Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

"Triagem da atividade antioxidante e anticolinesterásica de extratos naturais: seleção e estudo químico biomonitorado de *Streptomyces sp.* e de *Psychotria carthagenensis*"

Letícia Bazeia Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2011

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

"Triagem da atividade antioxidante e anticolinesterásica de extratos naturais: seleção e estudo químico biomonitorado de *Streptomyces sp.* e de *Psychotria carthagenensis*"

Letícia Bazeia Lima

Orientadora: Carmen Lúcia Cardoso

RIBEIRÃO PRETO - SP

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Letícia Bazeia

Triagem da atividade antioxidante e anticolinesterásica de extratos naturais: seleção e estudo químico biomonitorado de *Streptomyces sp*. e de *Psychotria carthagenensis*. Ribeirão Preto, 2011.

129 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Cardoso, Carmen Lúcia.

1. Produtos naturais. 2. Extratos naturais. 3. Ensaios. 4. Determinação estrutural.

Folha de Aprovação

Letícia Bazeia Lima

"Triagem da atividade antioxidante e anticolinesterásica de extratos naturais: seleção e estudo químico biomonitorado de *Streptomyces sp.* e de *Psychotria carthagenensis*"

Aprovada em:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,

qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.

(Chico Xavier)

Dedicatória

A memória do meu avô, Olívio;

A avó Madalena;

Aos meus pais e irmão;

A minha orientadora;

E a todos que torceram por mim!

Muito obrigada!

Agradecimentos

A Deus pela oportunidade de viver;

Aos meus pais Sirlei e Mário e ao meu irmão Talles pelo amor, apoio, incentivo, conselhos e compreensão;

A avó Madalena pelo amor, apoio financeiro e pelas rezas e ao avô Olívio pelo incentivo aos estudos e pelo exemplo de vida;

Aos tios Maria Elisa, Ita, Darci, Rui, Regina e Paulo e aos primos Donato, Júnior, Cris, Eli e Neto pelo amor e descontração nos churrasquinhos da chácara;

Ao Leandro pelo amor, carinho, companheirismo, conselhos e compreensão;

A Juliana pela amizade, acolhimento, por me salvar nos momentos complicados, pelos desabafos, pelos passeios;

A minha orientadora, Carmen, pela orientação, ensinamentos, apoio, dedicação, amizade, paciência, compreensão e confiança;

A Ana Flávia C. Martinez que me ensinou a dar os primeiros passos no laboratório, pelos ensinamentos, extratos, análises de espectros e principalmente pela amizade;

Ao prof. Dr. Luiz Alberto B. de Moraes, que nos acolheu em seu laboratório, pelos ensinamentos, sugestões no exame de qualificação, equipamentos, amizade e pelas confraternizações, sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho;

A Joyce pela amizade, conselhos, momentos de descontração na Filô, desabafos, ajudas, por tornar esses dois anos mais agradáveis;

As amigas Haroldas: Ju morena, Ju loira, Joyce, Mel e Paty, pela amizade e pelas risadas no CL;

A Edilene pela ajuda na interpretação dos espectros de RMN;

Aos companheiros de laboratório, Adriana, Aline, Camilla, Flávia, Joyce, Joziel, Mateus e Vinícius pela reflexão científica, colaboração, ajuda, convivência harmoniosa, desabafos, a partilha dos bons e maus momentos e pela amizade;

A Fernanda, Tânia, Ana Flávia e Jacqueline pelo auxílio nas análises de EM e no tratamento de espectros;

Ao Dr. Arnildo Pott e ao Dr. Milton Groppo pela coleta e identificação do material vegetal;

A profª Maria Eugênia, pela análise de CG-EM;

Aos técnicos da FCFRP – USP pelos extratos;

A técnica Maura, pela colaboração no ensaio de Marston;

A técnica Olímpia, pela amizade, pelo apoio nas horas difíceis, pelos conselhos e pela rapidez no empréstimo de reagentes e equipamentos;

Ao Alexandre, pelos ensinamentos em HPLC, pela ajuda técnica por telefone, e pela amizade;

A todos os funcionários do departamento de química da FFCLRP pelos serviços prestados, especialmente aos técnicos Vinícius, Mércia e Djalma pelas análises;

A profª Laura por nos acolher em seu laboratório durante a reforma;

A profª Marcia pela amizade e consultoria por telefone;

Aos professores David, Dionéia, Glaucia, Leone, Maria Eugênia, Mônica, Norberto e Simone pelos conhecimentos valiosos transmitidos durante as aulas;

Aos amigos Aline, Amanda, Anelize, Ayres, Bernadete, Bruno, Cidinha, Elise, Fabiana, Fernanda, Gabriela, Glaucia, José Ângelo, Keli, Lena, Maira, Malson, Marcela, Maria, Mariana, Monique, Naiara, Natália, Patrícia, Sérgio, Simony, Taís, Ubaldo, Vanessa e Xande que me acompanharam em diferentes fases da vida;

A todos que não cito aqui, mas que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho;

A Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP pela oportunidade de realização deste mestrado;

A CNPq pela bolsa concedida;

A FAPESP e a CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO I

ABSTRACT II

LISTA DE FIGURAS III

LISTA DE TABELAS VI

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS VII

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Histórico sobre a Química de Produtos Naturais 1

1.2. A família Rubiaceae Juss. 5

1.3. O gênero *Psychotria* L. 6

1.4. A espécie *Psychotria carthagenensis* Jacq. 7

1.5. O gênero *Streptomyces* e a actinobactéria 36 (50PL) 10

1.6. Atividade antiacetilcolinesterásica 11

1.7. Atividade antioxidante 12

2. OBJETIVOS 13

2.1. Objetivo Geral 13

2.2. Objetivos Específicos 13

3. MATERIAL E MÉTODOS 14

3.1. Material utilizado 14

3.1.1. Equipamentos 14

3.1.2. Solventes, suportes e reagentes 15

3.2. Métodos 15

3.2.1. Ensaios em cromatoplacas 15

3.2.1.3. Ensaio utilizando biorreatores enzimáticos (IMER-AChE) 18

3.2.2. Ensaio em microplaca multipoços 21

3.2.3. Material de origem microbiológica 21

3.2.4. Material de origem vegetal 22
3.2.5. Análise por HPLC 23
3.2.6. Análise de EM por inserção direta 23
3.2.7. Análise de CG-EM 23

4. TRABALHO EXPERIMENTAL 23

4.1. Triagem do material de origem microbiológica 24

4.2. Ensaio em microplacas com DPPH 25

4.3. Purificação da actinobactéria-36 (50PL) guiada por ensaios – 1ª fermentação 25

4.4. Purificação da actinobactéria-36 (50PL) guiada por bioensaios – 2ª fermentação 27

4.5. Triagem do material de origem vegetal – 1ª coleta 29
4.5.1. Purificação do extrato etanólico bruto das folhas de *P. carthagenensis* – 1ª coleta 31
4.5.2. Purificação do extrato hexânico bruto das folhas de *P. carthagenensis* – 1ª coleta 35
4.5.3. Purificação do extrato etanólico bruto dos caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta 38
4.5.4. Extração ácido-base de alcalóides totais das folhas e caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta e revelação com cloro-iodoplatinado 39
4.5.5. Ensaio antiacetilcolinesterásico no biorreator IMER-AChE 41

4.6. Triagem do material de origem vegetal – 2ªcoleta 42
4.6.1. Extração ácido-base de alcalóides totais das sementes, caules e folhas de *P. carthagenensis* – 2ª coleta e revelação com iodoplatinado 42
4.6.2. Ensaios antioxidante e antiacetilcolinesterásicos. 43

4.7. Triagem de materiais de diversas origens 44

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45

5.1. Triagem inicial do material de origem microbiológica e outras fontes 45

5.2. Ensaio em microplacas multipoços com DPPH. 46

5.3. Resultado dos ensaios dos extratos e frações da actinobactéria-36 (50PL). 47

5.4. Determinação estrutural das substâncias da actinobactéria-36 (50PL) – 1ª fermentação. 47
5.4.1. Substância 1 – amostra C1(1) 48
5.4.2. Substância 2 – amostra C2(1-14) 59

5.5. Análise do perfil químico dos extratos brutos das folhas e caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta 65

5.6. Resultado dos ensaios dos extratos e frações de *P. carthagenensis*. 67

5.7. Análise do perfil químico das frações das folhas de *P. carthagenensis* – 1ª coleta 68

5.8. Determinação estrutural da subfração C1(1)-1ªcf-SPE-Hex do extrato etanólico bruto das folhas de *P. carthagenensis* 71

5.9. Ensaio antiacetilcolinesterásico no biorreator IMER-AChE.....75

5.10. Revelação de alcalóides totais das folhas e caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta.....75

5.11. Revelação de alcalóides totais das sementes, caules e folhas de *P. carthagenensis* – 2ª coleta 78

5.12. Resultado do ensaio de todos os extratos e frações testados. 81

6. CONCLUSÕES 82

7. REFERÊNCIAS..... 83

RESUMO

Lima, L. B., "**Triagem da atividade antioxidante e anticolinesterásica de extratos naturais: seleção e estudo químico biomonitorado de *Streptomyces sp.* e de *Psychotria carthagenensis***". 2011. 129 p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo.

Esse trabalho descreve o estudo monitorado de extratos de origem microbiológica e vegetal. Com o objetivo de identificar compostos com atividade antioxidante e/ou inibidores da enzima acetilcolinesterase em extratos de origem microbiológica e vegetal do cerrado brasileiro, uma triagem de atividade foi realizada utilizando ensaios simples e rápidos. Nessa triagem dois extratos promissores foram selecionados para os estudos de identificação dos compostos responsáveis pela atividade inicial. O trabalho de purificação foi iniciado com a fração em acetato de etila do extrato etanólico da actinobactéria-36 (50PL), *Streptomyces sp*., fermentado em meio de canjica amarela que apresentou atividade nos dois ensaios realizados. As atividades antioxidante e anticolinesterásica são relatadas pela primeira vez para essa actinobactéria. Nesse estudo foram identificados dois compostos, o éster metílico do ácido *cis*-6, *cis*-8 octadecadienóico e o tetradecanal. Da espécie *Psychotria carthagenensis,* uma planta da família Rubiaceae, foram objeto de estudo as frações hexânica e acetato de etila oriundas do extrato etanólico das folhas, o extrato hexânico das folhas e o extrato etanólico dos caules. A espécie *P. cartahgenensis* foi investigada quanto à presença de alcalóides uma vez que é utilizada juntamente com as espécies *Psychotria viridis* e *Banisteriopsis caapi* no preparo de uma bebida alucinógena conhecida como ayahuasca*.* A partir dos extratos etanólicos das sementes, caules e folhas foi realizada uma extração ácido-base resultando em frações ricas em compostos nitrogenados. As frações de "alcalóides totais" foram analisadas em TLC e revelador específico, o cloro-iodoplatinado, evidenciando a presença de alcalóides. As frações foram analisadas por EM (desreplicação) resultando na identificação de 5 compostos nitrogenados.

ABSTRACT

"Screening of antioxidant and anticholinesterase activity of natural extracts: selection and bioassay-guided chemical study of *Streptomyces sp*. and *Psychotria carthagenensis*"

This work describes the monitored study of extracts from microbiological and plant origin. In order to identify compounds with antioxidant action and/or inhibitors of acetylcholinesterase enzyme in extracts of microbial and plants of the Brazilian Cerrado vegetation, screening for these activities was performed using simple and rapid tests. From this screening, two promising extracts were selected for identification of the compounds responsible for the initially observed activity. Purification was started with the ethyl acetate fraction in the ethanol extract of actinobacteria-36 (50PL), *Streptomyces sp*., fermented in a yellow hominy culture medium that displayed activity in both tests. Antioxidant and anticholinesterase activities are reported for this actinobacteria for the first time. Two compounds were identified, namely 6(Z),8(Z)-octadecadienoic acid, methyl ester and tetradecanal. The hexane and ethyl acetate fractions of the ethanol extract of the leaves as well as the ethanol extract of the stems from the *Psychotria carthagenensis* species, a plant of the Rubiaceae family, were studied. This species was investigated for the presence of alkaloids, because it is used together with the species *Psychotria viridis* and *Banisteriopsis caapi* in the preparation of a hallucinogenic drink known as ayahuasca. Acid-base extractions of the ethanol extracts of the seeds, stems, and leaves of this plant were carried out, resulting in fractions rich in nitrogen compounds. The "total alkaloids" fractions were analyzed by TLC and specific revealing with chlorine-iodoplatinate, which evidenced the presence of alkaloids. The fractions were analyzed by MS (derreplication), which allowed for identification of five nitrogen compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto da espécie *P. carthagenensis*, por Milton Groppo, 2011. 8
Figura 2: Catálise da acetilcolina. 11
Figura 3: Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman. 16
Figura 4: Catálise do acetato de α-naftil e reação com Fast Blue. 18
Figura 8: Triagem da atividade antioxidante em TLC. Os halos amarelos representam a capacidade antioxidante da amostra. Rutina (H-5) e quercetina (H-6) foram utilizados como padrão. * Extratos selecionados para o ensaio com DPPH em microplaca. 24
Figura 9: Triagem da atividade inibitória da AChE em TLC. Os halos brancos representam a atividade inibitória. Galantamina (A-1) e rivastigmina (A-2) 0,1 mM foram utilizados como padrão. 25
Figura 10: Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato da actinobactéria-36 (50PL) - 1ª fermentação. 26
Figura 11: Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato da actinobactéria-36 (50PL) – 2ª fermentação. 28
Figura 12: Triagem do extrato etanólico bruto (B) das folhas de *P. carthagenensis* em TLC com os respectivos padrões galantamina (G), rutina (R) e quercetina (Q). * a cor da matriz está mascarando a atividade, + baixa atividade, ++ boa atividade, - inativa. 30
Figura 13: Fluxograma da partição líquido-líquido dos extratos etanólicos das folhas e caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta. 31
Figura 14: Cromatograma de separação da subfração C1(40)-1ªcf do extrato etanólico das folhas de *P. carthagenensis*. 33
Figura 15: Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração Hex do extrato etanólico das folhas de *P. carthagenensis* – 1ª coleta. 34
Figura 16: Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt do extrato etanólico das folhas de *P. carthagenensis*. 35
Figura 17: Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas de *P. carthagenensis*- 1ªcoleta. 37
Figura 18: Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto dos caules de *P. carthagenensis* -1ª coleta. 38
Figura 19: Esquema adaptado de extração de alcalóides totais. 40
Figura 20: Revelação com cloro-iodoplatinado em cromatoplaca de óxido de alumínio 5 minutos (A), 30 minutos(B) e 60 minutos (C) após a nebulização dos extratos e frações de *P. carthagenensis* – 1ª coleta, resultantes da extração ácido-base, utilizando a cafeína como padrão 41
Figura 21: Esquema clássico de extração de alcalóides totais. 42
Figura 22: Revelação com iodoplatinado em cromatoplaca de sílica 5 minutos (A), 15 minutos (B) e 60 minutos (C) após a nebulização dos extratos de *P. carthagenensis* resultantes da extração ácido-base, utilizando cafeína como padrão 43
Figura 23: Triagem antioxidante com DPPH dos extratos e frações das sementes, caules e folhas de *P. carthagenensis* em TLC com os padrões rutina e quercetina. 44
Figura 24: Triagem antiacetilcolinesterásica pelos métodos de Marston, Ellman e falso positivo, respectivamente, dos extratos e frações das sementes, caules e folhas de *P. carthagenensis* em TLC com o padrão galantamina. 44

Figura 25: Gráfico dos extratos de micro-organismos das atividades antioxidante com DPPH e antiacetilcolinesterásica pelo método de Ellman. 45
Figura 26: Resultado do ensaio espectrofotométrico antioxidante em microplacas dos extratos de origem microbiológica. 46
Figura 27: Gráfico dos extratos e frações da actinobactéria-36 (50PL) das atividades antioxidante e antiacetilcolinesterásica. 47
Figura 28: Espectro de ^{1}H RMN da substância 1, solubilizada em MeOD, 500 MHz. 48
Figura 29: Expansão 1 do espectro de ^{1}H RMN da substância 1, solubilizada em MeOD, 500 MHz. 49
Figura 30: Expansão 2 do espectro de ^{1}H RMN da substância 1, solubilizada em MeOD, 500 MHz. 49
Figura 31: Expansão 3 do espectro de ^{1}H RMN da substância 1, solubilizada em MeOD, 500 MHz. 50
Figura 32: Expansão 4 do espectro de ^{1}H RMN da substância 1, solubilizada em MeOD, 500 MHz. 50
Figura 33: Espectro de ^{13}C RMN da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 51
Figura 34: Expansão 1 do espectro de ^{13}C RMN da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 52
Figura 35: Expansão 2 do espectro de ^{13}C RMN da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 52
Figura 36: Espectro de DEPT 135 da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500MHz. 53
Figura 37: Expansão 1 do espectro de DEPT 135 da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500MHz. 53
Figura 38: Espectro de *g*HMQC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 54
Figura 39: Expansão 1 do espectro de *g*HMQC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 54
Figura 40: Expansão 2 do espectro de *g*HMQC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 55
Figura 41: Espectro *g*HMBC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 56
Figura 42: Expansão 1 do espectro *g*HMBC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 56
Figura 43: Expansão 2 do espectro *g*HMBC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 57
Figura 44: Espectro TOCSY da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 58
Figura 45: Espectro de massas em modo positivo (ESI+) da substância 1. 58
Figura 46: Espectro de ^{1}H RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 60
Figura 47: Expansão 1 do espectro de ^{1}H RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 60
Figura 48: Expansão 2 do espectro de ^{1}H RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 61
Figura 49: Expansão 3 do espectro de ^{1}H RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 61
Figura 50: Expansão 4 do espectro de ^{1}H RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 62
Figura 51: Espectro de ^{13}C RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 63
Figura 52: Expansão do espectro de ^{13}C RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz. 63

