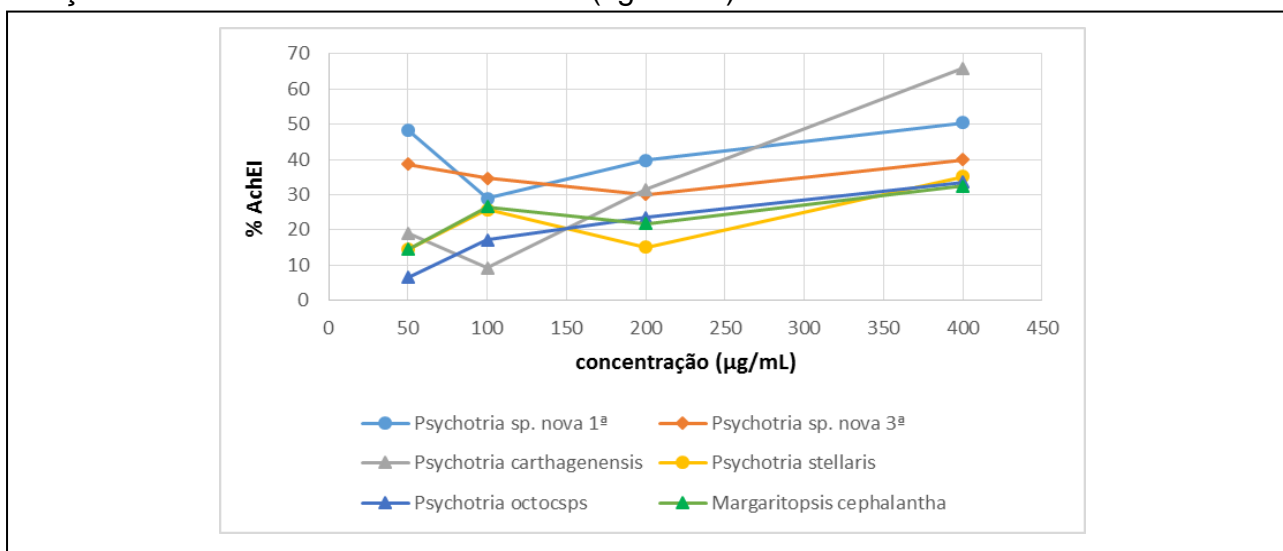


Figura 26. Avaliação quantitativa da atividade anticolinesterásica das amostras ativas (50-400 µg/mL). Os valores foram expressos como médias + erro padrão das médias (em % de inibição da AChE). Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica.

Das seis amostras testadas, a que se mostrou mais ativa no ensaio quantitativo foi a *Psychotria carthagenensis* (IC_{50} = 309,17 µg/mL), seguida pela *Psychotria 1* (IC_{50} = 381,32 µg/mL), *Psychotria octocusps* (IC_{50} = 611,8 µg/mL), *Psychotria stellaris* (IC_{50} = 759,5 µg/mL), *Margaritopsis cephalantha* (IC_{50} = 845,4 µg/mL), *Psychotria 3* (IC_{50} = 918,73 µg/mL).

Dados da literatura acerca de estudos de substâncias inibidoras da acetilcolinesterase mostram resultados significativos para ambos os tipos de extratos. Em um estudo realizado por Cabral (2011) com a espécie *Conchocarpus fontanesianus* (A.

St.-Hil.) Kallunki & Pirani evidenciou-se que as frações de alcalóides totais e hexânica foram as que demonstraram maior atividade no teste em CCD quando comparadas com o extrato etanólico bruto. Já para o teste em microplaca o extrato etanólico reduziu a atividade da AChE em 51,23%, a fração hexânica em 54,94% e a fração de alcalóides totais reduziu a atividade da AChE em 71,08%, nessa fração o composto que se mostrou mais ativo no ensaio quantitativo foi o alcalóide esquimianina. Machado, *et al.*, 2015, estudando a atividade anticolinesterásica de algas marinhas, evidenciou que o extrato DCM/MeOH de *Ochtodes secundiramea* (Montagne) M.A. Howe foi capaz de inibir a enzima em 48%, sendo essa atividade relacionada com a presença, de apenas, monoterpenos no extrato. Em um trabalho realizado por Cardoso-Lopes *et al.* (2010), foi avaliada a atividade anticolinesterásica dos compostos purificados da fração de alcalóides totais dos ramos caulinares de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae), sendo o alcalóide mais ativo a leptomerina (IC₅₀= 2,5µM), com potencial inibitório próximo aos compostos de referência fisostigmina (IC₅₀=0,4µM) e galantamina (IC₅₀= 1,7µM).

Segundo a literatura as classes de metabólitos mais promissoras para obtenção de compostos com atividade AchEI são os alcalóides seguidos por classes de terpenóides (Barbosa-Filho, *et al.*, 2006). Essas evidências corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, pois acredita-se que os extratos metanólicos que desenvolveram maior atividade sejam compostos majoritariamente por alcaloides e os extratos hexânicos que apresentaram atividade, compostos por terpenos, considerando a constituição química descrita pela literatura para estas espécies e as avaliações fitoquímicas preliminares.