Figura 53: Espectro de DEPT 135 da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500MHz. 64
Figura 54: Expansão do espectro de DEPT 135 da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500MHz. 64
Figura 55: Espectro de ^{1}H RMN do extrato hexânico de caules de *P. carthagenensis*, solubilizado em $CDCl_3$, 500MHz. 66
Figura 56: Espectro de ^{1}H RMN do extrato hexânico de folhas de *P. carthagenensis*, solubilizado em $CDCl_3$, 500MHz. 66
Figura 57: Espectro de ^{1}H RMN do extrato etanólico de caules de *P. carthagenensis*, solubilizado em DMSO, 500MHz. 66
Figura 58: Espectro de RMN de ^{1}H do extrato etanólico de folhas de *P. carthagenensis*, solubilizado em DMSO, 500MHz. 67
Figura 59: Gráfico dos extratos e frações de *P. carthagenensis* das atividades antioxidante e antiacetilcolinesterásica. 68
Figura 60: Espectro de ^{1}H RMN 500MHz da subfração C9(6-8)-1ªcf. 69
Figura 61: Espectro de ^{1}H RMN 300MHz da subfração C6(1)FM-1ªcf em D_2O. 69
Figura 62: Espectro de ^{1}H RMN 300MHz da subfração C8(5)FC-1ªcf em $CDCl_3$. 70
Figura 63: Espectro de ^{1}H RMN 300MHz da subfração C8(10)-1ªcf em D_2O. 70
Figura 64: Espectro de ^{1}H RMN 500MHz da subfração C8(6-7)FH-1ªcf em $CDCl_3$. 71
Figura 65: Cromatograma da subfração C1-1ªc(1)-SPE-Hex. 71
Figura 66: Expansão do cromatograma da subfração C1-1ªc(1)-SPE-Hex. 72
Figura 67: Espectro de infravermelho da subfração C1-1ªc(1)-SPE-Hex. 72
Figura 68: Espectro de massas (ESI+) em modo positivo da subfração C1-1ªc(1)-SPE-Hex. 73
Figura 69: Espectro de massas da fr. clorofórmica básica das folhas (Cbf) de *P. carthagenensis* 1ª coleta: a) Espectro de massas; b) Expansão do espectro de massas. 76
Figura 70: Espectro de massas da fr. clorofórmica básica dos caules (Cbc) de *P. carthagenensis* 1ª coleta: a) Espectro de massas; b) Expansão do espectro de massas. 76
Figura 71: Espectro de massas da fr. alcalóides sementes de *P. carthagenensis* 2ª coleta. 79
Figura 72: Espectro de massas da fr. alcalóides caules de *P. carthagenensis* 2ª coleta: a) Espectro de massas; b) Expansão do espectro de massas. 79
Figura 73: Espectro de massas da fr. alcalóides folhas de *P. carthagenensis* 2ª coleta: a) Espectro de massas; b) Expansão do espectro de massas. 79
Figura 74: Gráfico dos todos extratos e frações de diversas origens submetidos aos ensaios. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado da triagem inicial pontual com DPPH e Ellman dos extratos de micro-organismos. 94
Tabela 2: Resultado do ensaio pontual com DPPH e Ellman da actinobactéria-36 (50PL) – 1ª fermentação. 102
Tabela 3: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásicos da actinobactéria-36 (50PL) - 2ª fermentação. 103
Tabela 4: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásicos dos extratos e frações das folhas e caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta. 104
Tabela 5: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásico das subfrações de *P. carthagenensis* – 1ª coleta. 104
Tabela 6: Porcentagem de inibição dos compostos testados no biorreator IMER-AChE na concentração de 200µg/mL. 110
Tabela 7: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásico dos extratos e frações de *P. carthagenensis* - 2ª coleta. 111
Tabela 8: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásico dos extratos e frações de algumas espécies estudadas pelo grupo. 111
Tabela 9: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásico de compostos e frações provenientes de outros grupos de pesquisa em trabalho de colaboração. 113
Tabela 10: Dados de RMN de 13C, DEPT 135, gHMQC, 1H, multiplicidade, J, gHMBC e TOCSY da Substância 1. 117
Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C, DEPT 135, ^{1}H, multiplicidade e *J*, da Substância 2. 118
Tabela 12: Identificação dos componentes majoritários na fração C1-1ªc(1)-SPE-Hex por CG/MS. 119
Tabela 13: Identificação dos componentes da fração C1-1ªc(1)-SPE-Hex por CG/MS. 120
Tabela 14: Resultado da revelação com iodoplatinado dos extratos e frações de *P. carthagenensis* – 1ª coleta. 127
Tabela 15: Resultado da revelação das frações e extratos de *P. carthagenensis* - 2ª coleta com iodoplatinado. 127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE - Acetilcolinesterase

AcOEt – Acetato de etila

ACTI – Iodeto de acetiltiocolina

BSA – Albumina de Soro Bovino

C – Coluna

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CG/EM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

δ – Deslocamento químico

d - dubleto

dd – duplo dubleto

DCM – Diclorometano

DEPT – Distortionless enhancement by polarization transfer

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

EM – Espectro de Massas

eV – Elétron-volt

*g*COSY – Gradiente Correlation epectroscopy

*g*HMBC – Gradiente Heteronuclear Multiple-Bond Coherence

*g*HMQC – Gradiente Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

IV - Infravermelho

J – Constante de acoplamento

m - Multipleto

m/z – Massa/carga

MA – Mal de Alzheimer

MeOD – Metanol-d_4

Rf – Fator de retenção

RMN ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono

RMN ^{1}H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s - singleto

SNC – Sistema nervoso central

SPE – Extração em fase sólida

SRL – Sequestro de radicais livres

QPN – Química de produtos naturais

TMS – Tetrametilsilano

t - tripleto

T_r – Tempo de retenção

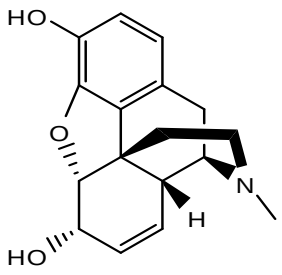
UV - Ultravioleta

1. Introdução

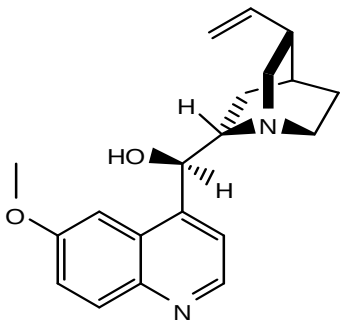
1.1. Histórico sobre a Química de Produtos Naturais

A química de produtos naturais (QPN) teve início no século XIX, com o estudo das plantas medicinais, quando Friedreich Sertuner, em 1804, isolou a morfina (**1**) da espécie *Papaver somniferum*, popularmente conhecida como ópio e utilizada pelos Sumérios (4000 AC) por suas propriedades soníferas e analgésicas [1]. Relatos mitológicos afirmam que o nome morfina se deve à Morfeu, deus do sono [2]. Outros compostos com propriedades interessantes também são produzidos pelo ópio, tais como a codeína (antitussígeno), a narcotina (antitussígeno e espasmolítico), a papaverina (espasmolítico) e a tebaína (tóxico) [3].

Outro marco importante na QPN foi o isolamento da quinina (**2**) das cascas de *Cinchona succiruba*, em 1820, por Pierre J. Pelletier e Joseph B. Caventou. Esta espécie era conhecida pelos índios que utilizavam as cascas de quina no tratamento de alguns tipos de febre [3-4]. Em 1834, o médico François Maillot demonstrou sua eficácia no tratamento da malária e a quinina serviu como protótipo para diversos antimaláricos como a cloroquina e a primaquina [3], [5].



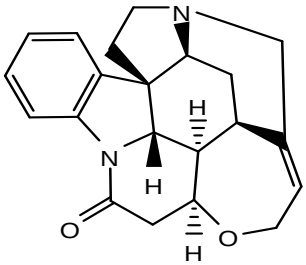
(**1**)



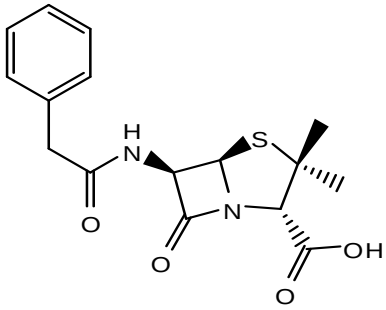
(**2**)

Ainda em 1820, alguns estudos mereceram destaque como o isolamento do alcalóide estricnina (**3**) de sementes de *Strychnos nux-vomica* L. por Robert Robinson [6] que também contribuiu para a elucidação estrutural da brasileína da espécie *Caesalpinia echinata*, conhecida popularmente como pau-brasil e utilizada desde a Idade Média como corante e tinta para escrever [7-8]. Além do isolamento e identificação de estruturas de diversos compostos por Robert B. Woodward, tais

como a penicilina (**4**), descoberta por Alexandre Fleming (1928), a patulina (1945), a estricnina (1947), a cevina (1954), a gliotoxina (1958), a ellipticina (1959) e a calicantina (1964) [9].



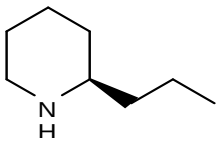
(**3**)



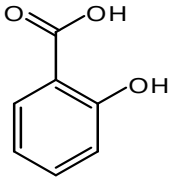
(**4**)

Outro exemplo marcante na QPN, com grande impacto na humanidade, foi a descoberta das substâncias alucinógenas. Na Grécia antiga, extratos vegetais eram utilizados em execuções, como no caso de Sócrates, que morreu após a ingestão de uma bebida à base de cicuta, que continha a coniina (**5**) [1].

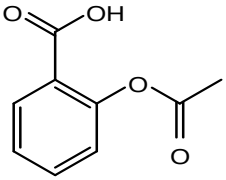
Em 1828, Johann A. Buchner isolou a salicina da espécie *Salix alba* L. popularmente conhecida por suas propriedades analgésicas e antipiréticas. Em 1860, Hermann Kolbe sintetizou o ácido salicílico (**6**) e em 1898, Felix Hofmann descobriu o ácido acetil-salicílico (**7**) com propriedades analgésicas e antiinflamatórias. Este foi o primeiro fármaco sintético a ser comercializado, lançado no mercado pela Bayer com o nome Aspirina, marcando o início de um segundo período na história da QPN. Em 1903 surgiu também o barbital (ácido 5,5-dietilbarbitúrico) com propriedades hipnóticas. Em 1904 foi sintetizada a epinefrina, broncodilatador e descongestionante nasal. Além da síntese dos anestésicos procaína e lidocaína, a partir da cocaína, cloroquina, tropicamida, podofilotoxina, teniposídeo e camptotecina [1], [3].



(**5**)



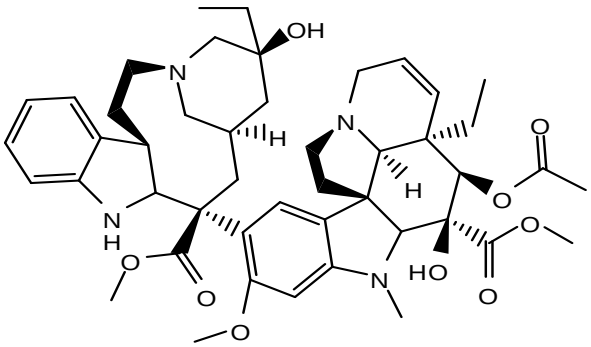
(**6**)



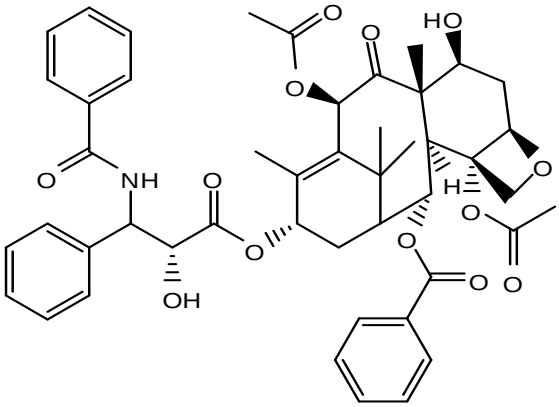
(**7**)

Em 1838, Ezequiel Correia dos Santos isolou a pereirinha das cascas de *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers, conhecida popularmente como pau-pereira. Acredita-se que seja este o primeiro alcalóide puro isolado no Brasil [1-2].

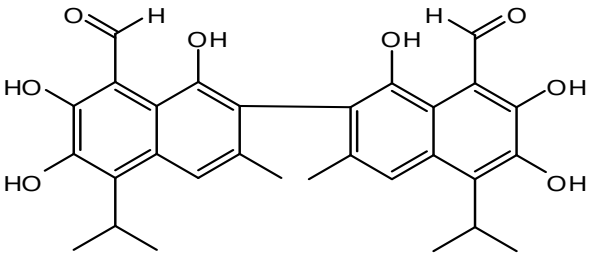
Alguns exemplos clássicos que merecem destaque são os quimioterápicos vimblastina (Velban®) (**8**) e vincristina (Oncovin®), extraídos da espécie *Catharantus roseus*, o etoposídeo, o teniposídeo e o diterpeno taxol (**9**), isolado em 1966 das cascas da espécie *Taxus brevifolia* [1], [10-11]. Dentre os antineoplásicos, destaca-se a camptotecina isolada da espécie *Camptotheca acuminata*, em 1966 por Wall, Wani e colaboradores [3], [11]. O gossipol (**10**) utilizado como contraceptivo masculino, isolado do óleo da semente de *Gossypium*, popularmente conhecido como algodão. A hipericina utilizada como antidepressivo, isolada do extrato de *Hypericum perforatum*, popularmente conhecida como Erva-de-São-João. E a artemisinina (**11**), importante protótipo antimalárico, isolado de *Artemisia annua* [3].



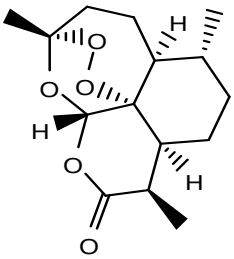
(**8**)



(**9**)



(**10**)



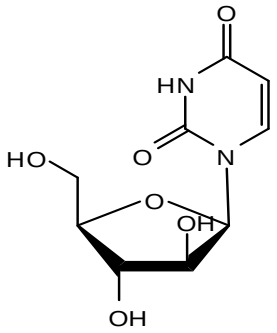
(**11**)

Sem esquecer o fitoterápico considerado de maior sucesso por ser um dos mais vendidos no Brasil e no mundo, utilizado no controle de problemas vasculares

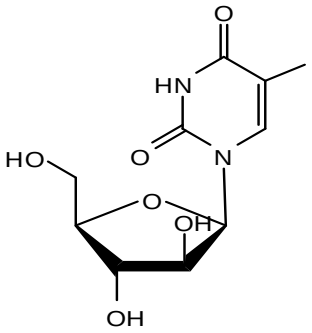
cerebrais e de memória, o *Ginkgo biloba* L. [12]. A partir dos extratos desta espécie também foram isolados ginkolídeos com propriedades antitrombóticas [1], [3], [13].

Entre as décadas de 50 e 70, período conhecido como a idade de ouro dos produtos naturais, as plantas dão lugar aos micro-organismos e dentre os medicamentos de maior sucesso para o tratamento de doenças infecciosas destacam-se os antibióticos penicilina e cefalosporinas, ambos produzidos por fungos [1], [14]. Destacam-se ainda a mevinolina ou lovastatina, redutor do colesterol ruim, isolada de *Monascus ruber* em 1979 [15], a ciclosporina, a asperlicina e a papulacandina [1].

Na década de 60 iniciaram-se os estudos com produtos naturais de origem marinha, Bergmann e colaboradores isolaram os nucleosídeos espongouridina (**12**) e espongotimidina (**13**) da esponja *Tethya crypta,* ambos com atividade antiviral [1], [16]. Outras substâncias de origem marinha foram posteriormente isoladas como a briostatina, a ecteinascidina e a aplidina ambos com atividade anticâncer.



(**12**)

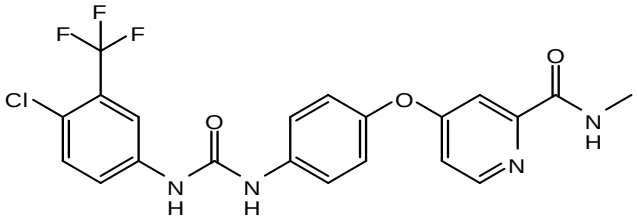


(**13**)

Com o surgimento da espectroscopia no ultravioleta (UV), no infravermelho (IV), e posteriormente com a ressonância magnética nuclear (RMN), e a espectrometria de massas (EM) além das técnicas hifenadas, o processo de determinação estrutural foi impulsionado e facilitado. Alguns bancos de dados de moléculas foram criados, assim como alguns programas de identificação de moléculas.

Nos anos 90, com os avanços em *high-throughput screening*, que permite a análise de várias amostras em um pequeno intervalo de tempo, aliado à química

combinatória, houve uma mudança no cenário da QPN e a fitoquímica deixou de ser "protagonista". Em 2001, acreditava-se que a química combinatória poderia tornar-se o ouro da indústria farmacêutica do próximo milênio [17]. Porém, no período de 1981 a 2006, apenas uma substância produzida por química combinatória foi aprovada para uso medicinal, o antitumoral sorafenib (**14**) da Bayer, aprovado pelo *Food and Drug Administration* em 2005 [18-20]. Com essa ineficiência da química combinatorial, a indústria farmacêutica volta seu interesse para a busca por novas moléculas de origem natural.



(**14**)

1.2. A família Rubiaceae Juss.

A família Rubiaceae Juss. foi descrita pela primeira vez em 1789 por Antoine Laurent de Jussie, como uma das maiores famílias entre as angiospermas, constituída por quatro subfamílias: *Ixoroideae* (rica em gardenosídeos, geniposídeo e ixorosídeo), *Rubioideae* (rica em asperulosídeo ou ácido desacetilasperulosídico), *Cinchonoideae* Raf. e *Antirheoideae* Raf. (ricas em loganina) [21-22]. É composta por 44 tribos, com aproximadamente 637 gêneros e cerca de 10700 espécies. Distribui-se predominantemente em regiões tropicais, com a maioria de suas espécies encontradas na América do Sul. [23] Entre suas espécies destacam-se a *Coffea arabica* L., o café com grande importância alimentar além da *Genipa americana* L., genipapo, a *Ixora* spp., a *Mussaenda* spp. e a *Gardênia* spp de uso ornamental e *a Cinchona pubescens* Vahl de uso industrial [24-29], [7].

No Brasil a família Rubiaceae é representada por aproximadamente 2000 espécies distribuídas em 110 gêneros [30] que ocorrem nos principais ecossistemas brasileiros: Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica [31-32] sob a forma de árvores, arbustos, subarbustos até ervas perenes ou anuais, além de lianas e epífitas [23].

As espécies desta família apresentam grande diversidade de metabólitos secundários, elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários (carboidratos, aminoácidos e lipídeos) [33], melhor conceituados por Gottlieb [34] como metabólitos especiais tais como alcalóides indólicos, taninos, triterpenos, saponinas, esteróides e flavonóides [35-40], [25], [28].

Um levantamento bibliográfico [41], apresenta a subfamília Rubioideae com a segunda maior em concentração de alcalóides [42], sendo que as espécies desta subfamília estão distribuídas em 15 tribos, onde a maior é a Psychotrieae, formada por aproximadamente 50 gêneros [21].

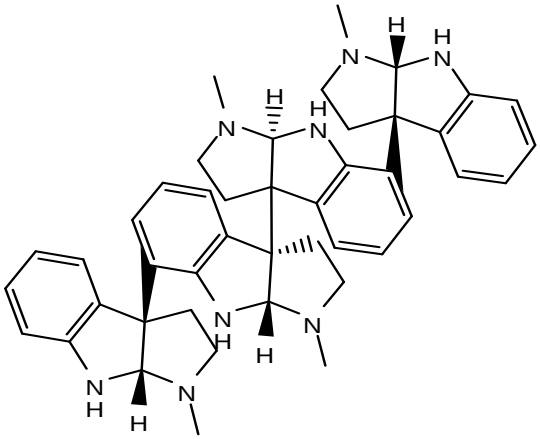
1.3. O gênero *Psychotria* L.

De origem austro-asiática, o gênero *Psychotria* foi descrito por Linneaus em 1759, como um dos maiores gêneros de plantas com flores. Compreende cerca de 2000 espécies, e é taxonomicamente complexo devido à dificuldade de delimitações de suas fronteiras [42-47], [21]. A maioria das espécies são árvores pequenas e arbustos, presentes em sub-bosques de florestas tropicais [48].

A subfamília Rubioideae é distribuída em 15 tribos, sendo que a Psychotrieae é a maior delas, com cerca de 50 gêneros [42], baseado em características morfológicas e distribuição geográfica, este gênero foi dividido em três subgêneros por Petit e Steyermark: Psychotria (pantropical), Tetramerae (inclui algumas espécies de África e Madagascar) e Heteropsychotria (inclui o restante das espécies de *Psychotria* no neotrópico) [47], [21], [49-50].