2.1 Análise de dados

De acordo com o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Bartlett à um nível de 5% de significância, os resíduos podem ser considerados normais e com variâncias homogêneas, respectivamente. Ao se avaliar a porcentagem de inibição, a análise de variância detectou diferença significativa entre os tratamentos, a 5% de probabilidade (p valor = $1,5345e^{-36}$). De acordo com o teste de comparação de médias (figura 27 e tabela 15) os melhores tratamentos foram: 30 (Tacrina), 29 (Galantamina), 1 (*Psychotria* 1), 6 (*Psychotria carthagenensis*), 3 (*Psychotria* 3), 10 (*Psychotria stelar*is), 24 (*Margaritopsis cephalantha* 2) e 7 (*Psychotria octocusp*s), respectivamente.

Tabela 15. Comparação de médias dos extratos metanólicos (400µg/mL) segundo o teste de scott knott, média da porcentagem de inibição e desvio padrão.

Tratamento	Média (% inibição)	Desvio Padrão
1 c	57,18	3,57
2 f	27,51	2,02
3 d	49,46	3,67
4 g	18,75	4,02
5 g	19,50	8,24
6 c	56,67	1,59
7 e	32,31	3,37
8 f	28,44	3,39
9 h	9,54	4,70
10 e	35,23	4,58
11 g	19,88	8,01
12 f	24,58	6,19
13 h	13,88	4,57
14 g	19,97	4,62
15 g	19,27	7,60
16 g	21,06	1,43
17 h	14,85	2,82
18 g	22,60	2,89
19 h	14,37	5,22
20 f	26,75	3,01
21 g	19,40	1,43
22 h	16,00	0,53
23 g	18,19	0,89
24 e	32,47	3,71
25 g	21,80	3,10
26 f	25,20	4,05
27 h	8,36	0,40
28 g	21,95	3,00
29 b	74,42	2,07
30 a	97,90	0,35

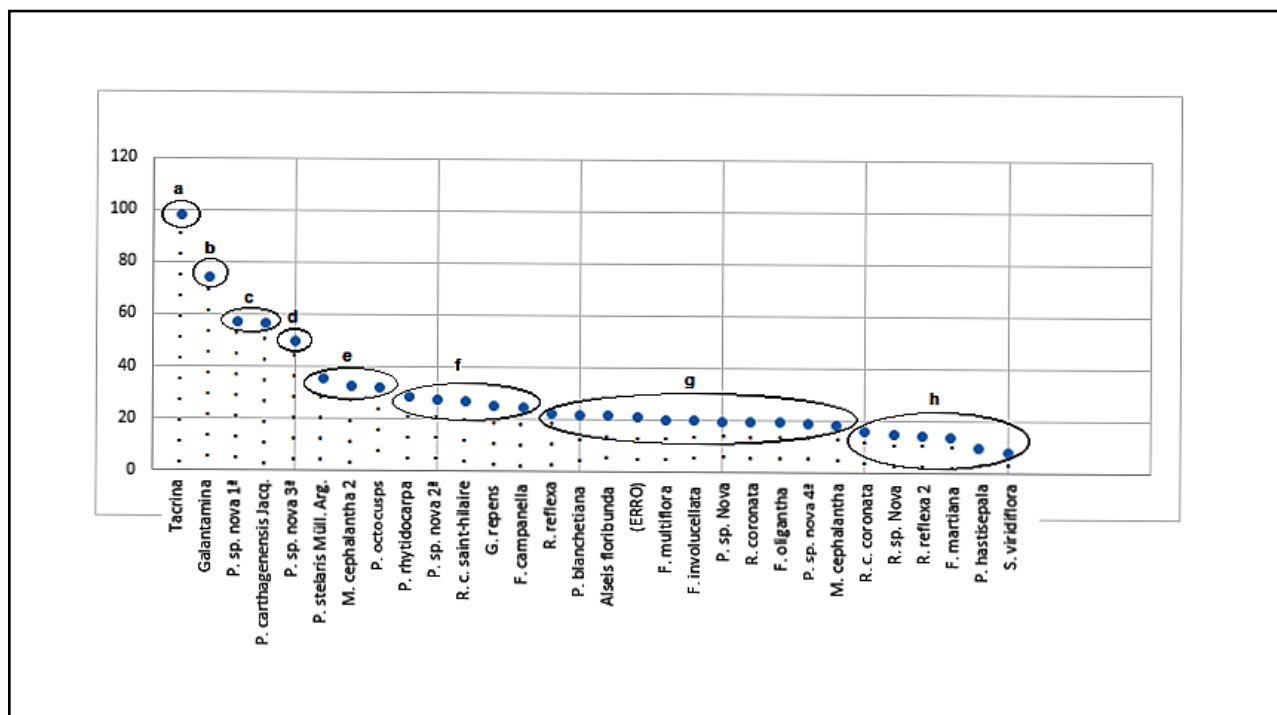


Figura 27. Agrupamento dos tratamentos segundo o teste de Scott Knott.

As médias de inibição entre os tratamentos seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si segundo o teste de Scott & Knott a 5% de significância. A análise completa encontra-se no apêndice.

3. CONCLUSÃO

Conclui-se que dentre as vinte e cinco espécies referidas no trabalho cinco apresentaram atividade anticolinesterásica importante: *Faramea campanella*, *Faramea martiana*, *Psychotria carthagenensis*, *Psychotria 1* e *Rudgea coronata saint-hilaire*, o que viabiliza estudos posteriores de isolamento e purificação para elucidação estrutural dos ativos vegetais presentes. Esses compostos tornam-se candidatos úteis para a obtenção de novos modelos de fármacos anticolinesterásicos.