Plantas do subgênero Heteropsychotria, assim como espécies de *Psychotria* coletadas no sul do Brasil revelaram a presença de alcalóides indol-monoterpênicos [42], [51-58], [46].

Como descrito por Lopes [47] alcalóides do tipo polindólicos são os principais metabólitos especiais encontrados em *Psychotria* pantropical, sendo a quadrigemine A (**15**), derivada da condensação de várias *N*-methyltryptamine, o mais relatado.



(**15**)

Este gênero é vastamente empregado em medicina popular no tratamento de diversas doenças [59] e possui inúmeras atividades farmacológicas descritas na literatura, dentre as quais se destaca a atividade sobre o sistema nervoso central [21].

O interesse etnobotânico deste gênero, assim como a motivação da pesquisa brasileira em *Psychotria* se deve ao preparo de uma bebida alucinógena, conhecida como “ayahusasca” no Peru, “yagé” na Colômbia e no Brasil como “caapi”, “santo daime” ou “daime”, utilizada pelos caboclos da Amazônia para fins religiosos, medicinais e sociais [60-62], esta bebida é preparada utilizando as espécies *Psychotria viridis* e *Psychotria carthagenensis,* com o decocto de cascas de *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb) Morton (Malpighiaceae).

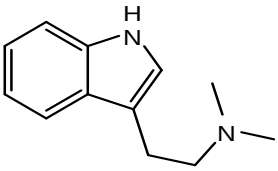
1.4. A espécie *Psychotria carthagenensis* Jacq.

A espécie *Psychotria carthagenensis* Jacq. **Figura 1,** p.8, é um arbusto que atinge de 2 à 3 m de altura [63], originário do cerrado brasileiro, conhecido popularmente como “carne-de-vaca”, “cafeeiro-do-mato” ou “maria-mole”.

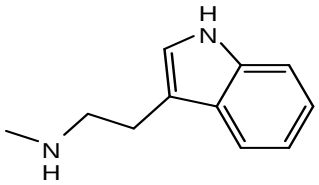
Figura 1: Foto da espécie *P. carthagenensis*, por Milton Groppo, 2011.

Distribui-se em ambientes distintos [64] nas Américas, da Costa Rica à Argentina e no Brasil, ocorre do Pará ao Rio Grande do Sul [65], desde o nível do mar até 600m de altitude [66].

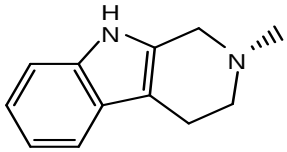
Relatados por Rivier e Lindgren em 1972, estudos das folhas de *P. viridis* e *P. carthagenensis* revelaram quantidades substanciais do alcalóide *N,N*-dimetiltriptamina (**16**), traços de *N*-monometiltriptamina (**17**) e 2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolina (**18**) [67-68]. A análise de *Banisteriopsis caapi* revelou β-carbolínas (harmina (**19**), harmalina (**20**) e tetrahidroharmina (**21**)), harmol (**22**) e 6-metoxitriptamina (**23**) [68].



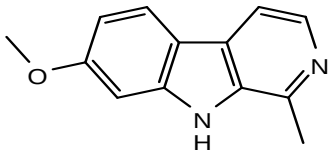
(**16**)



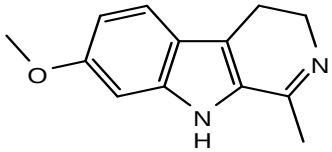
(**17**)



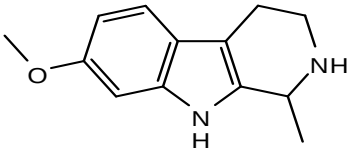
(**18**)



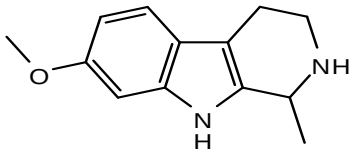
(**19**)



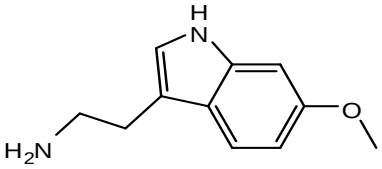
(**20**)



(**21**)



(**22**)



(**23**)

No sul do Brasil, partes aéreas de *P. carthagenensis* substituem *P. viridis* no preparo do “santo daime”. Curiosamente, o extrato etanólico das folhas desta espécie não apresenta alcalóides opióides, porém isso não implica em sua ausência em outros locais de ocorrência [43], [68], [62], sugeriram duas hipóteses para a ausência de alcalóides opiódes; houve problemas na identificação do material vegetal feito na década de 70 ou o efeito alucinógeno da bebida se deve a outras substâncias bioativas ainda não identificadas, com atividade no sistema nervoso central, sendo pouco provável que seja o alcalóide triptamina.

Um trabalho feito por Lopes [69] reporta a ausência de picos característicos no espectro de UV do cromóforo indólico em 223 e 290nm na análise de *P. carthagenensis* por HPLC/PDA.

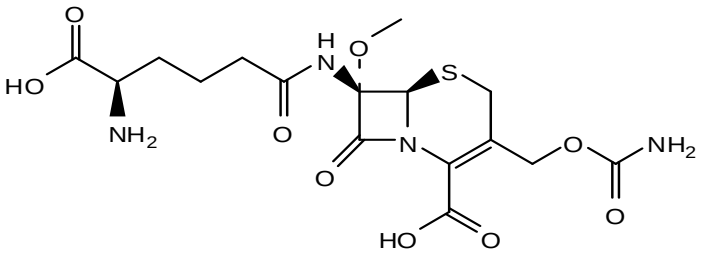
Tal espécie foi selecionada como objeto de estudo devido às características alucinógenas de sua casca, pela sua baixa toxicidade, e sua possível atividade no sistema nervoso central (SNC) [68]. Além disso, o pouco conhecimento sobre sua composição química e ação farmacológica.

1.5. O gênero *Streptomyces* e a actinobactéria 36 (50PL)

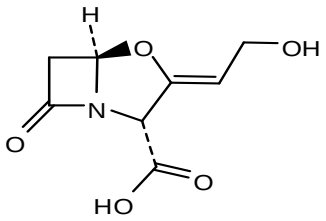
Streptomyces são bactérias gram-positivas que utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia para o crescimento. Sua temperatura ótima de crescimento está entre 25-35°C e seu pH ótimo está na faixa de 6,5-8,0, suas espécies são bem distribuídas e abundantes no solo [70].

Notável pela produção de metabólitos especiais, principalmente antibióticos [71-72], actinobactérias do gênero *Streptomyces* produzem substâncias antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antitumorais, anti-hipertensivas e anti-colesterolêmicas [73].

Dentre os antibióticos comercializados mundialmente, destacam-se os β-lactâmicos, penicilnas, cefalosporinas e cefaminas. Ao longo dos anos, algumas linhagens foram desenvolvendo resistência a antibióticos, a solução para isto foi a descoberta da cefamicina C (**24**) em culturas de *Streptomyces sp.* por pesquisadores da Merck, resistente a β-lactamases de bactérias gram-negativas, esta molécula é precursora de vários antibióticos, chamados cefâmicos [74]. O ácido clavulânico (**25**) de *Streptomyces clavuligerus* [75-76] que apesar de possuir fraca atividade antibiótica é um potente inibidor de β-lactamases, ambos são empregados em cobate a infecções [73].



(**24**)



(**25**)

Mais de 500 espécies de *Streptomyces* são reconhecidas atualmente sendo este o gênero mais bem sucedido neste grupo. Algumas espécies são patogênicas para animais e algumas causam doenças em plantas [77].

No extrato em AcOEt da actinobactéria 36 (50PL) foram encontradas 11 leucinostatinas: T, F, D, N, H, B2, L, R, B, S e U, da clase dos lipopeptídeos e

lipoaminopeptídeos, com diversas atividades biológicas como antiviral, antitumoral, além da atividade fitotóxica [78].

1.6. Atividade antiacetilcolinesterásica

O Mal de Alzheimer (MA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e fatal do SNC, que atinge primeiramente a memória, e posteriormente disfunções intelectuais e motoras são acentuadas, podendo levar ao óbito [79]. É considerada a quarta maior causa de morte em pessoas acima de 65 anos e o número de diagnósticos têm crescido juntamente com o aumento da expectativa de vida das populações, aliado à drástica redução das taxas de natalidade, que transformam o MA num grave problema de saúde pública [80] e um dos maiores problemas de saúde do século XXI [81], [79]. Entre 24 e 37 milhões de pessoas, em todo o mundo, já vivem com essa doença, esse número pode chegar a 115 milhões até 2050 [82]. Atualmente nos Estados Unidos vivem 5,4 milhões de pessoas com Alzheimer, esta já é a sexta maior causa de morte, seu tratamento custa aos americanos 183 bilhões de dólares anualmente [83]. No Brasil, a enfermidade atinge cerca de 1 milhão de idosos, sendo a terceira maior causa de morte entre eles [84].

Embora a causa do desenvolvimento do MA não seja clara, ela está associada à deficiência na transmissão colinérgica [85]. Observou-se que a atividade colinérgica no SNC encontra-se acentuadamente reduzida em portadores do MA [86-88]. A acetilcolina está envolvida na transferência de sinais na sinapse [89].

O tratamento do MA é sintomático e baseia-se na tentativa de restauração da função colinérgica. Uma das abordagens consiste no tratamento colinérgico da doença, e o método que demonstrou maior eficácia clínica foi o uso de inibidores diretos da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela desativação do neurotransmissor acetilcolina por hidrólise, produzindo colina e acetato **Figura 2**, p.11, reação esta que ocorre na fenda sináptica [89-90].

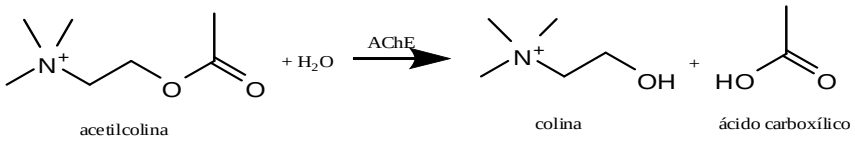


Figura 2: Catálise da acetilcolina.

Extratos naturais são uma fonte promissora de inibidores de AChE [85], [91]. Na região do Cáucaso, os bulbos de galanto (*Galanthus sp*) são usados no tratamento de falta de memória. Atualmente, o composto ativo desta planta, a galantamina, é comercialmente isolado de espécies de *Narcissus* e utilizado no tratamento do MA com o nome comercial de Reminyl [92-93]. Outros inibidores de AChE derivados de planta utilizados no tratamento de Alzheimer são a huperzina A (isolada da *Huperzia serrata*) [94] e a Rivastigmina (Excelo®) um derivado da physostigmina isolada da semente de *Physostigma venenosum* [95].

Alguns compostos tem sido utilizados como inibidores de AChE, mas devido a efeitos colaterais e os elevados custos econômicos que não se limitam ao preço do medicamento, mas a consulta médica, a incapacidade de se cuidar, aos meios de diagnóstico, ao internamento, a fisioterapia, ao trabalho dos cuidadores, a perda de produtividade do doente e do cuidador e a perda de saúde [79], ainda há grande interesse em encontrar melhores inibidores para esta enzima [90], o que pode ser feito através de bioensaios com a enzima AChE utilizando as metodologias de Ellman e Marston, além do teste falso positivo.

1.7. Atividade antioxidante

A fim de produzir energia, o organismo humano realiza uma série de reações químicas onde são produzidos “radicais livres” que são reativos, instáveis e prejudiciais ao ser humano. O oxigênio essencial às formas de vida aeróbicas pode ser inapropriadamente metabolizado, tornando-se tóxico ao organismo, como por exemplo, na redução incompleta da água durante a respiração; a exposição à ação de radiações de ionização ou ultravioleta; pela ação de enzimas ou pela transferência de elétrons [96-97].

O grande interesse por substâncias antioxidantes se deve principalmente ao envolvimento dos radicais livres na etiologia de várias doenças, incluindo asma, inflamações, câncer, as doenças degenerativas do SNC, o MA, o Mal de Parkinson e o próprio processo de envelhecimento. As células e os tecidos vivos estão permanentemente expostos a processos oxidativos contra os quais podem ser protegidos pela ação de antioxidantes naturais [98-99].

Tendo em vista que os antioxidantes são capazes de remover ou prevenir a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Eros), inibindo a deterioração *in vitro* [100], há um grande interesse na identificação de substâncias capazes de inibir a oxidação das bases do DNA por Eros e que auxiliem na cura de patologias decorrentes do estresse oxidativo.

Trabalhos mostram que os compostos fenólicos, como por exemplo, os flavonóides, constituem uma das classes mais eficientes de antioxidantes naturais e discutem a descoberta de novas substâncias que possam ser incluídas na dieta alimentar a fim de manter o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante corporal, evitando o estresse oxidativo [101-102].

As substâncias fenólicas são largamente distribuídas em frutos, legumes, grãos, sementes, folhas, raízes e cascas, e são capazes de retardar o envelhecimento, o aparecimento de doenças e até impedí-las de ocorrer [103].

O potencial antioxidante de moléculas e extratos naturais pode ser avaliado através de ensaios rápidos e baratos, tais como os testes que utilizam β-caroteno e o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) [104].

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Triagem química biomonitorada de extratos naturais por ensaios simples, rápidos, seletivos e baratos.

2.2. Objetivos Específicos

- Triagem da atividade antioxidante e/ou inibitória da enzima acetilcolinesterase de extratos naturais de origem vegetal e microbiológica;
- Estudo fitoquímico dos extratos hexânicos e etanólicos de caules e folhas da espécie *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae);
- Estudo químico do extrato etanólico da actinobactéria-36(50PL) isolada da rizosfera do milho.

3. Material e métodos

3.1. Material utilizado

3.1.1. Equipamentos

- Agitador magnético Fisatom, modelo 752;
- Balança analítica Marte, modelo AY-220;
- Balança eletrônica Coleman, modelo Mark 2200;
- Balança semi-analítica Shimadzu, modelo BL 320H;
- Bomba hidrovácuo Marconi, modelo MA 053;
- Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu, modelo GCMS-QP2010;
- Coluna para CG-MS DB-5, 30m X 0,25mm, 0.25µm;
- Cromatógrafo líquido (HPLC) Shimadzu – Prominence composto por duas bombas de solvente Shimadzu, modelo LC-20AD, um detector de arranjo de diodos com comprimento de onda variável Shimadzu, modelo SPD-M20A, um auto-injetor Shimadzu, modelo SIL-20A, uma controladora Shimadzu, modelo CBM-20A, um degaseificador Shimadzu, modelo DGU-20A5, software LC Solution;
- Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas Electrospray Quattro-LC;
- Espectrofotômetro de infravermelho Perkin Helmer, modelo IFTIR – RX, analises feitas em pastilhas de KBr;
- Espectrômetro de massas Waters de alta resolução, modelo Q-Tof 2;
- Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear Brucker, modelo DRX-500 e DPX-300;
- Espectrofotômetro UV-Vis com leitor de Elisa e filtro 517nm;
- Estufa digital time microprocessada para esterilização e secagem Marte, modelo MSE 1.3 E;
- Estufa ESCO Isotherm, modelo IFA-54-8;
- Lâmpada de ultravioleta Spectroline, 365 e 254nm;
- Moinho de facas tipo Willey, modelo TE-650
- pH-metro Marte, modelo MB 10;
- Rotavapor BUCHI, modelo R – 124;

- Rotavapor BUCHI, modelo R II;
- Sistema MILLI-Q MILLIPORE;
- Ultra-som UNIQUE, modelo USC-1400;
- Vórtex Marte, modelo Heidolph Reax top.

3.1.2. Solventes, suportes e reagentes

- Cromatofolha de alumínio, TLC Silica gel 60, F_{254}, 20 X 20 cm, Merck e Aldrich;
- Cromatoplaca de óxido de alumínio 150, F_{254} (tipo T), 5 X 20 cm, Merck;
- Lipophilic Sephadex Sigma-Aldrich 25-100µ LH20100-100G;
- Sephadex Healthcare LH-20;
- Sílica-gel 60 (0,063-0,200mm) para cromatografia em coluna MERCK;
- Solventes deuterados Aldrich e ISOTECinc;
- Solventes para extração, fracionamento e purificação J. T. Baker, CARLO ERBA, Merck e Synth com grau analítico adequado;
- Reagentes Sigma-Aldrich.
- Coluna para HPLC C18(2) Phenomenex (250 X 4,6 - mm) 5µm;

3.2. Métodos

3.2.1. Ensaios em cromatoplacas

Todos os ensaios foram desenvolvidos sobre cromatofolhas de sílica nas quais 2,5µL de cada amostra diluída em solventes apropriados foram aplicadas na concentração mínima de 20mg/mL para as frações e extratos brutos e 10mg/mL para os compostos puros. Em alguns casos as amostras foram aplicadas pontualmente e, em outros, foi feita a otimização das condições cromatográficas e as amostras foram eluidas na melhor condição. Após a secagem das placas foram feitos os ensaios.

3.2.1.1. Bioensaio com acetilcolinesterase utilizando o método de Ellman

Em cada cromatoplaca foram aplicados 2,5µL do padrão galantamina 0,1mM em MeOH. A atividade enzimática foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando o reagente de Ellman (ácido 5,5’-ditiobis-[2-nitrobenzóico]).

O princípio deste método consiste na medida da velocidade de produção da tiocolina através da hidrólise do substrato, acompanhado pela contínua reação de um tiol com o íon 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB) (I) para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (II) com intensa absorção em 412 nm **Figura 3**, p.16, [105].

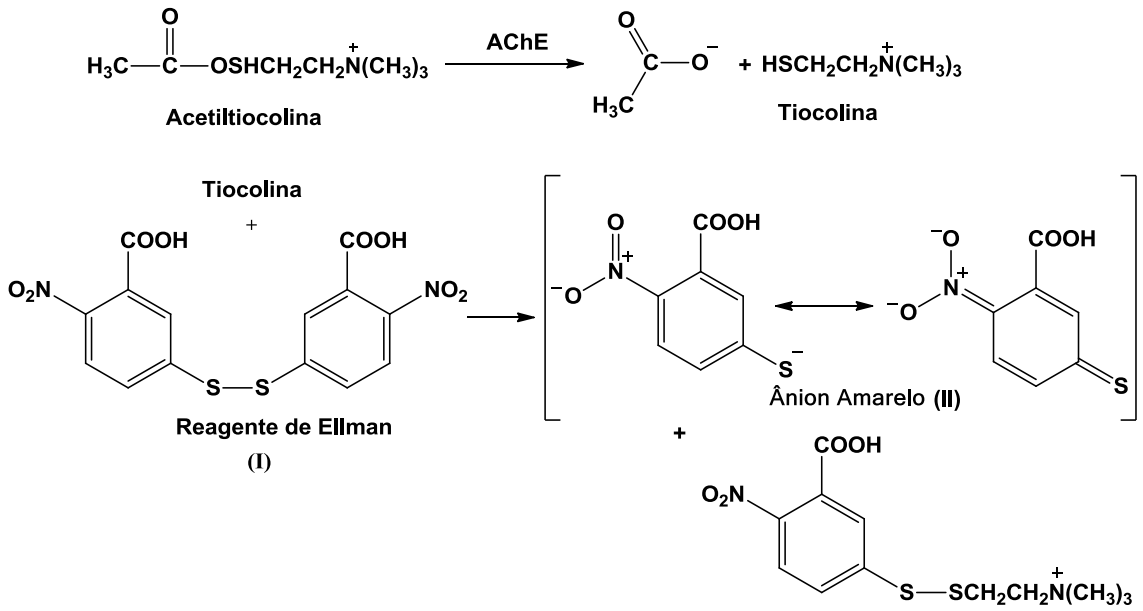


Figura 3: Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.

Para isto, foi seguida a metodologia de Ellman adaptada por Rhee [90]. O tampão A foi preparado, misturando-se 182,5mg do tampão tris HCl em 80mL de água, ajustando o pH 8 com HCl 10%v/v. Em 25 mL de tampão A foram dissolvidos: 9,9mg de DTNB e 7,23mg de iodeto de acetilcolina (ACTI) (solução 1), 0,704mg da enzima AChE de enguia elétrica foi dissolvida em 300µL de água (solução 2), 25mg de albumina sérica bovina (BSA) foi solubilizada em 25mL de tampão A (solução 3). A cromatoplaca foi nebulizada com a solução 1 e após 3 minutos, borrifada com uma mistura de 15 µL da solução 2 e 5 µL da solução 3.

A resposta positiva foi observada pelo surgimento de halos brancos contra o fundo amarelo que se desenvolveu sobre a cromatoplaca, correspondente aos compostos com atividade inibitória da AChE.

Relatos na literatura indicam que compostos como aldeídos e aminas podem provocar resultados falso-positivo no ensaio de Ellman [106]. Estes compostos impedem a reação entre a tiocolina (produto da reação enzimática) e o reagente de

Ellman, consequentemente não haveria a formação do ânion amarelo resultando na formação do halo branco. No entanto, nesse caso não há inibição da atividade enzimática, e sim da reação química entre o produto da reação e o corante.

Assim, a fim de distinguir entre os compostos que atuam realmente na inibição da atividade enzimática e aqueles que atuam na reação química entre a tiocolina e o reagente de Ellman, as amostras foram submetidas ao teste falso positivo.A cromatoplaca com o padrão galantamina foi nebulizada com as soluções 4 e 5 e após 3 minutos nebulizada com 9,9mg de DTNB solubilizado em 25mL de tampão A. Os halos brancos evidenciam a presença de compostos falso-positivos, que não inibem a enzima.

3.2.1.2. Ensaio com acetilcolinesterase utilizando o método de Marston

Este ensaio foi realizado seguindo a descrição feita por Marston e colaboradores [107], no qual a atividade enzimática é detectada pela conversão do acetato de α-naftil a α-naftol que reage com o sal de diazônio Fast Blue B formando um corante diazo de cor púrpura **Figura 4**, p.17.

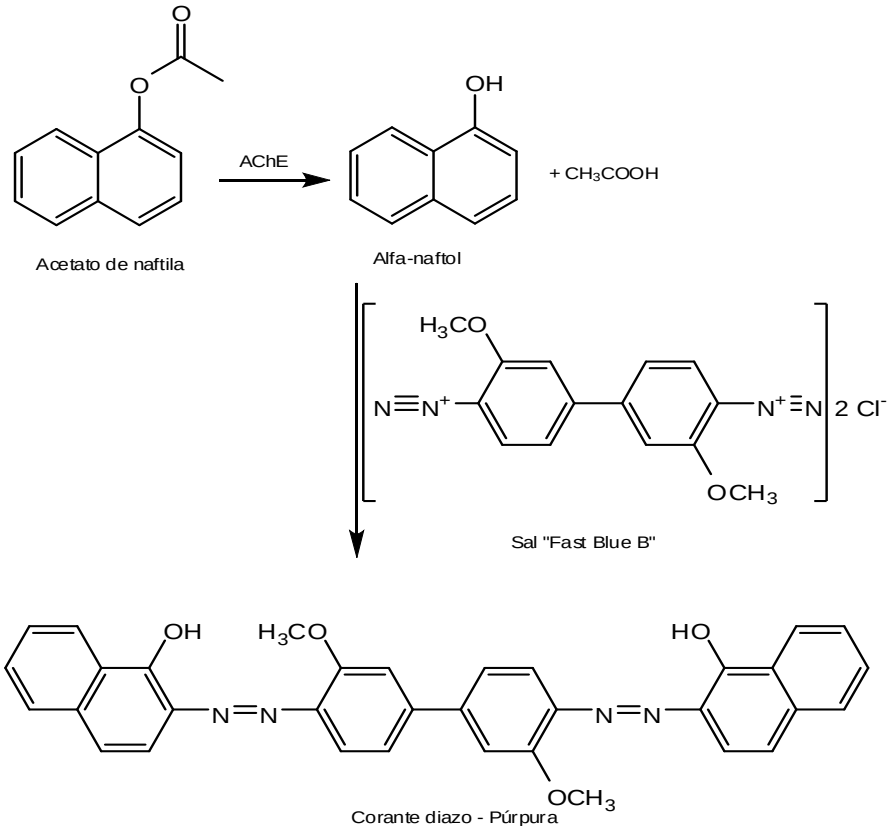


Figura 4: Catálise do acetato de α-naftil e reação com Fast Blue.

No preparo do tampão B, 273mg de tampão tris HCl foi solubilizado em 30mL de água e o pH foi ajustado para 7,8 com HCl 10%v/v. Agitou-se por 5 minutos 25mg de BSA (estabiliza a enzima durante o ensaio), 84µL da enzima AChE (0,9mg de AChE em 200µL de água) e 25mL de tampão B (solução 6). Em 12 mL de água, adicionou-se 30mg de sal fast blue (solução 7). Em 3mL de etanol, adicionou-se 7,5mg de acetato de α-naftil (solução 8). As cromatoplacas foram nebulizadas com a solução 6 e incubadas a 37°C por 20 minutos em um ambiente úmido. Após incubação, as soluções 7 e 8 foram misturadas e nebulizados sobre a cromatoplaca que desenvolveu uma coloração púrpura contra a cor branca dos halos representando compostos presentes na amostra que inibiram a enzima não ocorrendo, portanto, a formação do α-naftol e a consequente formação do corante púrpura.

3.2.1.3. Ensaio utilizando biorreatores enzimáticos (IMER-AChE)

A enzima AChE de *Electrophorus electricus* foi imobilizada na parede interna de um capilar de sílica fundida com dimensões de 30cm x 0,01mm D.I. e utilizada como coluna acoplada ao HPLC, tendo como fase móvel o tampão Tris-HCl pH 8,0 e DTNB 0,1mM. O monitoramento do produto da reação enzimática foi feito utilizando-se a metodologia de Ellman [105]. Na presença do inibidor padrão tacrina, ocorre diminuição da banda cromatográfica, **Figura 5**, p.18-19. O procedimento de imobilização e a escolha do suporte de imobilização foram baseados em trabalhos desenvolvidos anteriormente no grupo [113] [114]. O biorreator denominado IMER-AChE foi desenvolvido como parte da dissertação de mestrado de Joyce Izidoro da Silva [115].

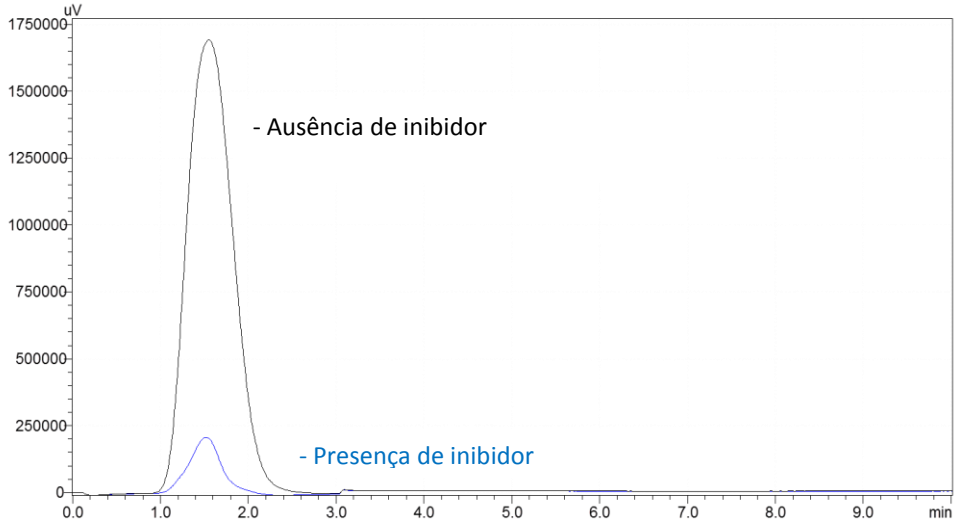


Figura 5: Cromatograma representando a diminuição da banda de absorção na presença do inibidor Tacrina 200µM.

As amostras foram injetadas na seguinte condição: 10µL da solução contendo 1mM de acetiltiocolina (substrato análogo da tiocolina em concentração de saturação) e 200µg/mL do extrato a ser testado (ou 200µM se inibidor padrão como a tacrina), vazão: 0,05 mL/min, detector DAD-UV: 412nm.

O percentual de inibição foi obtido comparando-se a atividade da enzima na presença do inibidor (V_i) com a atividade inicial da enzima (V_0), de acordo com a equação: (% de inibição = 1 – [V_i – V_0] x 100).

3.2.1.4. Ensaio Antioxidante com DPPH

Quando o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila ($DPPH^{\cdot}$) em presença de um antioxidante doador de hidrogênio passa à sua forma reduzida 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH-H) de cor amarela, seu elétron desemparelhado não está mais em conjugação com os grupos arilos, e, dessa forma, o DPPH-H sofre um decréscimo de absortividade molar em 517 nm **Figura 6**, p.19, [108], [109].

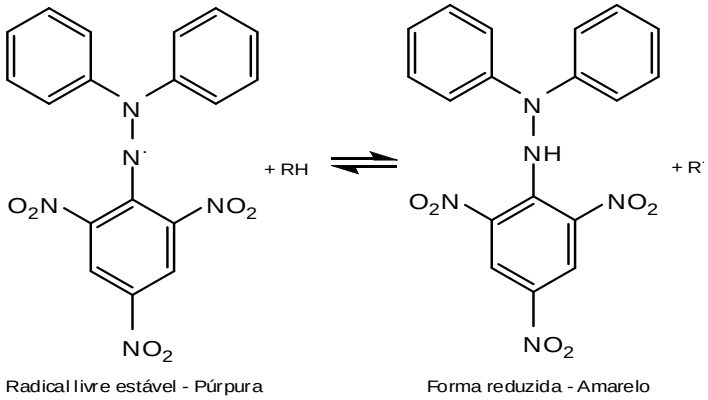


Figura 6: Mecanismo simplificado da reação entre o DPPH e um antioxidante doador de hidrogênio.

Os padrões rutina e quercetina (3mM em MeOH) foram utilizados neste ensaio onde cada cromatoplaca foi nebulizada com uma solução metanólica de DPPH 0,02%. O aparecimento de halos amarelos, após 30 minutos à temperatura ambiente, é decorrente da redução do DPPH, por um mecanismo baseado em transferência de elétrons, e caracterizam a presença de substâncias com atividade antioxidante.

3.2.1.5. Ensaio antioxidante com β-caroteno

O β-caroteno **Figura 7**, p.20, atua como antioxidante devido às suas ligações duplas conjugadas, que são suscetíveis à oxidação sob ação de luz ou oxigênio [110].

Os padrões utilizados neste ensaio foram rutina e quercetina (1mg/mL em MeOH). As cromatoplacas foram nebulizadas com uma solução de β-caroteno na concentração 0,2g/L em diclorometano, que foi extraída de cenouras compradas no comércio local de Ribeirão Preto, SP, seguindo o protocolo de Zeraik [111].

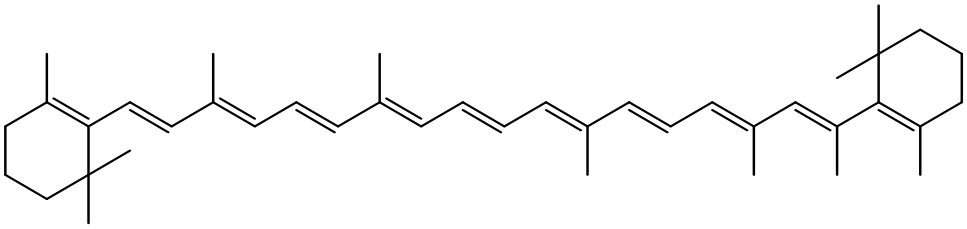


Figura 7: Estrutura do β-caroteno.

Após a nebulização, as cromatoplacas foram expostas à luz até o descoramento total da cor laranja do revelador. O resultado positivo foi observado pela permanência dos halos alaranjados característicos de substâncias com atividade antioxidante.

3.2.2. Ensaio em microplaca multipoços

3.2.2.1. Ensaio Antioxidante com DPPH

Para o ensaio espectrofotométrico em microplaca multipoços, uma solução de DPPH 0,01mg/mL em metanol foi misturada com soluções da amostra em sete concentrações diferentes 66,7; 33,3; 10; 6,67; 3,33; 2,67 e 1,67µg/mL, de forma que apresentasse absorbância em 517nm. A microplaca com triplicatas das amostras foi incubada em ausência de luz por 30 minutos, à 25°C e logo em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro (517nm) em intervalos de 15 minutos, durante 2 horas. O resultado positivo foi observado pelo decréscimo da absortividade molar e mudança da cor para amarelo. Os padrões utilizados foram quercetina, rutina e ácido clorogênico, diluídos para 33,3; 26,7; 20; 13,3; 6,7; 3,3 e 1,7µM.

A porcentagem de sequestro de radicais livres (SRL) foi calculada através da equação: % SRL= $[(A_c-A_{am})/A_c]x100$, onde A_c é a absorbância do controle e A_{am} é a absorbância das amostras. [112].

3.2.3. Material de origem microbiológica

3.2.3.1. Isolamento e identificação da actinobactéria

Os micro-organismos foram isolados no Estado de São Paulo, especificamente Socorro, Serra Negra e Ribeirão Preto (Sistema Agro florestal) e identificados pela doutoranda Flávia M. P. de Melo, sob orientação do Professor Doutor Itamar S. de Melo do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa – Jaguariúna [78].

3.2.3.2. Obtenção do extrato

O extrato foi produzido pela doutoranda Ana Flávia C. Martinez, sob orientação do Professor Doutor Luiz Alberto B. de Moraes – FFCLRP em meio semi-sólido de canjica amarela. As cepas com quatro dias de repique e as fermentações da actinobactéria-36 (50PL) foram feitas em erlenmeyers de 250mL de capacidade. Em

cada recipiente foram adicionados 25g de canjica amarela e 18mL de água e mantidos por 20 dias sem agitação. Em seguida adicionou-se 100mL de EtOH em cada erlenmeyer e eles foram mantidos sob agitação por um dia. Posteriormente a solução etanólica resultante foi filtrada e concentrada em um rotaevaporador [78].

3.2.4. Material de origem vegetal

3.2.4.1. Coleta do material vegetal

A primeira coleta da espécie *Psychotria carthagenensis* Jacq. foi realizada no dia 13 de março de 2008 às 9h30min, na Embrapa Gado de Corte - Campo Grande – MS, de espécimes com aproximadamente dois metros e com frutos. A identificação foi feita pelo Dr. Arnildo Pott, em trabalho de colaboração com a Dra. Lidilhone Hamersky, com número da excicata registrada no herbário da Embrapa-MS.

A segunda coleta desta mesma espécie foi realizada no dia 15 de abril de 2011, às 9h, na Estação Ecológica de Ribeirão Preto – SP, de espécimes com aproximadamente um metro e com frutos. A identificação foi feita por Carla P. Bruniera & Milton Groppo, coletor número 2062, com o número SPFR 12876 registrado no Herbário do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP.

3.2.4.2. Obtenção dos extratos

As folhas e caules de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (1ª coleta), *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos e *Cecropia pachystachya* Trécul assim como as folhas das espécies *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, *Annona coriacea* Mart. e *Cupania vernalis* Cambess., após secagem à sombra foram separados, moídos em moinho de facas e extraídos com Hex e EtOH à exaustão. A solução obtida foi concentrada sob pressão reduzida fornecendo os extratos hexânicos e etanólicos. Essa etapa foi realizada na FCFRP, em colaboração com o Professor Doutor Norberto P. Lopes.

As folhas de *S. adstringens*, *C. vernalis*, *Eugenia uniflora* L., as flores de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith e as folhas e caules de *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers. e as folhas, caules e frutos de *P. carthagenensis* (2ª coleta) foram separados, secos em estufa a 40ºC e em seguida moídos em um moinho de facas e

submetido à extração com EtOH no nosso laboratório. As soluções resultantes foram concentradas, fornecendo os extratos etanólicos.

3.2.5. Análise por HPLC

O desenvolvimento do método cromatográfico foi realizado em um cromatógrafo líquido – Shimadzu, onde foram testadas algumas colunas cromatográficas como C18, sílica, diol, além de várias fases móveis de diferentes polaridades. Foram injetados 20µL de amostra na concentração de 1mg/mL para cada análise.

3.2.6. Análise de EM por inserção direta

As amostras foram solubilizadas em MeOH, na concentração de 200µg/mL e analisadas por inserção direta em modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-), com MeOH/Água (1:1) e 1% acetato de amônio, no fluxo de 0,1mL/min, tensão capilar de 30V.

3.2.7. Análise de CG-EM

2µL da amostra oleosa foi solubilizada em 1mL de hexano, e analisada em um GC/EM Shimadzu, Biblioteca NIST05s.LIB e coluna DB-5 (30m X 0,25mm, 0,25 µm) com programação de temperatura 60°C a 290°C (10°C/min) por 15 minutos, temperatura do injetor 125°C, temperatura da fonte de íons 250 ^{o}C, temperatura interface 250 ^{o}C, modo scan, volume de injeção 1µL.

4. Trabalho Experimental

Um grande número de substâncias é isolado de diferentes fontes naturais em trabalhos descritos na literatura e, como estratégia pra identificar suas estruturas e atividades biológicas, vários ensaios rápidos, e baratos podem ser utilizados no monitoramento biológico do trabalho químico. Nesse projeto, empregam-se duas estratégias para este monitoramento, no intuito de identificar compostos com a atividade biológica de interesse. Na primeira utiliza-se bioautografia com β-caroteno e ensaios espectofotométricos com DPPH, com o objetivo de identificar agentes antioxidantes potenciais [116]. Na segunda, utilizam-se ensaios para identificação de inibição da enzima acetilcolinesterase.

O trabalho de triagem biológica iniciou-se com a escolha de extratos de origem microbiológica ainda não identificados como detentores das atividades biológicas destacadas acima.

4.1. Triagem do material de origem microbiológica

365 extratos e frações de micro-organismos e outras fontes foram aplicados sobre a cromatoplaca pontualmente na seguinte condição: 0,5µL das amostras em diferentes concentrações foram solubilizadas em MeOH, DMSO ou AcOEt juntamente com os respectivos padrões. 193 amostras foram submetidas apenas ao ensaio antioxidante com DPPH e 298 amostras foram submetidas apenas ao ensaio com reagente de Ellman, sendo que, 124 destas amostras foram submetidas aos dois ensaios. Os extratos foram fornecidos pelo Professor Doutor Luiz Alberto Beraldo de Moraes da FFCLRP em um trabalho de colaboração. Os ensaios foram realizados em TLC como descrito no **item 3.2.1.**, tanto para a atividade antioxidante com DPPH **Figura 8**, p.24, quanto anticolinesterásico pelo método de Ellman **Figura 9**, p.24, os resultados estão apresentados na **Tabela 1** anexa, p.94.