4. REFERÊNCIAS

ADJIBADE, Y.; WENIGER, B.; QUIRION, J. C.; KUBALLA, B.; CABALION, P.; ANTON, R. Dimeric alkaloids from *Psychotria forsteriana*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 317-319, 1992.

ALDUNATE, R. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain Research Reviews**, v. 47, p. 96-104, 2004.

ALMEIDA, J.R. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em mal de Alzheimer**. Ribeirão preto, 2011. 145f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Ribeirão preto, USP, 2011.

ALVES, C.C.F.; CRANCHI, D.C.; CARVALHO, M.G.; SILVA, S.J. Triterpenes, glucosyl steroid and alkaloid isolated from *Simira glaziovii*. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n.1, p.174 - 179, 2001.

ALVES, V.G.; ROSA, E.A.; ARRUDA, L.L.; ROCHA B.A.; BERSANI A.C.A.; SANTIN, S.M.; POMINI, A.M.; SILVA, C.C. Acute toxicity, antiedematogenic activity, and chemical constituents of *Palicourea rigida* Kunth. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 71, n. 3-4, p. 39-43, 2016.

ANDRADE, M.T.; LIMA, J.A.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M.; CARVALHO, M.P.; EPIFANIO, R.A. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Muell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4092-4095, 2005.

ARAÚJO, M.F.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M.G.; VIEIRA, I.J.C. Other compounds isolated from *Simira glaziovii* and the ¹H and ¹³C NMR chemical shift assignments of new 1-epi-castanopsol. **Química Nova**, v. 35, n.11, p. 2202-2204, 2012.

ARAÚJO, M.F.; CURCINO, V.I.J.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M.G. Simiranes A and B: erythroxylenes diterpenes and other compounds from *Simira eliezeriana* (Rubiaceae). **Natural Product Research**, v. 25, n.18, p. 1713-9, 2011.

ARNASON, T.; MORAND, P.; SALVADOR, J.; REYES, I.; LAMBERT, J.; TOWERS, N. Phototoxic substances from *Flaveria trinervis* and *Simira salvadorensis*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 594-595, 1983.

ARTEAGA DE GARCIA LUCIA; TOBON, CARLOS FRANCISCO; MORA, CAMPO ELIAS

BARBOSA-FILHO, J.M.; MEDEIROS, K.C.P.; DINIZ, M.F.; BATISTA, L.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 258–285, 2006.

BARTOLINI, M.; CAVRINI, V.; ANDRISANO, V. Batchwise covalente immobilization of human acetylcholinesterase: kinetic and inhibition spectrophotometric studies. **Analytical Biochemistry**. v. 342, p.163–166, 2005.

BASTOS, A.B.F.D'O.; CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; BRAZ-FILHO, R. Chemical Constituents from *Simira glaziovii* (K. Schum) Steyerm. And ¹H and ¹³C NMR Assignments of Ophiorine and its Derivates. **Quimica Nova**, v. 25, n. 2, p. 241-245, 2002.

BATMAZ, H.; SUZER, F.; KENNERMAN, E.; YILMAZ, Z. Myasthenia Gravis em a Dog. **Tr. Journal of veterinary and animal sciences**. Turquia, n. 22, 1998.

BENEVIDES, P.J.C.; YOUNG, M.C.M.; BOLZANI, V. S. Biological activities of constituents from *Psychotria spectabilis*. **Pharmaceutical Biology**, v.42, n. 8, p. 565- 569, 2008.

BERETZ, A.; ROTH-GEORGER, A.; CORRE, G.; KUBALLA, B.; ANTON, R.; CAZENAVE, J. Polyindolinic alkaloids from *Psychotria forsteriana*. Potent inhibitors of the aggregation of human platelets. **Planta medica**, v. 4, p. 300- 303, 1985.

BERGER, A.; FASSHUBER, H.; SCHINNERL, J.; BRECKER, L.; GREGER H. Various types of tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea acuminata* (=Psychotria acuminata, Rubiaceae), **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 558–562, 2012.

BERGER, A.; FASSHUBER, H.; SCHINNERL, J.; BRECKER, L.; GREGER, H. Various types of tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea acuminata* (=Psychotria acuminata, Rubiaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 558-562, 2012.

BOKESCH, H. R.; PANNELL, L. K.; COCHRAN, P. K.; SOWDER, R. C.; MCKEE, T.C.; BOYD, M. R. A novel anti-HIV macrocyclic from *Palicourea condensata*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 249-250, 2001.

BOKESCH, H.R.; PANNELL, L.K.; COCHRAN, P.K.; SOWDER, R.C.; MCKEE, T.C.; BOYD, M.R. A novel anti-HIV macrocyclic from *Palicourea condensata*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 249-250, 2001.

BOLZANI, V. S.; YONG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; LOPES, M. N. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomical and biological significance. **Recent Research Development in Phytochemistry**, v. 5, p. 19-31, 2001.

BORBA, V.F.C. **Avaliação in vitro da atividade anticolinesterásica de plantas medicinais nativas da caatinga**. Recife/PE, 2012. 63f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Recife/PE, 2012.

BOTH, F. L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. Psychopharmacological profile of the alkaloid Psychollatine as a 5HT_{2A/C} serotonin modulator. **Journal of Natural Products**, v.68, p. 374-380, 2005.