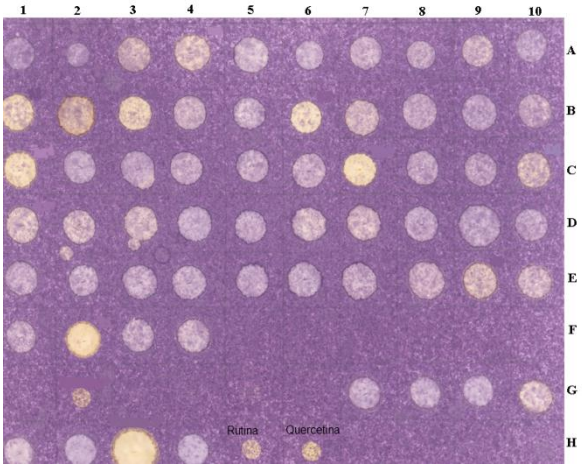


Figura 5: Triagem da atividade antioxidante em TLC. Os halos amarelos representam a capacidade antioxidante da amostra. Rutina (H-5) e quercetina (H-6) foram utilizados como padrão. * Extratos selecionados para o ensaio com DPPH em microplaca.

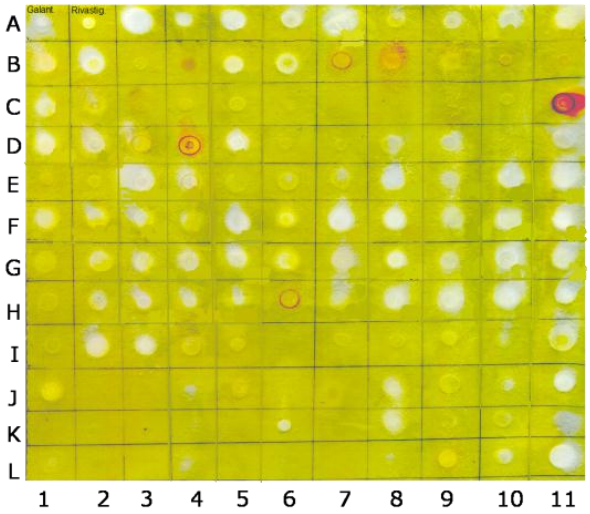


Figura 6: Triagem da atividade inibitória da AChE em TLC. Os halos brancos representam a atividade inibitória. Galantamina (A-1) e rivastigmina (A-2) 0,1 mM foram utilizados como padrão.

4.2. Ensaio em microplacas com DPPH

No ensaio espectrofotométrico em microplaca multipoços utilizando leitor de Elisa foram testadas sete amostras que apresentaram ótima atividade antioxidante na triagem inicial em TLC: pitanga folha, ASBV-1(Tiago), 21(Ana), 27(Ana), 31(Ana), Rolfsii e Rolfsii 1,216. Esse ensaio foi realizado no Laboratório do NuBBe no Instituto de Química de Araraquara-UNESP, em colaboração com a Professora Doutora Dulce Helena Siqueira Silva.

4.3. Purificação da actinobactéria-36 (50PL) guiada por ensaios – 1ª fermentação

Dos extratos testados, o extrato etanólico bruto obtido da actinobactéria 36 (50PL) em meio semi-sólido de canjica amarela apresentou ótima atividade antioxidante com DPPH, além de atividade antiacetilcolinesterásica pelo método de Ellman e foi selecionado para o processo de purificação. A fim de confirmar se a atividade apresentada pelo extrato devia-se aos compostos metabolizados pela actinobactéria e não àqueles inerentes ao meio de fermentação utilizado, o meio de cultivo também foi testado mostrando resultado negativo. Assim, o extrato da actinobactéria-36 (50PL) fermentada em meio de canjica amarela foi selecionado para etapa de purificação e identificação dos compostos responsáveis pela atividade observada. O extrato foi submetido a um procedimento de partição liquido-liquido como representado na **Figura 10**, p.25.

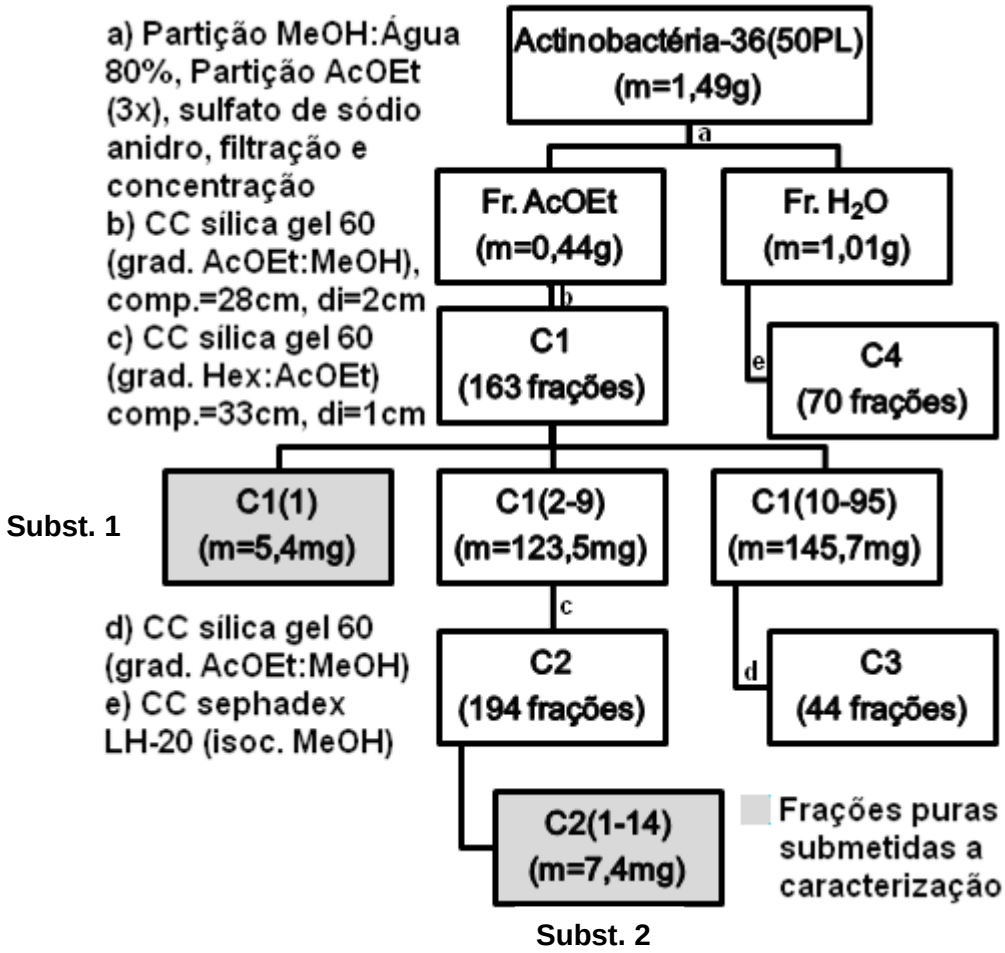


Figura 7: Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato da actinobactéria-36 (50PL) - 1ª fermentação.

Todos os extratos e frações obtidos foram submetidos a ensaios com DPPH e Ellman, **Tabela 2** anexa, p.102.

O extrato etanólico bruto da actinobactéria-36(50PL) (1,49 g) foi extraído com AcOEt e as duas frações resultantes, uma em AcOEt e outra em água, receberam Na_2SO_4 anidro, foram filtradas e concentradas.

A fração orgânica (0,44 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica aberta com sílica gel 60 resultando em 163 frações (C1), de aproximadamente 20 mL, que foram reunidas pela comparação dos valores de Rf após a revelação das cromatoplacas em reagentes adequados e UV.

A subfração C1(1) (5,4 mg) (**1**) apresentou-se como uma substância pura e com atividade antioxidante com DPPH e inibitória da AChE pelo método de Marston.

A substância **1** foi submetida à caracterizações espectroscópicas e espectrométrica para identificação de sua estrutura.

A subfração C1(2-9) (123,5mg) foi submetida a uma nova coluna cromatográfica de sílica gel 60 sendo obtidas 194 frações (C2), de aproximadamente 20mL, que também foram reunidas pelos valores de Rf e revelação em UV. A subfração C2(1-14) (7,4mg), substância **2** apresentou atividade inibidora da enzima AChE pelos métodos de Ellman e Marston e atividade antioxidante com DPPH. Foi submetida a caracterizações espectroscópicas para identificação de sua estrutura.

A subfração C1(10-95) (145,7mg) também foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica gel 60 resultando em 44 frações (C3), porém, não apresentou compostos puros com atividade promissora.

A fração aquosa (1,01g) foi submetida a uma coluna de purificação em sephadex LH-20 e as 70 frações (C4) resultantes foram reunidas pela comparação dos valores de Rf após a revelação das cromatofolhas em reagentes adequados e UV, mas também não apresentou compostos puros com atividade promissora.

4.4. Purificação da actinobactéria-36 (50PL) guiada por bioensaios – 2ª fermentação

A fim de se obter maior quantidade de extrato bruto, nova fermentação da actinobactéria 36 (50PL) foi realizada em meio de canjica amarela e seu extrato foi preparado como descrito anteriormente.

O extrato foi submetido à partição com AcOEt, resultando em duas frações que receberam Na_2SO_4, como agente secante e foram filtradas e secas em um rotaevaporador. As frações AcOEt (0,487g) e aquosa (0,21 g) foram submetidas à partição líquido-líquido com $CHCl_3$, AcOEt e 1-BuOH como descrito na **Figura 11**, p.27.

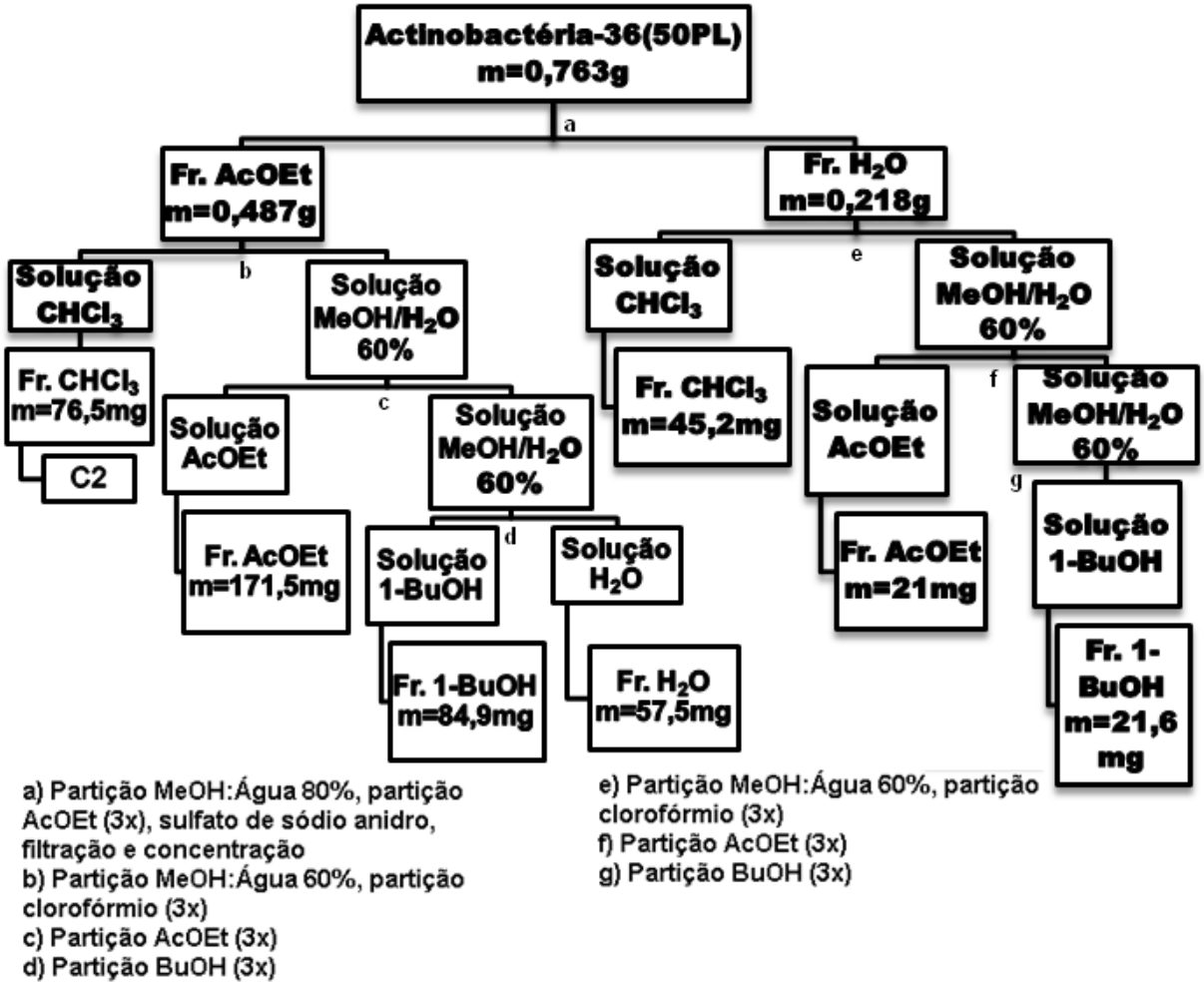


Figura 8: Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato da actinobactéria-36 (50PL) – 2ª fermentação.

Todos os extratos e frações resultantes foram submetidos aos ensaios antioxidante e anticolinesterásico. **Tabela 3** anexa, p.103.

A subfração $CHCl_3$ proveniente da fração em AcOEt da actinobactéria 36 (50PL) - 2ª fermentação, apresentou atividade antioxidante com DPPH e anticolinesterásica pelo método de Ellman **Tabela 3** anexa, p.103, e foi escolhida para o trabalho experimental de purificação e identificação dos compostos responsáveis pelas atividades observadas. 76,5 mg da fr. $CHCl_3$ foram aplicados em uma coluna aberta de sílica gel 60 (comp.=25,5cm; di=1cm) utilizando gradiente de eluição $CHCl_3$:MeOH (5-100% de MeOH). Foram coletadas 23 frações, C2-2ªf (coluna 2, 2ª fermentação), de aproximadamente 20 mL que foram reunidas através da comparação dos valores de Rf.

A subfração C2(1)-2ªf (6,7 mg) apresentou atividade antioxidante com DPPH e inibidora da AChE pelos métodos de Marston e Ellman, porém é falso positivo **Tabela 3** anexa, p.103. A amostra apresentou-se pura e posteriormente será caracterizada.

4.5. Triagem do material de origem vegetal – 1ª coleta

A fim de complementar e enriquecer o trabalho, além de micro-organismos, algumas espécies de plantas foram estudadas. Com destaque para a espécie *P. carthagenensis* que aliado a informações etnofarmacológicas do gênero *Psychotria*, foi escolhida como objeto de estudo principalmente pelos relatos sobre sua possível atividade no SNC, além de não haver relatos sobre atividades antioxidantes e anticolinesterásicas para esta espécie e por sua composição química ser pouco conhecida.

As folhas e caules secos de *P. carthagenensis* após moagem foram submetidos à extração com Hex e posteriormente com EtOH produzindo os extratos hexânicos e etanólicos brutos das folhas e caules.

Para o monitoramento do trabalho fitoquímico, o extrato etanólico bruto das folhas de *Psychotria carthagenensis* foi submetido a triagem através de ensaios visando a identificação, isolamento e caracterização de metabólitos secundários bioativos com potencial antioxidante e com ação inibitória sobre a enzima AChE, a fim de criar um banco de dados sobre as atividades dos extratos no laboratório.

Os ensaios para o extrato etanólico bruto das folhas da espécie *P. carthagenensis* foram realizados em cromatoplacas com eluição em Hex/AcOEt (70:30)% como descrito no **item 3.2.1.**, tanto para a atividade antioxidante, quanto anticolinesterásica **Figura 12**, p.29.

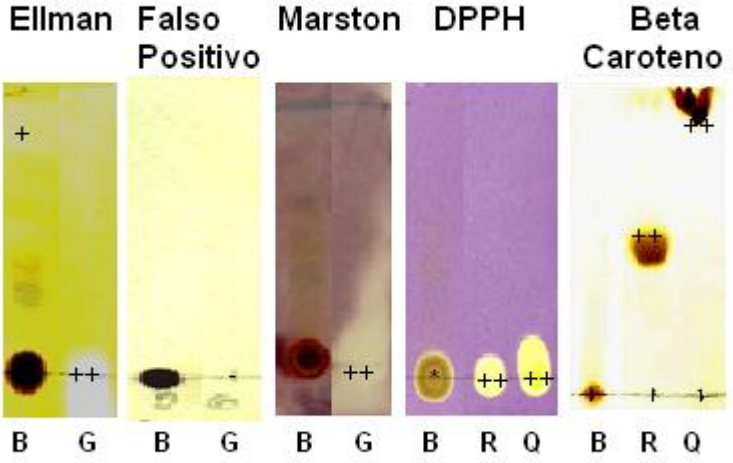


Figura 9: Triagem do extrato etanólico bruto (B) das folhas de *P. carthagenensis* em TLC com os respectivos padrões galantamina (G), rutina (R) e quercetina (Q). * a cor da matriz está mascarando a atividade, + baixa atividade, ++ boa atividade, - inativa.

Como observado na **Figura 12**, p.29, podemos afirmar que esta amostra apresenta baixa atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman, porém não é falso positivo e não apresenta atividade pelo método de Marston. No ensaio antioxidante com DPPH a cor da matriz mascara a atividade do composto, mas é bem provável que ele tenha atividade devido ao halo amarelo ao redor da amostra e no ensaio com β-caroteno esta amostra apresenta baixa atividade antioxidante.

Os extratos etanólicos brutos das folhas e caules foram submetidos a partições líquido-líquido com Hex, DCM, AcOEt e 1-BuOH como descrito na **Figura 13**, p.30.