BOTH, F.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELYZABETSKY, E. Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 5, p. 336-341, 2002.

BRAND, G.; HENRIQUES, A.T.; PASSOS, C. S.; BALDOQUI, D. C.; SANTIN, S. M. O.; COSTA W. F.; SARRAGIOTTO M. H. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Margaritopsis cymuligera* (Muell. Arg.) C.M. Taylor (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 155–157, 2012.

BREAZILE, J.E. Fisiologia do musculo esquelético. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes Fisiologia dos animais domésticos**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996.

BREMER, B. A review of molecular phylogenetic studies of rubiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, V. 96, n.1, p. 4-26, 2009.

CABRAL, R.S. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anticolinesterásica de *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani (Rutaceae)**. São Paulo, 2011. 86f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São paulo, 2011.

CALLAWAY, J. C., BRITO, G. S.; NEVES, E. S. Phytochemical analyses of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 37, n. 2, p. 145-150, 2005.

CAPASSO, A.; AQUINO, R.; DE TOMMASI, N.; PIACENTE, S.; RASTRELLI L.; PIZZA, C. Neuropharmacology Activity of Alkaloids from South American Medicinal Plants. **Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents**, v. 2, p. 1-15, 2002.

CARDOSO-LOPES, E.M; MAIER, J.A.; SILVA, M.R.; REGASINI, O.; SIMOTE, S.Y.; LOPES, N.P.; PIRANI, J.R.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M. Alkaloids from Stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as Potential Treatment for Alzheimer Disease. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9205-9213, 2010.

CARVALHO, A. C. T. **Estudo fitoquímico de *Psychotria colorata* (Willd. Ex R. & S.) M. Arg. utilizando a metodologia etnofarmacológica**. Belém; Universidade Federal do Pará, 1993.

CASTRO, O; LOPES, V. J. Harman, the principal alkaloid in roots of *Simira maxonii* Standley (Rubiaceae). **Ing. Ciência Química**, v.10, n. ¾, p.56-57, 1986.

CHRISMAN, C. **Neurologia dos pequenos animais**. 1ed. São Paulo: Roca, 2005. 333p.

COELHO, E.G.; AMARAL, A.C.F.; FERREIRA, J.L.P.; SANTOS, A.G.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA J.R.A. Calcium oxalate crystals and methyl salicylate as toxic principles of the fresh leaves from *Palicourea longiflora*, an endemic species in the Amazon state. **Toxicon**, v. 49, p. 407-409, 2007.

CONTI-FINE, B.M.; MILANI M.; KAMINSKI H.J. Myasthenia gravis: past, present, and future. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n.11, 2006.

CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloides in drug Discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

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.

DELPRETE, P.G.; SMITH, L.B.; KLEIN, R.M. Rubiaceae. p. 345-842, In: Reitz, R., **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, Brasil: Herbário “Barbosa Rodrigues”, 2005.

DEWEY, C.W. Acquired Myasthenia Gravis in Dogs- Part I. **Compendium of continuing education for the practicing veterinarian**, v. 19, n.12, 1997.

DUSMAN, L. T.; JORGE, T. C. M.; SOUZA, M. C.; EBERLIN, M. N.; MEURER, E. C.; BOCCA, C. C.; BASSO, E. A.; SARRAGIOTTO, M. H. Monoterpene Índole Alkaloids from *Palicourea crocea*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1886-1888, 2004.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; ALBUQUERQUE, R. R.; NUNES, D. S.; CARVALHO, A. C. T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**, v.48, n.2, p. 77-83, 1995.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M.A. New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. **Biochemical Pharmacology**, 7, 88, 1961.

EL-SEEDI, H. R. Coumarins, benzoic acids and terpenoids from *Palicourea demissa*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 27, n.1, p. 13-16, 1999.

FARIAS, F.M. ***Psychotria myriantha* Müll. Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcaloides e avaliação da atividade antiqumiotóxica e sobre o sistema nervoso central**. Porto Alegre, UFRGS, 2006. 191f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FERRARI, F.; MONACHE, G. D.; LIMA R. A. Two naphthopyran derivatives from *Faramea cyanea*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 11, p. 2753-2755, 1985.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB210>>. Acesso em: 18 Ago. 2017.

FRAGOSO, V. **Alcaloides de *Psychotria*: fotorregulação e propriedades antioxidantes e antimutagênicas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

FU, Y.H.; HUANG, L.G.; WANG, X.C.; LI, X.B.; LI, K.K.; WU, S.L.; LIU, Y.P. Studies on chemical constituents from *Psychotria straminea*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 40, n. 11, p. 2138-43, 2015.

GADÊLHA, K.M.; OLIVEIRA, I.V.P.M.; MACÊDO, L.B; PIMENTEL, M.M.L.; CALADO, E.B.; COSTA, M.T.; FILGUEIRA K.D. Miastenia gravis canina: Um diagnóstico diferencial para doenças infecciosas de origem neurológica. Relato de Caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, n.4, 665-674, 2015.

GALARDIS, M. M. B.; RODRIGUEZ E. T.; ESPINOSA R. H. Phytochemical screening of extracts from *Faramea occidentalis* (L.) A. Rich. (nabaco). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 1, p.421-432, 2014.

GARCIA, L.A.; TOBON, C.F.; MORA, C.E. Cytotoxicity of the constituents of *Palicourea ovalis*. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas**, v. 26, p.55–57, 1997.

GARCIA, L.A.; TOBÓN, C.F.; MOURA, C.E. Citotoxicidad de los componentes de *P. ovalis*. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas**, n. 26, 1997.

GARCIA, R. M. A.; OLIVEIRA, L. O.; MOREIRA, M. A.; BARROS, W. S. Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 233-243, 2005.

GIOVANNI S.; BORLOZ A.; URBAIN A.; MARSTON A.; HOSTETTMANN K.; CARRUPT P.; REIST M. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. **European journal of pharmaceutical sciences**. v. 33, p. 109–119, 2008.

GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GOLAN, D.E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GRINGAUZ, A. **Introduction to medicinal chemistry**: How drugs act and why. New York: Wiley-VCH, 1997. 699p.

GUÉRITTE-VOEGELEIN, F., SÉVENET, T.; PUSSET, J.; ADELIN, M.; GILLET, B.; BELOEIL, J.; GUÉNARD, B.; POTIER, P. Alkaloids from *Psychotria oleoides* with activity on growth hormone release. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 7, p. 923-930, 1992.

GUERRA, R.A.T.; LUCHIARI, A.C.; SANTOS, C.B.; MEDEIROS, L.G.S.; LOPEZ, L.C.S.; GEGLIO, P.C.; FARIAS, S.T.; QUIRINO, Z.G.M. **Cadernos Ciências Biológicas virtual 5**: Fisiologia humana e animal comparada. João Pessoa: Ed. Universitária, 2010. 422p.

HAREL, M.; SCHALK, I.; EHRET-SABATIER, L.; BOUET, F.; GOELDNER, M.; HIRTH, C.; H AXELSEN, P.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proceedings of the national academy of sciences of the United states of America**, v. 90, n. 19, p. 9031–9035, 1993.

HASBUN, C.P.; CALDERON, M.; CASTRO, O.; GÁCS-BAITZM, E.; MONACHEN, G.D.; MONACHE F.D. Maxonine, a novel alkaloid from *simira maxonii*. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n.45, p. 6199-6202, 1989.

HEINRICH, M.; TEOH, H.L. Galantamina from snowdrop- the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 147-162, 2004.

HIROYUKI, T.; TAKEDA, Y.; HIROSHI, N.; KANOMI, A.; OKUDA, T.; PUFF, C. Chemotaxonomic Studies of Rubiaceae Plants Containing iridoid Glycosides. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2591-2598, 1988.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

HOUGHTON, P.J.; AGBEDAHUNSI, J.M.; ADEGBULUGBE, A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2893-2896, 2004.

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

JANNIC, V.; GUÉRITTE, F.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; MARTIN, M.; SÉVENET, T.; POTIER, P. Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria oleoides* and *Psychotria lyciiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 838-843, 1999.

JUEL, V.C.; MASSEY J.M. Autoimmune Myasthenia Gravis: Recommendations for Treatment and Immunologic Modulation. **Curr Treat Options Neurol**. v. 7, n. 1, 2005.

JUNIOR, C.V.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

KEMMERLING, W. Toxicity of *Palicourea marcgravii*: combined effects of fluoracetate, N-methyltyramine and 2-methyltetrahydro- β -carboline. Z. Naturforsch. Teil. B Anorg. **Chemical Organic Chemistry**, v. 51, p. 59-64, 1996.

KERBER, V. A.; PASSOS, C. S., VERLI, H., FETT-NETO, A. G.; QUIRION, J. P.; HENRIQUES, A. T. Psychollatine, a glucosidic monoterpene indole alkaloid from *Psychotria umbellata*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 697–700, 2008.

KORNEGAY, J.N.; LORENZ, M.D. **Neurologia Veterinária**. 4ed. São Paulo: Manole. 2006.

KOUTSOPOULOS, S.; PATZSCH, K.; BOSKER, W.T.E.; NORDE, W. Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. **Langmuir**. v. 23, p. 2000–2006, 2007.

LAJIS, N. H.; MAHMUD, Z.; TOIA, R. F. The alkaloids of *Psychotria rostrata*. **Planta medica**, v. 59, n. 4, p. 383-4, 1993.

LEMAIRE, I.; ASSINEWE, V.; CANO, P.; AWANG, D.V.C.; ARNASON, J.T. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 109 - 115, 1999.

LIANG, Y.Q.; TANG, X.C. Comparative effects of huperzine A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholine level and acetylcholinesterase activity in rats. **Neuroscience Letters**, v. 361, p. 56-596, 2004.

LIBOT, F.; MIET, C.; KUNESCH, N.; POISSON, J.E. Rubiaceés D'océanie: Alcaloides de *Psychotria oleoides* de Nouvelle-Calédonie et de *Calycodendron milnei* du Vanatu (Nouvelles-Hébrides). **Journal of natural products**, v. 50, n. 3, p. 468-473, 1987.

LOPES, S.; VON POSER, G.L.; KERBER, V.A.; FARIAS, F.M.; KONRATH, E.L.; MORENO, P.; SOBRAL, M.E.; ZUANAZZI, J. A.S.; HENRIQUES, A.T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.1187–1195, 2004.