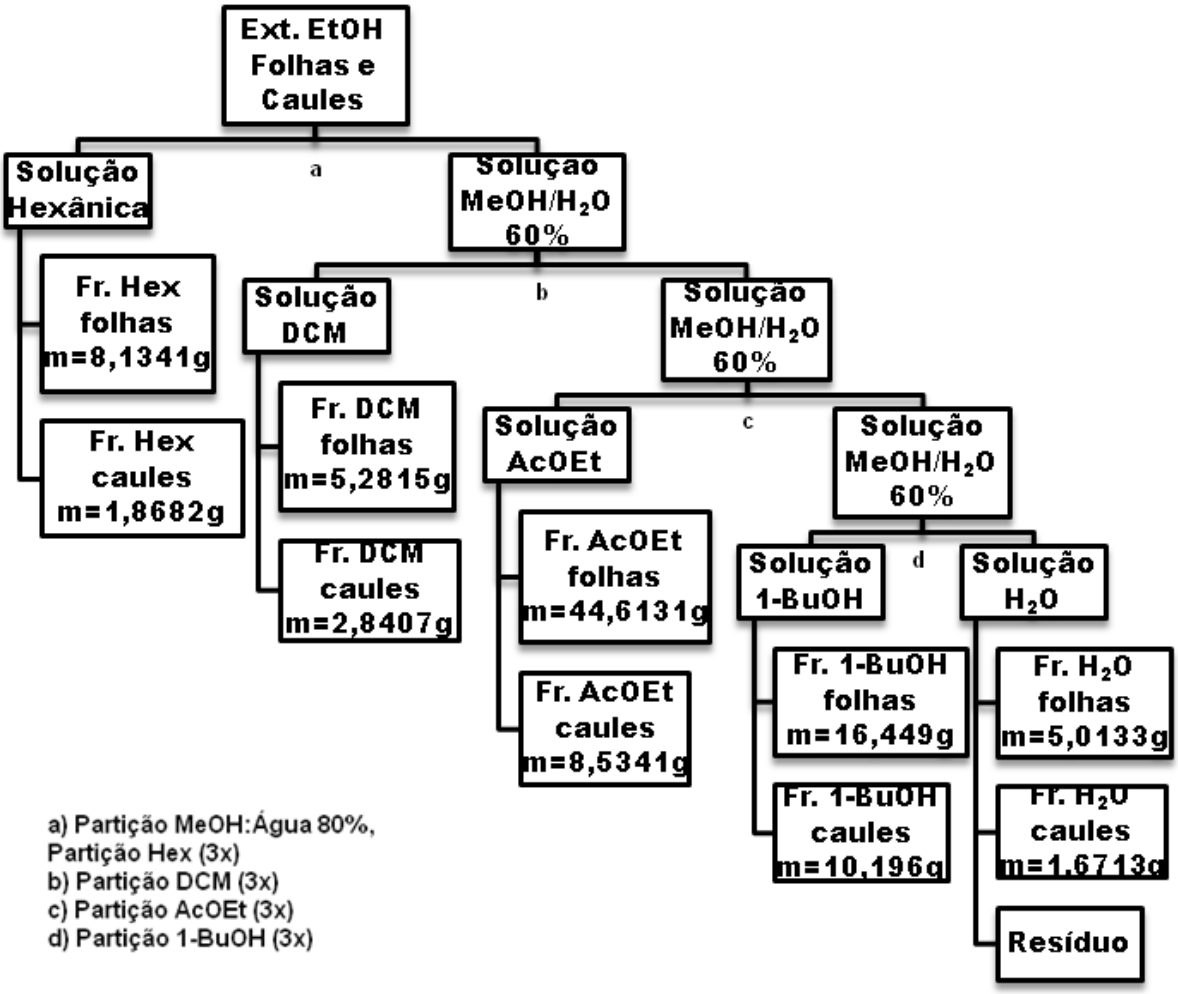


Figura 10: Fluxograma da partição líquido-líquido dos extratos etanólicos das folhas e caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta.

Todos os extratos e frações resultantes da partição foram submetidos a ensaios antioxidantes e anticolinesterásicos, com eluição nas condições cromatográficas apropriadas **Tabela 4** anexa, p.104.

4.5.1. Purificação do extrato etanólico bruto das folhas de *P. carthagenensis* – 1ª coleta

A fração hexânica proveniente da partição do extrato etanólico bruto das folhas apresentou atividade antioxidante com DPPH, e anticolinesterásica pelo método de Ellman e por ser a mais pura das frações quando analisada em CCDC, foi escolhida para o início do trabalho fitoquímico.

Esta fração Hex (8,1341g) foi submetida a uma filtração sólido-líquido com hexano (F1) (0,1231g) e posteriormente com MeOH (F2) (5,6935g) ambas em sílica gel 60, resultando em duas frações que foram secas em um evaporador rotativo e tiveram suas condições cromatográficas otimizadas.

A fração F1 apresentou-se mais pura e foi submetida a uma cromatografia em coluna com sílica gel 60 em gradiente de eluição Hex:AcOEt e as 40 frações resultantes C1-1ªcf (coluna 1 – 1ª coleta folhas), de aproximadamente 20 mL, foram reunidas após comparação dos valores de Rf.

A subfração C1(1)-1ªcf (126,3 mg) resultante, apresentou atividade antiacetilcolinesterásica pelos métodos de Ellman e Marston e antioxidante com DPPH e β-caroteno e foi selecionada para posterior trabalho de purificação. C1(1)-1ªcf, foi submetida a extração em fase sólida em cartucho (SPE) C18 com Hex, AcOEt, MeOH e H_2O. A subfração em Hex, uma mistura identificada como C1(1) - 1ªcf-SPE-Hex (70 mg) apresentou atividade antioxidante com DPPH e foi caracterizada por CG/EM.

As subfrações C1(4)-1ªcf (10,8 mg) e C1(12)-1ªcf (1,1 mg), ambas com atividade antioxidante com DPPH e β-caroteno também apresentaram atividade antiacetilcolinesterásica pelos métodos de Marston e Ellman. No entanto, ao submetê-las ao ensaio anticolinesterásico falso-positivo (**item 3.2.1.1.**, p.18) mostraram resultado positivo. A fração C1(4)-1ªcf, substância **3**, foi submetida à caracterização espectroscópica para identificação da estrutura da substância isolada. Já a fração C1(12)-1ªcf não apresentou massa suficiente para ser caracterizada.

A subfração C1(40)-1ªcf (3,9 mg), apresentou atividade inibidora da AChE pelos métodos de Ellman e Marston e foi purificada via HPLC analítico em uma coluna analítica C18 (Phenomenex, 250 X 4,6 mm, 5µm), no modo isocrático, fase móvel MeOH:Água (70:30 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min **Figura 14**, p.32.

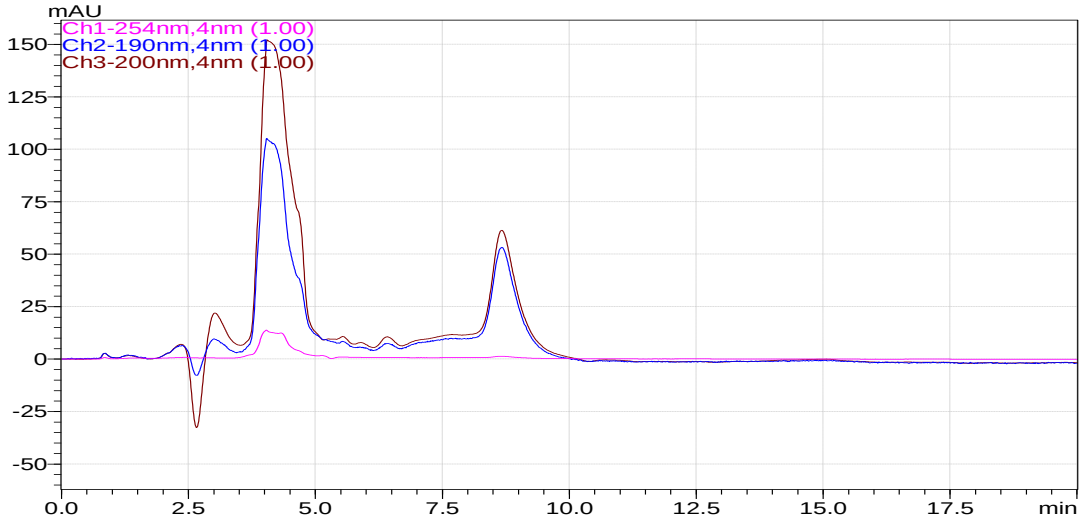


Figura 11: Cromatograma de separação da subfração C1(40)-1ªcf do extrato etanólico das folhas de *P. carthagenensis*.

As 4 frações resultantes foram submetidas aos ensaios e seus resultados estão compilados na **Tabela 5** anexa, p.104. Porém as massas obtidas não são suficientes para caracterização das amostras HPLC(2), HPLC(3) e HPLC(5), que apresentaram atividade anticolinesterásica pelos métodos de Ellman e Marston.

Todo o procedimento de separação está ilustrado na **Figura 15**, p.33.

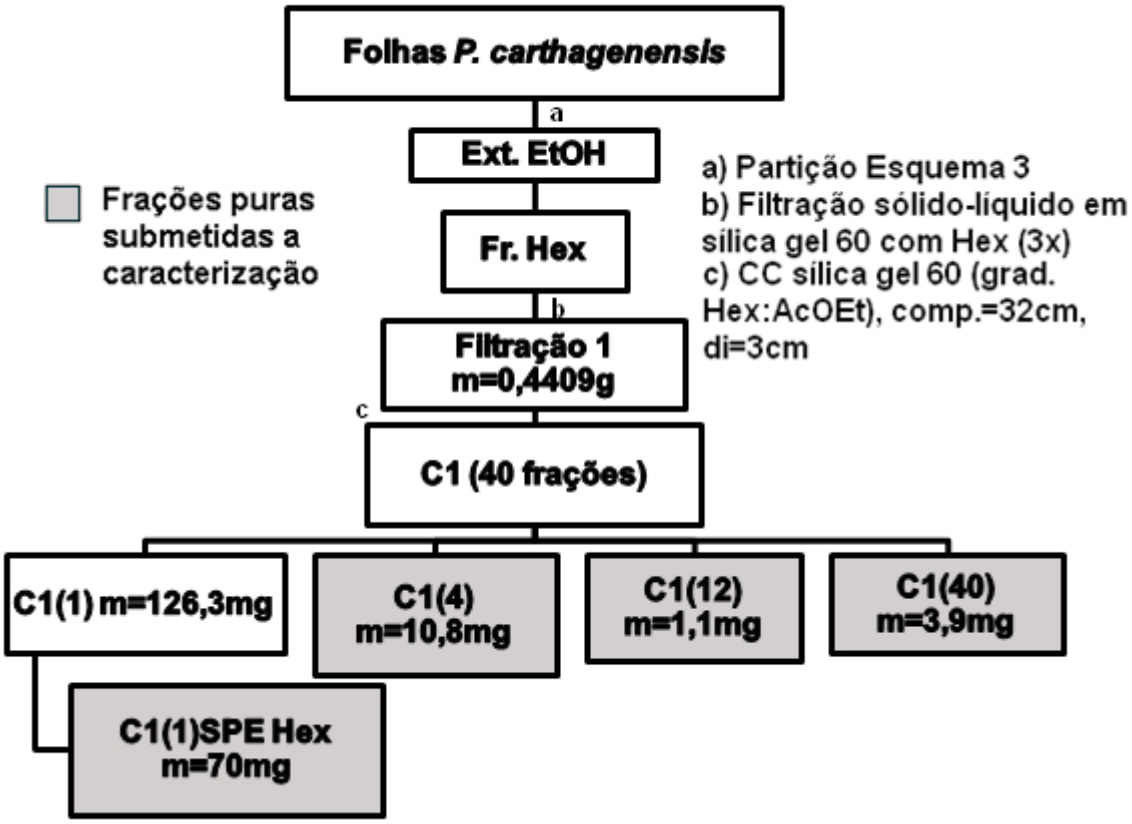


Figura 12: Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração Hex do extrato etanólico das folhas de *P. carthagenensis* – 1ª coleta.

A fração AcOEt (0,6938g) obtida da partição do extrato etanólico bruto das folhas de *P. carthagenensis* **Figura 13,** p.30, foi submetida a uma coluna de filtração em gel em Sephadex LH-20 (comp.=62cm, di=3cm) em modo isocrático com MeOH como fase móvel resultando em 98 frações (C9-1ªcf) de aproximadamente 10 mL cada que foram reunidas por CCDC através da comparação dos valores de Rf após a revelação das cromatoplacas com reagentes adequados. A subfração C9(6-8)-1ªcf (6,9 mg) apresentou atividade antioxidante com DPPH e inibidora da AChE pelos métodos de Ellman e Marston, e foi caracterizada por ^{1}H RMN.

O procedimento de separação está ilustrado na **Figura 16**, p.34.

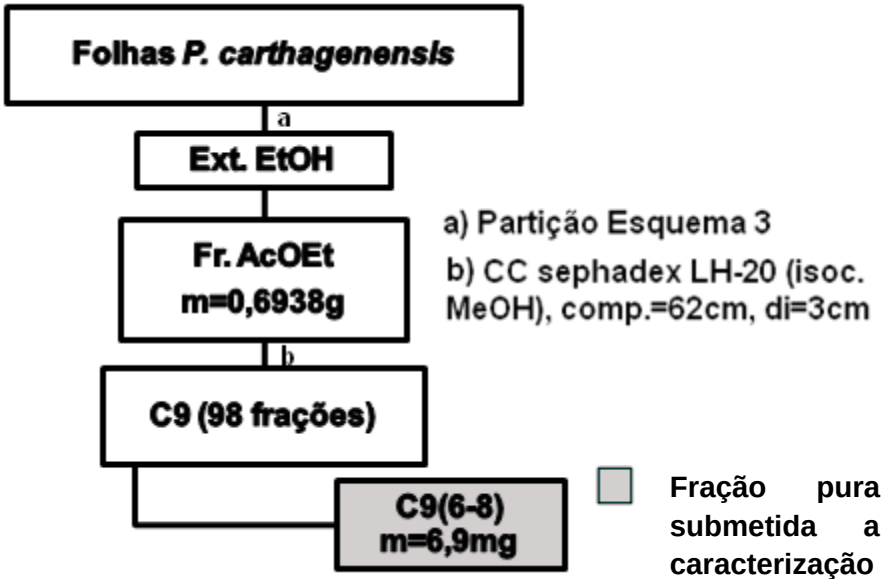


Figura 13: Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt do extrato etanólico das folhas de *P. carthagenensis*.

Todos os extratos e frações resultantes da purificação foram submetidos a ensaios antioxidantes e anticolinesterásicos **Tabela 5** anexa, p.104.

4.5.2. Purificação do extrato hexânico bruto das folhas de *P. carthagenensis* – 1ª coleta

O extrato hexânico bruto das folhas de *P. carthagenensis* (13,3172g) foi submetido a uma coluna cromatográfica de sílica gel 60 (comp.=26cm, di=5cm) em gradiente de eluição Hex:AcOEt (5-100% AcOEt), resultando em 117 frações (C3-1ªcf) de aproximadamente 10 mL cada, que foram reunidas pelos valores de Rf e reveladas em UV.

Das subfrações resultantes de C3-1ªcf, três mereceram destaque C3(1-3)-1ªcf (155,5mg) que apresentou atividade antioxidante com DPPH, C3(44-68)-1ªcf (1,6190g) com atividade de inibição da enzima AChE pelos métodos de Ellman e Marston e antioxidante com DPPH, e C3(113-116)-1ªcf (665,4mg), falso positivo, inibidor da AChE pelo método de Marston e antioxidante com DPPH.

A subfração C3(1-3)-1ªcf (155,5mg) foi submetida a uma nova coluna cromatográfica em sílica gel 60 (comp.=37cm, di=2cm) em gradiente de eluição Hex:AcOEt (5-100% AcOEt), resultando em 29 frações (C4-1ªcf) de aproximadamente 20 mL cada. A subfração C4(8)-1ªcf com atividade antioxidante

com DPPH e β-caroteno e inibidora da AChE pelo método de Ellman apresentou-se pura e foi submetida a caracterizações espectroscópicas e espectrométrica. Sua estrutura está em fase de elucidação e será, posteriormente determinada. A subfração C4(1-4)-1ªcf com atividade inibidora da AChE passou por uma nova coluna cromatográfica em sílica gel 60 (comp.=33cm, di=2cm) em gradiente de eluição Hex:AcOEt (5-100% AcOEt), resultando em 35 frações (C6-1ªcf) de aproximadamente 20 mL cada. A subfração C6(1)-1ªcf também com atividade antiacetilcolinesterásica pelo método de Ellman, passou por uma filtração simples com MeOH (3x) e a porção solúvel em MeOH, C6(1)FM-1ªcf (20,5 mg) foi seca e posteriormente submetida a caracterização por ^{1}H RMN, 300MHz. A subfração C6(2-5)-1ªcf (227,5 g) com atividade inibidora da AChE pelo método de Ellman, passou por uma nova coluna de purificação em sílica gel 60 (comp.=37cm, di=2cm) em gradiente de eluição Hex:AcOEt (5-100% AcOEt), resultando em 63 frações (C8-1ªcf) de aproximadamente 20 mL, que foram reunidas pelos valores de Rf e revelação com UV, a subfração C8(5)-1ªcf passou por uma filtração simples com $CHCl_3$ (3x) e a porção solúvel em $CHCl_3$, C8(5)FC-1ªcf (11,5 mg) com atividade no método de Ellman foi seca e posteriormente submetida a caracterização por ^{1}H RMN, 300MHz. A subfração C8(6)-1ªcf foi submetida a filtração simples com MeOH (3x) e os cristais, C8(6)cristais-1ªcf, remanecentes desta filtração foram caracterizados e sua determinação estrutural será realizada em trabalhos futuros.

A subfração C8(10)-1ªcf apresentou-se pura e também foi caracterizada por ^{1}H RMN. A subfração C6(6-7)-1ªcf (21,5mg) com atividade antiacetilcolinesterásica pelo método de Marston passou por uma filtração simples com Hex (3x) e a porção solúvel em Hex, C6(6-7)FH-1ªcf (21,5mg) foi seca e posteriormente submetida a caracterizaçãopor ^{1}H RMN, porém ocorreu perda de atividade.

A subfração C3(44-68)-1ªcf (1,6190g) passou por uma nova coluna cromatográfica em sílica gel 60 (comp.=30cm, di=3,5cm) em gradiente de eluição Hex:AcOEt (5-100% AcOEt), resultando em 64 frações (C5-1ªcf) de aproximadamente 20 mL, que foram reunidas pelos valores de Rf e revelação com UV. A subfração C5(34-42)-1ªcf (322,3mg) com atividade antioxidante com DPPH e β-caroteno, pelos métodos de Marston e Ellman porém falso positivo, foi submetida a uma nova coluna cromatográfica em sílica gel 60 (comp.=32com, di=2cm),

resultando em 126 frações (C7-1ªcf) de aproximadamente 10mL cada. A subfração C7(122)-1ªcf, inibidora da AChE pelo método de Ellman e que não é falso positivo foi submetida a filtração simples com Hex, AcOEt, $CHCl_3$ e MeOH e os cristais remanescentes desta filtração, C7(122)cristais-1ªcf, foram caracterizados por RMN, porém ainda não foi possível determinar sua estrutura. A subfração C3(113-116)-1ªcf (665,4 mg) não apresentou-se pura.

Todo processo de purificação do extrato hexânico bruto das folhas de *P. carthagenensis* está resumido na **Figura 17**, p.36.

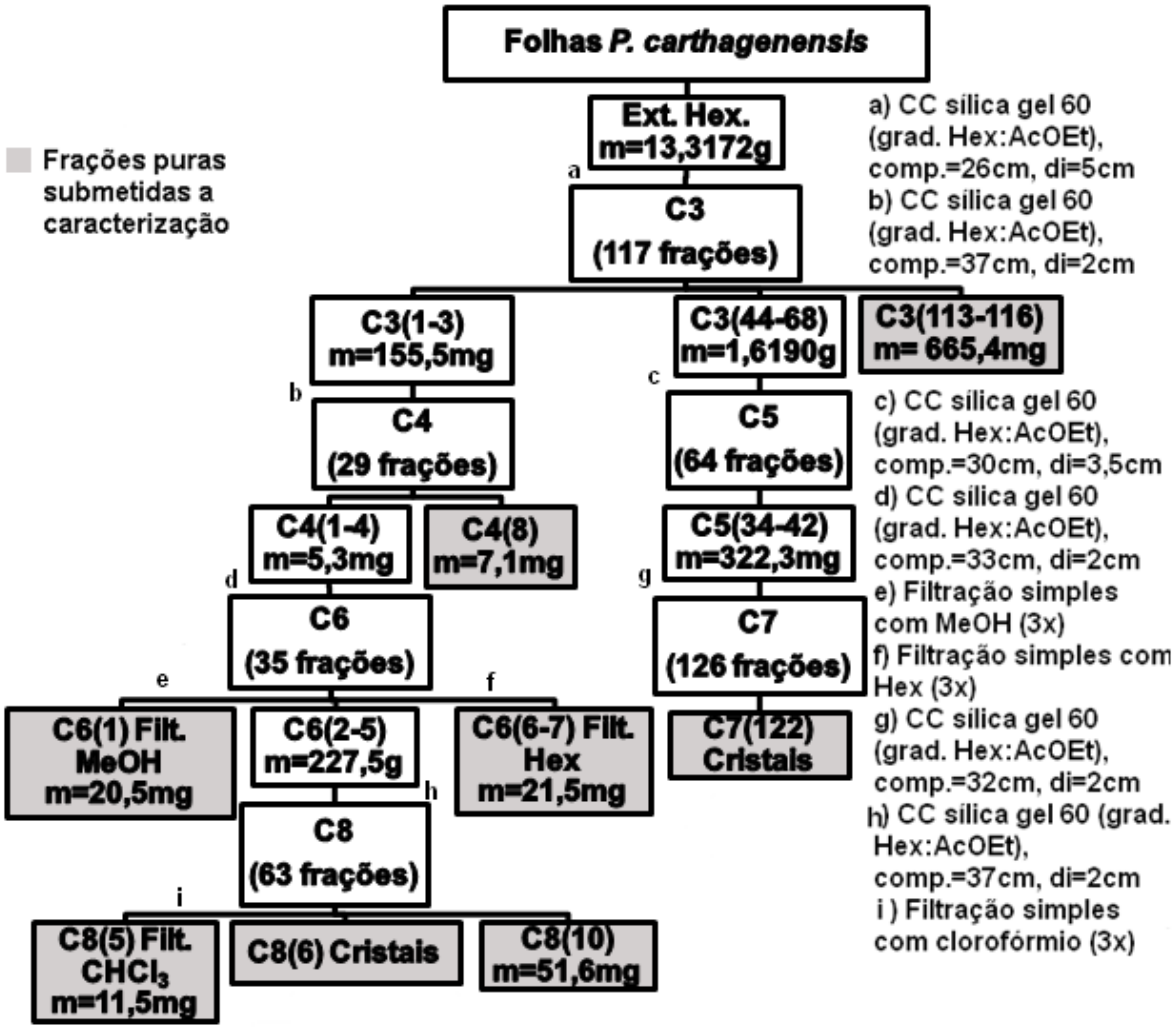


Figura 14: Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas de *P. carthagenensis*- 1ªcoleta.

Todos os extratos e frações resultantes do processo de purificação foram submetidos a ensaios antioxidantes e anticolinesterásicos **Tabela 5** anexa, p.104.

4.5.3. Purificação do extrato etanólico bruto dos caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta

O trabalho experimental prosseguiu com a separação dos metabólitos secundários do extrato etanólico bruto dos caules de *P. carthagenensis.*

Os caules secos, após moagem, foram extraídos com EtOH (80%). Os extratos foram submetidos a sucessivas partições líquido-líquido com hexano, CH_2Cl_2, AcOEt e 1-BuOH. As frações foram submetidas a ensaios antioxidantes e anticolinesterásicos e os resultados estão descritos na **Tabela 4** anexa, p.104.

Todo processo de purificação do extrato etanólico dos caules de *P. carthagenensis* está resumido na **Figura 18**, p.37.

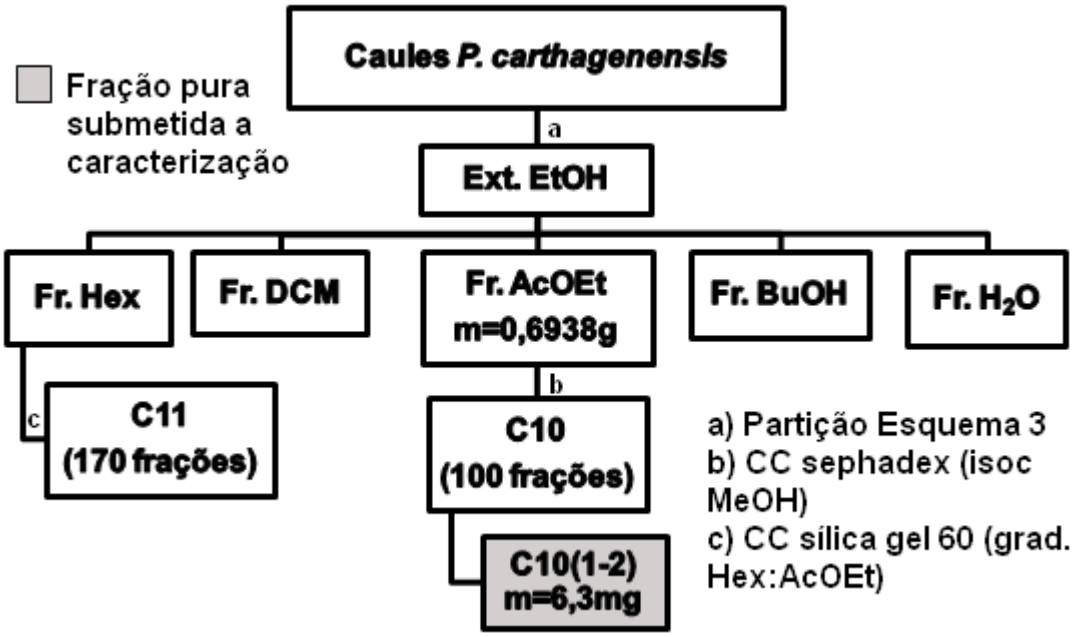


Figura 15: Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto dos caules de *P. carthagenensis* -1ª coleta

A fração hexânica proveniente da partição do extrato etanólico bruto de caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta **Figura 18**, p.37, foi eluida em uma coluna de sílica gel 60 em gradiente Hex:AcOEt resultando em 170 frações, C11-1ªcc (coluna 11, 1ª coleta dos caules), de aproximadamente 20 mL reunidas por comparação dos valores de Rf após a revelação das cromatoplacas em reagentes adequados e UV. Porém nenhum composto apresentou-se puro.

A fração AcOEt (0,6938g), também proveniente da partição **Figura 18,** p.37, foi submetida a uma coluna de filtração em gel em sephadex LH-20 em modo isocrático com MeOH como eluente resultando em 100 frações C10-1ªcc de aproximadamente 10 mL cada que foram reunidas por CCDC. A subfração C10(1-2)-1ªcc (6,3 mg), apresentou atividade antiacetilcolinesterásica pelos métodos de Ellman e Marston e antioxidante com DPPH, foi submetida a carcterização por RMN, porém ainda não foi possível determinar sua estrutura. Os resultados dos ensaios são apresentados na **Tabela 5** anexa, p.104.

4.5.4. Extração ácido-base de alcalóides totais das folhas e caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta e revelação com cloro-iodoplatinado.

A fim de investigar a presença de alcalóides, definidos como metabólitos especiais provenientes de aminoácidos contendo pelo menos um nitrogênio básico em um anel heterocíclico [117], os extratos de folhas e caules de *P. carthagenensis* foram submetidos à extração ácido-base, pelo método modificado de Stas-Otto, [118] **Figura 19**, p.38-39. Partindo-se de aproximadamente 0,4g de extrato etanólico bruto dos caules de *P. carthagenensis* e 0,2g de extrato etanólico bruto de folhas de *P. carthagenensis*.

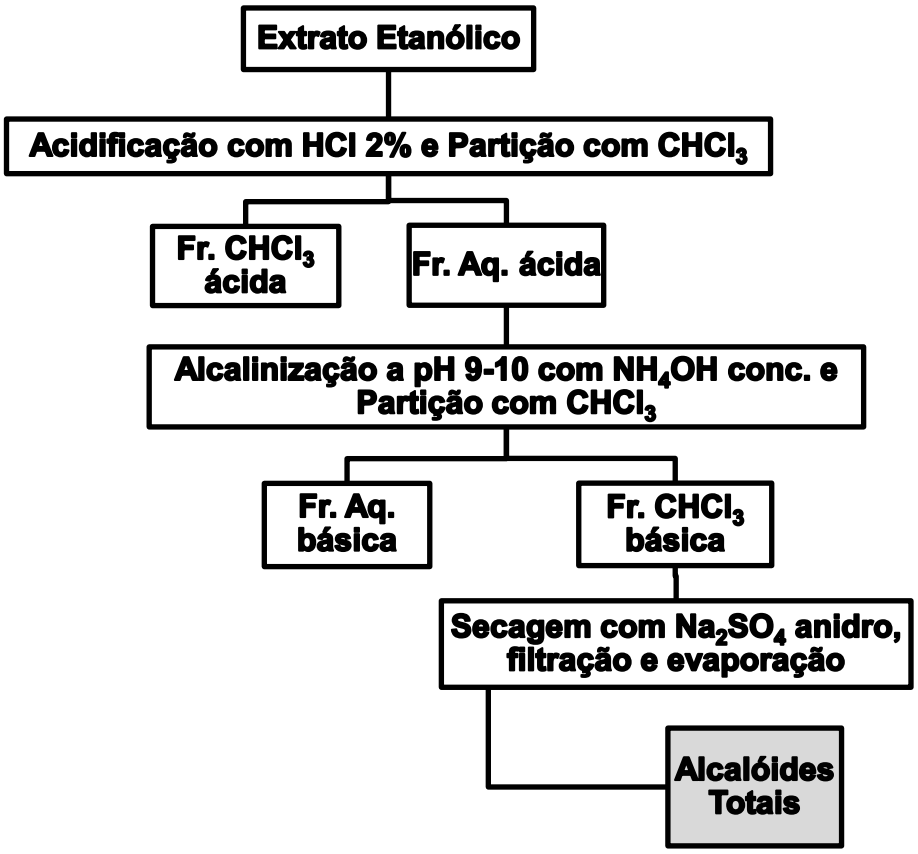


Figura 16: Esquema adaptado de extração de alcalóides totais.

Um volume de 2,5µL das frações resultantes das extrações ácido-base, na concentração de 20mg/mL foi aplicado em cromatoplacas de óxido de alumínio, eluidas em tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10)%, sistema de eluição adequado para a triagem dos alcalóides principais, proposto por Wagner [119]. Posteriormente, a cromatoplaca foi submetida à revelação com o reagente iodoplatinado (IP) que foi preparado conforme descrito por Wagner [119]. Sua detecção é feita após a nebulização do IP, as zonas de alcalóides se apresentam marrom, azul ou esbranquiçada sobre o fundo azul-cinza da cromatoplaca.

As amostras foram aplicadas na cromatoplaca da esquerda para a direita na seguinte ordem: extrato etanólico bruto de folhas (EEbf), extrato etanólico bruto de caules (EEbc), fr. $CHCl_3$ ácida folhas (Cácf), fr. $CHCl_3$ ácida caule (Cácc), fr. $CHCl_3$ básica folhas (Cbf), fr. $CHCl_3$ básica caules (Cbc), fr. aquosa folhas (Aqbf), fr. aquosa caules (Aqbc) e o padrão cafeína (Caf).

A cromatoplaca foi digitalizada três vezes, 5 minutos, 30 minutos e 60 minutos após a nebulização **Figura 20**, p.40.

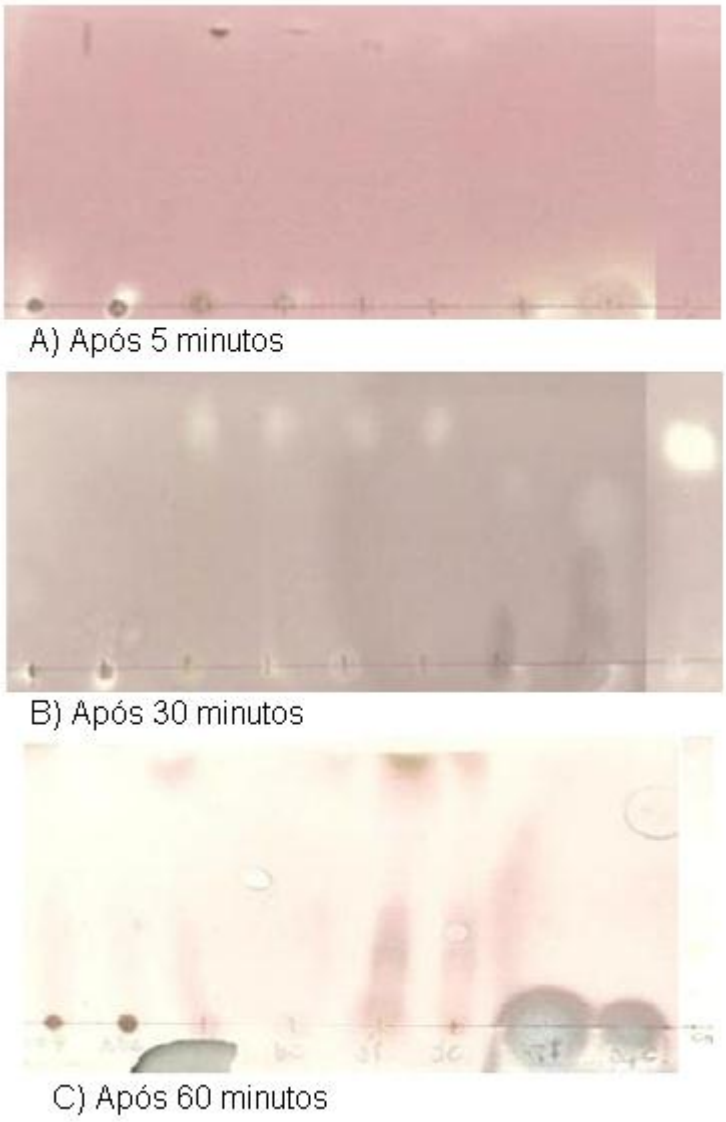


Figura 17: Revelação com cloro-iodoplatinado em cromatoplaca de óxido de alumínio 5 minutos (A), 30 minutos(B) e 60 minutos (C) após a nebulização dos extratos e frações de *P. carthagenensis* – 1ª coleta, resultantes da extração ácido-base, utilizando a cafeína como padrão

4.5.5. Ensaio antiacetilcolinesterásico no biorreator IMER-AChE

Seis amostras oriundas de *P. carthagenensis* que apresentaram atividade antiacetilcolinesterásica pelo método de Ellman na triagem inicial em TLC nomeadas C6(1)FM-1ªcf, C6(6)-cristais1ªcf, C7(122)-cristais1ªcf, C8(5)FC-1ªcf, C8(6)cristais-1ªcf e C8(10)-1ªcf foram testadas utilizando o ensaio antiacetilcolinesterásico com biorreatores em capilar de sílica fundida, **Tabela 6** anexa, p.110, que foi desenvolvido em nosso grupo [115]. Esse ensaio foi realizado pela aluna de mestrado Joyce Izidoro da Silva.

4.6. Triagem do material de origem vegetal – 2ªcoleta

4.6.1. Extração ácido-base de alcalóides totais das sementes, caules e folhas de *P. carthagenensis* – 2ª coleta e revelação com iodoplatinado

Para extração de alcalóides totais utilizou-se o método clássico de Stas-Otto, **Figura 21**, [118]. Partindo-se de 27,525g de folhas, 21,75g de caules e 10,785g de grãos de *P. carthagenensis* secos e moídos.

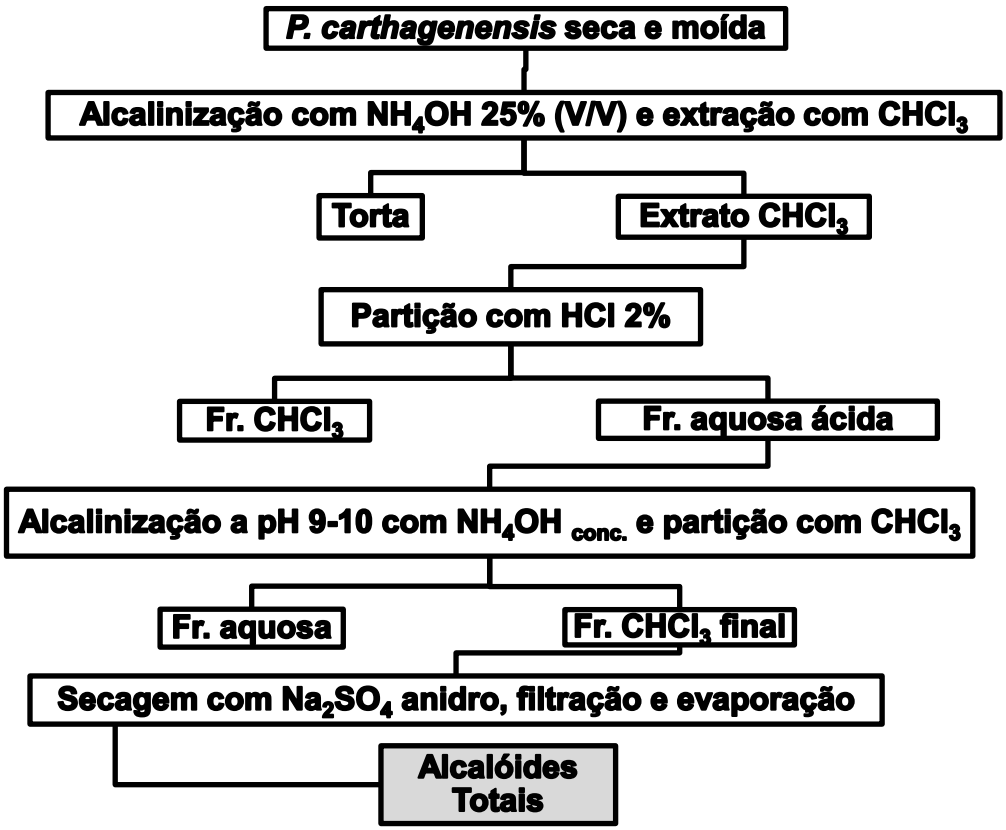


Figura 18: Esquema clássico de extração de alcalóides totais.

Um volume de 2,5µL das frações resultantes das extrações ácido-base e os extratos etanólicos brutos das sementes, caules e folhas, na concentração de 20mg/mL foram aplicadas em cromatoplacas de sílica gel, eluidas em tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10)% e submetidas à revelação de alcalóides com o reagente IP, preparado conforme descrito por H. Wagner [119].

As amostras foram aplicadas na cromatoplaca da esquerda para a direita na seguinte ordem: alcalóides sementes, alcalóides caules, alcalóides folhas, torta sementes, torta caules, torta folhas, fr. $CHCl_3$ sementes, fr. $CHCl_3$ caules, fr. $CHCl_3$

folhas, fr. aquosa sementes, fr. aquosa caules, fr. aquosa folhas, extrato etanólico bruto sementes, extrato etanólico bruto caules, extrato etanólico bruto folhas.

A cromatoplaca foi digitalizada três vezes, 5 minutos, 30 minutos e 60 minutos após a nebulização, **Figura 22**, p.42.