LOPESA, M.N.; MAZZAA, F.C.; YOUNGB, M.C.M.; BOLZANIA, V.S. Complete Assignments of ¹H and ¹³C-NMR Spectra of the 3,4-seco-Triterpene Canaric Acid isolated from *Rudgea jasminoides*. **Journal of the brazilian chemical society**, v. 10, n. 3, p. 237-240, 1999.

LUO, Y.; LI, G.; LI, G.; YAN, J.; YI, J.; ZHANG, G. Discovery and Identification of 2-Phenylethyl 2,6-Dihydroxybenzoate as a Natural Lipid-Lowering Lead. **Planta medica**, v. 77, n. 18, p. 2047-2049, 2011.

MACHADO, L.P.; CARVALHO, L.R.; YOUNG, M.C.M.; CARDOSO-LOPES, E.M.; CENTENO, D.C.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; COLEPICOLO, P.; YOKOYA N.S. Evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity of Brazilian red macroalgae organic extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 657–662, 2015.

MAGNIE, M. N.; THOMAS, P. **Terapêutica**. In: Doença de Alzheimer. 3. ed. São Paulo: Organização Andrei; 1998, p. 111-125.

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, p. 51-54, 2002.

MARTINS, R.E. **Miastenia Grave adquirida em cães**. 2013. 29f. Monografia (graduação em medicina veterinária) - Universidade do Rio Grande do Sul-Faculdade de veterinária, Porto Alegre, 2013.

McKENNA, D.J.; TOWERS, G. H. N.; ABBOTT, F. Monoamine oxidase inhibitors in south American hallucinogenic plants: tryptamine and -carboline constituents of Ayahuasca. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, p. 195-223, 1984.

MENDES, N.M.; PEREIRA, J.P.; SOUZA, C.P.; OLIVEIRA, M.L.L.; Ensaio preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. **Revista saúde pública**, v. 18, p. 348-354, 1984.

MENDOZA, H.; RAMÍREZ, B. R.; JIMENÉZ, L. C. 2004. **Rubiaceae de Colombia**: Guía Ilustrada de Géneros. Bogotá, Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

MORAES, A. P. **Alcaloides indólicos das partes aéreas de *Psychotria sp.* (RUBIACEAE) e síntese de tiohidantoínas e tioureias derivadas de aminoácidos e do r-(+)-limoneno**. Goiânia, UFG, 2013. 170f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

MORENO, B. P.; FIORUCCI, L. L. R.; CARMO, M. R. B.; SARRAGIOTTO, M. H.; BALDOQUI, D. C. Terpenoids and a coumarin from aerial parts of *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 80-82, 2014.

MORITA, H.; ICHIHARA, Y.; TAKEDA, K.; WATANABE, K.; ITOKAWA, H.; MOTIDOME, M. A new índole alkaloid glycoside from the leaves of *Palicourea marcgravii*. **Planta medica**, v. 55, p. 288-289, 1989.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T. **Botânica Econômica Brasileira**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., p. 152 e 179, 1995.

MOYES, C.D.; SCHULTE, P.M. **Princípios de Fisiologia Animal**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 792p.

MYERS N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAKANO, T.; MARTIN, A. Studies on the alkaloids of *Palicourea fendleri*. **Planta medica**, v. 30, n. 2, p. 186-188, 1976.

NASCIMENTO, C. A.; GOMES, M. S.; LIÃO, L. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; SILVA, C. C.; TANAKA, C. M. A. Alkaloids from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 61, p. 1443 – 1446, 2006.

NASCIMENTO, N.; FRAGOSO, V.; MOURA, D. J.; SILVA, A. C. R.; FETT-NETO, A. G.; SAFFI, J. Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.48, p. 728-734, 2007.

NASCIMENTO, R. R. G.; MONTEIRO, J. A.; PIMENTA, A. T. A.; TREVISAN, M. T. S.; BRAZ-FILHO, R.; SOUZA, E. B.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S. New flavonoids from *Margaritopsis carrascoana* with antioxidant activity. **Química Nova**, v.38, n.1, p. 60-65, 2015 b.

NASCIMENTO, R. R. G.; PIMENTA, A. T. A.; NETO, P. L.; JUNIOR, J. R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; FERREIRA, E. G.; TINOCO, L. W.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S. New Alkaloids from *Margaritopsis carrascoana* (Rubiaceae). **Journal of the brazilian chemical society**, v. 26, n. 6, p. 1152-1159, 2015 a.

NELSON, R.W.; COUTO, C.C. **Medicina interna de pequenos animais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, 1468 p.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

PAUL, J. H. A.; MAXWELL, A. R.; REYNOLDS, W. F. Novel bis(monoterpenoid) indole alkaloids from *Psychotria bahiensis*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 752-754, 2003.

PORTO, D. D.; HENRIQUES, A. T; FETT-NETO A. G . Bioactive alkaloids from South American *Psychotria* and related species. **The Open Bioactive Compounds Journal**, v. 2, p. 29-36, 2009.

PUBCHEM- Open chemistry database. Pyridostigmine bromide. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7550>>. Acesso em: 04/12/2016.

PURVES, D.; WILLIAMS, S.M. **Neuroscience**. 2^a Ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2001.

QUINN, P.J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; LEONARD F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005, cap. 16, p. 94-98.

RHEE, I. K. *et al.* 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.

RHEE, I.K.; VAN RIJN, R.M.; VERPOORTE, R. Qualitative Determination of False-positive Effects in the Acetylcholinesterase Assay using Thin Layer Chromatography. **Phytochemical Analysis**, 14, p. 127-131, 2003.

ROBBRECHT, E. **Tropical woody Rubiaceae**: Characteristic features and progressions. Contribution to a new subfamilial classification. *Opera Botanica Belgica*, v. 1, p. 599–602. 1988.

ROSA, E.A.; SILVA, B.C.; SILVA, F, M.; TANAKA, C. M. A.; PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C.C. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010.

ROSS, S.A.; ZAGLOUL, A.; NIMROD, A.C.; MEHMEDIC, Z.; ELSOHLY, H.N. A cytotoxic chalcone from *Faramea salicifolia*. **Planta medica**. v. 65, n. 2, p. 194, 1999.

ROSSETTO, O.; MEGIGHIAN A.; SCORZETO M.; MONTECUCCO C. Botulinum neurotoxins. **Toxicon**, v. 67, p. 31-36, 2013.

ROTH, A.; KUBALLA, B.; BOUNTHANH, C.; CABALION, P.; SEVENET, T.; BECK, J. P.; ANTON, R. Cytotoxic activity of polyindoline alkaloids of *Psychotria forsteriana* (Rubiaceae) : (1). **Planta medica**, v. 6, p. 450-453, 1986.

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.

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, p. 145-159, 2002.

SAHIN, F.; DEMIREL, G.; TUMTURK, H. A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 37, p. 148–153, 2005.

SANDES, A. R. R.; BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotecnologia**, n. 13, p. 28- 32, 2000.

SANT'ANA, P. J. P.; ASSAD, A. L. O Contexto brasileiro para a bioprospecção: a competência científica tecnológica brasileira. **Biotecnologia**. n. 29, p. 32-37, 2001.

SANTOS, L.V.; FETT-NETO, A. G.; KERBER, V. A.; ELISABETSKY, E.; QUIRION, J. C.; HENRIQUES, T. Indole monoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Mull. Arg. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 1185-1187, 2001.

SARAIAVA, D. **Bacteriologia especial com interesse em saúde animal e saúde pública**. Porto Alegre: Sulina, 1984, cap. 34, p. 389-409.

SATHASIVAM S. Current and emerging treatments for the management of myasthenia gravis. **Ther Clin Risk Manag**, v.7, 2011.

SAUVAIN, M.; DEDET, JP; KUNESCH, N.; POISSON J. Isolation of flavans from the Amazonian shrub *Faramea guianensis*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 3, p. 403–406, 1994.

SCHINNERL, J.; ORLOWSKA, E. A.; LORBEER, E.; BERGER, A.; BRECKER L. Alstrofines in Rubiaceae: Alstrofine A from *Chassalia curviflora* var. *ophioxylodes* and a novel derivative, rudgeifoline from *Rudgea cornifolia*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 586–590, 2012.

SEBEN, C. **Investigação química e biológica em *Hippeastrum breviflorum* Herb. (Amaryllidaceae)**. Porto Alegre, 2005. 140f. Dissertação (Mestrado)- Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Porto Alegre, UFRGS, 2005.

SHELTON, G.D. Myasthenia gravis and disorders of neuromuscular transmission. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practices**, v.32, n.1 p.189–206, 2002.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function?. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n.1-3, p. 3-10, 2008.

SILMAN, I; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 293-302, 2005.

SILVA, V. C.; CARVALHO, M. G.; ALVES, A. N. Chemical constituents from leaves of *Palicourea coriácea* (Rubiaceae). **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 356–357, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3.ed. rev. Port Alegre/ Florianópolis: Ed. da Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC,833 p., 2001.

SLISH, D.F.; ARVIGO, R.; BALICK, M.J. *Aseis yucatanensis*: a natural product from Belize that exhibits multiple mechanisms of vasorelaxation. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 92, n. 2-3, p. 297-302, 2004.

SLISH, D.F.; UEDA, H.; ARVIGO, R.; BALICK, M.J. Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, n.2, p.159-65, 1999.

SOARES, P.R.O.; OLIVEIRA, P.L.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO L.; GUILLO, L.A. In Vitro Antiproliferative Effects of the Indole Alkaloid Vallesiachotamine on Human Melanoma Cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 3, p. 565-571, 2012.

SOLIS, P. N.; RAVELO, A. G.; PALENZUELA, J. A.; GUPTA, M. P.; GONZÁLEZ, A.; PHILLIPSON, J. D. Quinoline alkaloids from *Psychotria glomerulata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 5, p. 963-969, 1997.

SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; GUPTA, M. P.; PHILLIPSON, J.D. Alkaloids from *Cephaelis dichroa*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 5, p. 1117-1119, 1993.

SOUZA, P. A. Alcaloides e o chá de ayahuasca: uma correlação dos "estados alterados da consciência" induzido por alucinógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.3, p. 349-358, 2011.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**. v. 18, n. 1, 2013.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Instituto Plantarum: Nova Odessa, Brasil, 2008.

STRUWE, L. G. 2002. (Coffees, Dogbanes, Gentians and Milkweeds) Encyclopedia of life sciences, Macmillan publishers, Nature publishing group. Disponível em: <gentian.rutgers.edu/reffiles/Struwe%202002%20ELS%20Gentianales.pdf>.

TAKAYAMA, H.; MORI, I.; KITAJIMA, M.; AIMI, N.; LAJIS, N. H. New Type of Trimeric and Pentameric Indole Alkaloids from *Psychotria rostrata*. **Organic Letters**, v. 6, n. 17, p. 2945-2948, 2004.

TAYLOR, S.M. Doenças dos nervos periféricos e da junção neuromuscular. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, cap. 71, p. 1106.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R. CASE, C.L. Doenças microbianas do sistema nervoso. **Microbiologia**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. Cap. 22, p. 585-587.

TULLII, C.F.; MIGUEL, E. C.; CUNHA, M. Ultraestrutura dos coléteres estipulares e composição química da secreção em *Alseis pickelli* pilgeret shmale (rubiaceae). In: II Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica, 2010, Campos dos Goytacazes – RJ. Resumos. Rio de Janeiro. UENF.

VALVERDE, J.; TAMAYO, G.; HESSE, M. β -carboline monoterpene glucosides from *Palicourea adusta*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 8, p. 1485-1489, 1999.

VENTURA, A.L.M.; ABREU, P.A.; FREITAS, R.C.C.; SATHLER, P.C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H. C. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

VEROTTA L.; PILATI T.; TATO M.; ELISABETSKY E.; AMADOR T.A.; NUNES D.S. Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria colorata*. **Journal of natural products**. v. 61, n. 3, p. 392–396, 1998.

VEROTTA, L.; PETERLONGO, F.; ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; NUNES, D.S. High-performance liquid chromatography–diode array detection– tandem mass spectrometry analyses of the alkaloid extracts of Amazon *Psychotria* species. **Journal of Chromatography**, v. 841, p. 165–176, 1999.

VINUTHA, B. *et al.* Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 359-63, 2007.

VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S.L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMIT, A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 359–363, 2007.

VLEET, J.F.V. Musculo esquelético. In: GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer Verlag, 2009, 369 p.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**, 2ª ed. Berlin: Springer Verlag, 2001, 368 p.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**, 2ª ed. Berlin: Springer Verlag, 1996.

WIJNSMA, R.; VERPOORTE, R. Anthraquinones in the Rubiaceae. In: **Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**; Springer-Verlag Wien: Viena, Austria, pp. 79–149, 1986.

WOO-MING, R. B.; STUART, K. L. Calicanthine from *Palicourea alpina*, **Phytochemistry**, v. 14, p. 2529, 1975.

YOUNG, M.C.M.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, C.A.; LOPES, M.N.; TREVISAN, L.M.V.; BOLZANI, V.S. Triterpenes and Saponins from *Rudgea viburnioides*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 936–938, 1998.

ZANGARA, A. The psychopharmacology of huperzine A: na alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the trestment of Alzheimer's disease. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 675-686, 2003.

ZHANG, C.; ZHANG, D.; CHEN, M.; GUAN, S.; YAO, J.; HE, X.; LEI, L.; ZHONG, Y.; WANG, Z.; YE, W. Antiproliferative Triterpenoid Saponins from the Stem of *Psychotria* sp. **Planta medica**, v. 79, p. 978–986, 2013.

APÊNDICE

1. Análise estatística dos dados de inibição.

```
R version 3.3.2 (2016-10-31) -- "Sincere Pumpkin Patch"
Copyright (C) 2016 The R Foundation for Statistical Computing
Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)
```

```
R é um software livre e vem sem GARANTIA ALGUMA.
Você pode redistribuí-lo sob certas circunstâncias.
Digite 'license()' ou 'licence()' para detalhes de distribuição.
```

```
R é um projeto colaborativo com muitos contribuidores.
Digite 'contributors()' para obter mais informações e
'citation()' para saber como citar o R ou pacotes do R em publicações.
```

```
Digite 'demo()' para demonstrações, 'help()' para o sistema on-line de ajuda,
ou 'help.start()' para abrir o sistema de ajuda em HTML no seu navegador.
Digite 'q()' para sair do R.
```

```
Shapiro-Wilk normality test
```

```
data: estatistica2$res
W = 0.98682, p-value = 0.5029
```

```
> bartlett.test(estatistica2$res, trat)
```

```
Bartlett test of homogeneity of variances
```

```
data: estatistica2$res and trat
Bartlett's K-squared = 40.488, df = 29, p-value = 0.07626
```

```
-----
Quadro da análise de variancia
```

```
-----
              GL   SQ    QM    Fc    Pr>Fc
Tratamento  29 34134 1177.03 71.149 1.5345e-36
Residuo      60   993   16.54
Total        89 35126
-----
```

```
CV = 14.07 %
```

Teste de Scott-Knott

	Grupos	Tratamentos	Medias
1	a	30	97.898230
2	b	29	74.424779
3	c	1	57.179204
4	c	6	56.670354
5	d	3	49.457965
6	e	10	35.232301
7	e	24	32.466814
8	e	7	32.311947
9	f	8	28.440265
10	f	2	27.511062
11	f	20	26.747788
12	f	26	25.199115
13	f	12	24.579646
14	g	18	22.599558
15	g	28	21.946903
16	g	25	21.803097
17	g	16	21.061947
18	g	14	19.968121
19	g	11	19.878319
20	g	5	19.502212
21	g	21	19.402655
22	g	15	19.269912
23	g	4	18.750000
24	g	23	18.185841
25	h	22	15.995575
26	h	17	14.845133
27	h	19	14.369469
28	h	13	13.882743
29	h	9	9.535398
30	h	27	8.362832