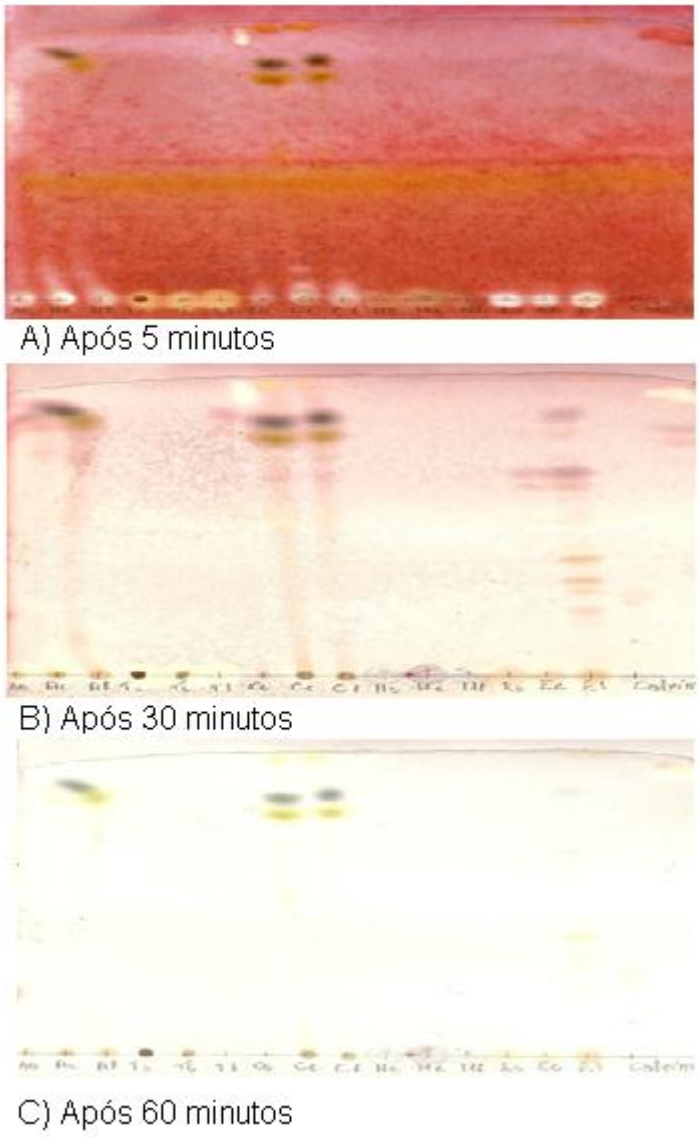


Figura 19: Revelação com iodoplatinado em cromatoplaca de sílica 5 minutos (A), 15 minutos (B) e 60 minutos (C) após a nebulização dos extratos de *P. carthagenensis* resultantes da extração ácido-base, utilizando cafeína como padrão

4.6.2. Ensaios antioxidante e antiacetilcolinesterásicos.

Os extratos resultantes da extração ácido-base das sementes, caules e folhas de *P. carthagenensis* foram também submetidos a triagem através dos ensaios antioxidante e antiacetilcolinesterásicos visando a identificação de extratos e frações

de *P. carthagenensis* com potencial antioxidante e com ação inibitória sobre a enzima AChE.

Os ensaios foram realizados em cromatoplacas de sílica com eluição em tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10)% como descrito no **item 3.2.1.**, tanto para a atividade antioxidante **Figura 23**, quanto anticolinesterásica **Figura 24**, e os resultados estão apresentados na **Tabela 7** anexa, p.111.

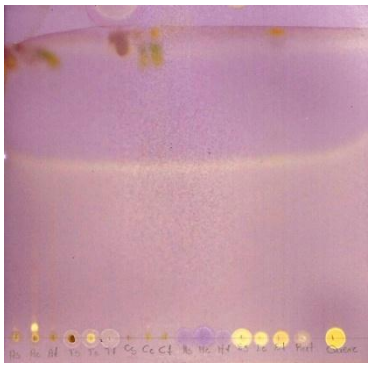


Figura 20: Triagem antioxidante com DPPH dos extratos e frações das sementes, caules e folhas de *P. carthagenensis* em TLC com os padrões rutina e quercetina.

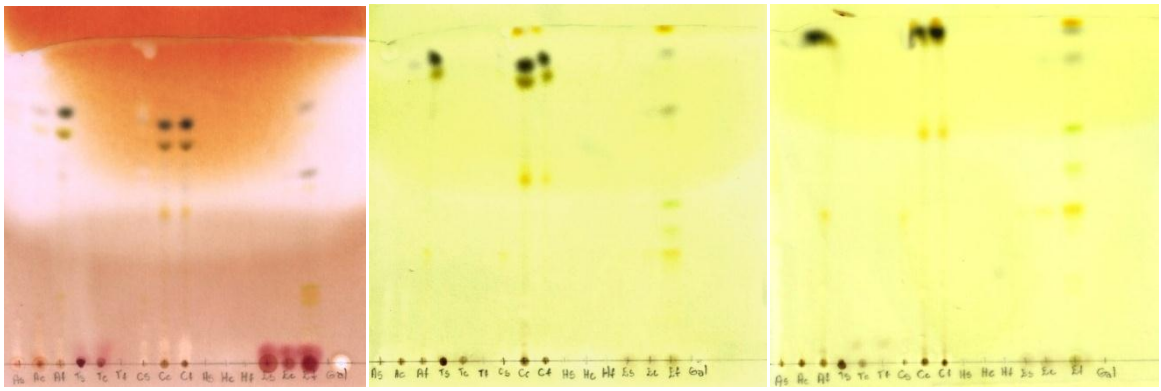


Figura 21: Triagem antiacetilcolinesterásica pelos métodos de Marston, Ellman e falso positivo, respectivamente, dos extratos e frações das sementes, caules e folhas de *P. carthagenensis* em TLC com o padrão galantamina.

4.7. Triagem de materiais de diversas origens

Alguns extratos e frações de origem fitoquímica estudados pelo nosso grupo de pesquisa foram submetidos aos ensaios e os resultados seguem na **Tabela 8** anexa, p.111.

Ao longo do trabalho foram recebidas amostras de outros grupos de pesquisa para uma triagem das atividades antioxidante e antiacetilcolinesterásica.

Foram testados alguns produtos de síntese em um trabalho de colaboração com Lucas C. C. Vieira e Professora Doutora Arlene G. Corrêa do Departamento de Química da UFSCAR, Afonso D. L. de Souza do Laboratório de Produtos de Origem Microbiana – Universidade Federal do Amazonas-ICB-DFCA/ UFAM-Manaus Brasil Manaus e alguns extratos e frações da aluna Ana Paula orientada pelo Professor Doutor Luiz Alberto B. de Moraes e do nosso grupo de pesquisa. Os resultados estão apresentados na **Tabela 9** anexa, p.113.

5. Resultados e Discussão

5.1. Triagem inicial do material de origem microbiológica e outras fontes

Das 365 amostras submetidas à triagem inicial, apenas duas amostras apresentaram atividade nos dois ensaios, as amostras 3B-11dias e 13Ana. Das 193 amostras **Figura 25**, p.44, submetidas apenas ao ensaio antioxidante com DPPH, apenas 9,84% (19 amostras) apresentaram atividade e das 298 amostras submetidas apenas ao ensaio com reagente de Ellman, 22,15% (66 amostras) apresentaram atividade **Figura 25**, p.44.

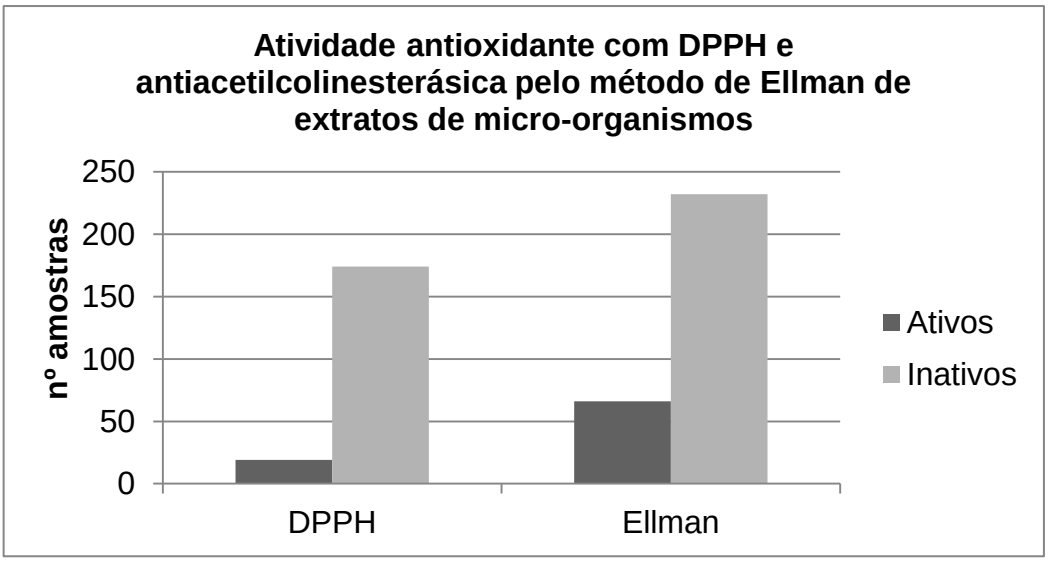


Figura 22: Gráfico dos extratos de micro-organismos das atividades antioxidante com DPPH e antiacetilcolinesterásica pelo método de Ellman.

Pela **Figura 25**, p.44, podemos identificar os extratos de micro-organismos como melhores fontes de moléculas com atividade inibidora da enzima AChE do que com atividade antioxidante.

Esta triagem foi fundamental na seleção de amostras promissoras, reduzindo o número de amostras de interesse, facilitando na escolha da primeira amostra a passar pelo processo de purificação e fornecendo resultados inéditos e interessantes sobre micro-organismos. Além de sua fácil e rápida obtenção, a informação sobre a atividade antioxidante e inibidora da enzima AChE destes extratos é valiosa e será arquivada no banco de dados do laboratório.

5.2. Ensaio em microplacas multipoços com DPPH.

A curva de concentração da amostra pela porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL), **Figura 26**, p.45, apresenta os resultados obtidos no ensaio em microplacas multipoços**.**

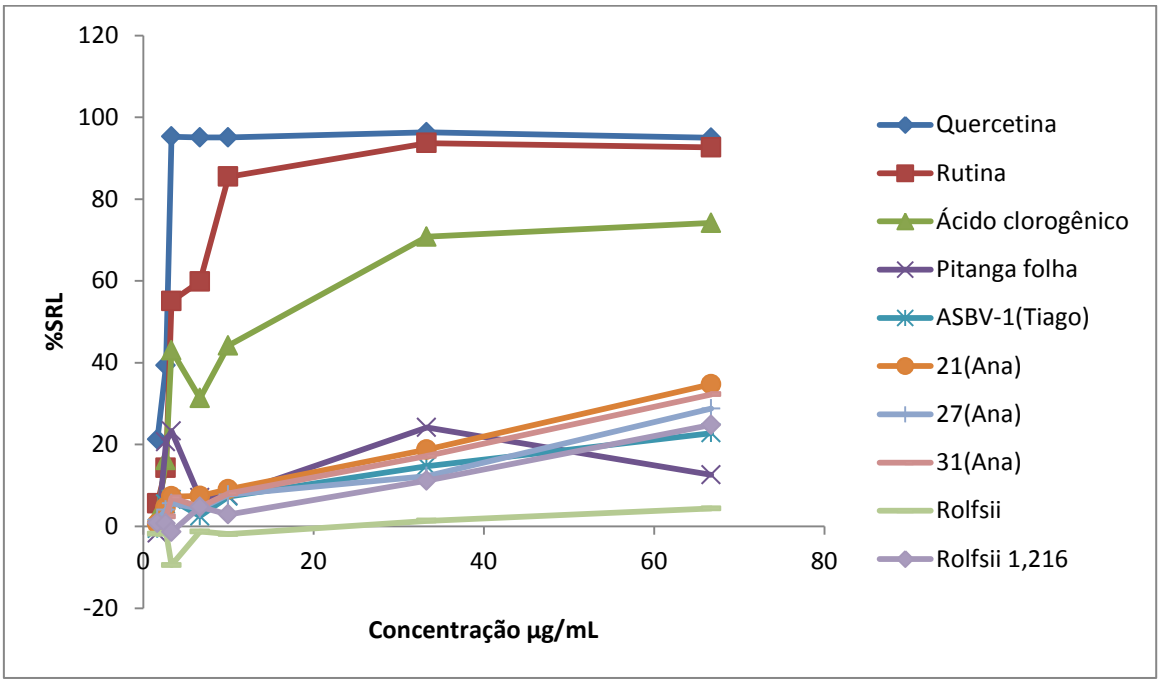


Figura 23: Resultado do ensaio espectrofotométrico antioxidante em microplacas dos extratos de origem microbiológica.

Como observado no gráfico, as sete amostras submetidas ao ensaio apresentaram menor porcentagem de sequestro de radicais livres que os padrões quercetina, rutina e ácido clorogênico. Dentre as amostras testadas, a 21(Ana) foi a que apresentou melhor atividade antioxidante seguida por 31(Ana), 27(Ana), Rolfsii 1,216, ASBV-1(Tiago), Pitanga folha e Rolfsii, respectivamente.

Por meio deste resultado observa-se a quantificação da atividade antioxidante dos extratos brutos pré-selecionados pela triagem qualitativa em TLC. Porém, como nenhuma das amostras testadas apresentou atividade igual ou maior que a atividade dos padrões, elas não foram selecionadas para o processo de purificação e deu-se continuação a triagem qualitativa em TLC com outros extratos.

5.3. Resultado dos ensaios dos extratos e frações da actinobactéria-36 (50PL).

Das 75 amostras submetidas ao ensaio antiacetilcolinesterásico pelo método de Ellman, apenas 5,33% (4) mostraram-se ativas. Das 21 amostras submetidas ao teste falso positivo, 33,33% (7) são falso-positivas, ou seja, não são inibidores da enzima AChE e reagem com o produto da catálise enzimática, a tiocolina. Das 21 amostras submetidas ao ensaio acetilcolinesterásico pelo método de Marston, 38,10% (8) mostraram-se como bons antiacetilcolinesterásicos. Para as 74 amostras submetidas ao ensaio antioxidante com DPPH, 95,95% (71) apresentaram atividade.

Com base nos resultados apresentados na **Figura 27**, p.46, podemos afirmar que as substâncias presentes no extrato da actinobactéria-36 (50PL) são excelentes sequestradores de radicais livres.

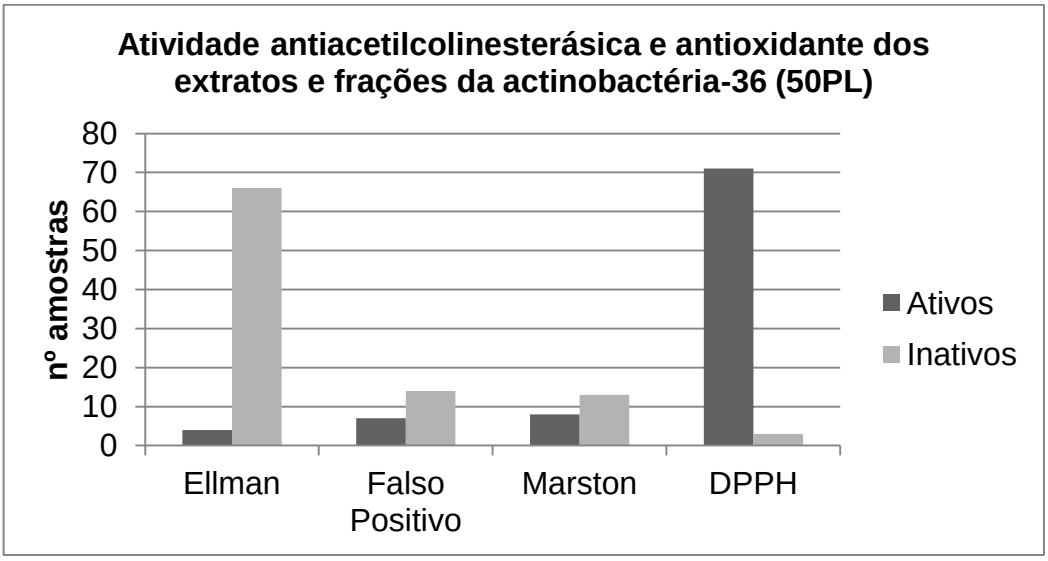


Figura 24: Gráfico dos extratos e frações da actinobactéria-36 (50PL) das atividades antioxidante e antiacetilcolinesterásica.

5.4. Determinação estrutural das substâncias da actinobactéria-36 (50PL) – 1ª fermentação.

Durante o processo de purificação do extrato bruto da 1ª fermentação da actinobactéria-36 (50PL), duas substâncias foram isoladas: C1(1) substância **1** com atividade antioxidante com DPPH e inibidor da AChE pelo método de Marston e C2(1-14) substância **2** com atividade antioxidante com DPPH e antiacetilcolinesterásica pelos métodos de Ellman e Marston.

Na determinação estrutural das substâncias foram utilizadas técnicas espectroscópicas (RMN de ^{1}H e de ^{13}C uni- e bidimensionais e IV) e espectrométricas (EM).

5.4.1. Substância 1 – amostra C1(1)

A substância **1** foi obtida na forma amorfa e amarela. O espectro de RMN de ^{1}H em MeOD, **Figuras 28-32**, p.47-49, apresentou um multipleto em δ 5,34 (*J*=7,0; 5,1 Hz) atribuído aos hidrogênios das duplas ligações *cis*, um singleto em δ 3,64 atribuído aos hidrogênios do grupo metoxila do grupo éster presente na molécula . Os sinais em δ 2,77 *t* (*J*=6,5; 6,3 Hz), δ 2,31 *t* (*J*= 7,5; 7,4 Hz), δ 2,06 *m*, δ 1,60 *m* e δ 1,34 *m*, foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos e um multipleto em δ 0,90 *m* atribuído aos hidrogênios metílicos.

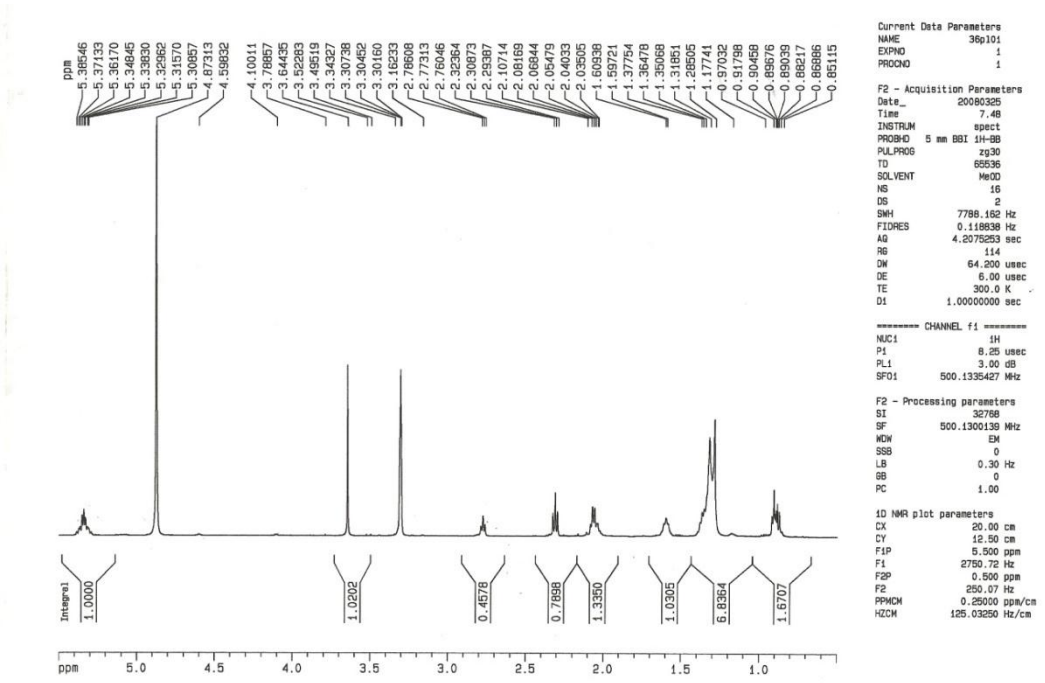


Figura 25: Espectro de ^{1}H RMN da substância 1, solubilizada em MeOD, 500 MHz.

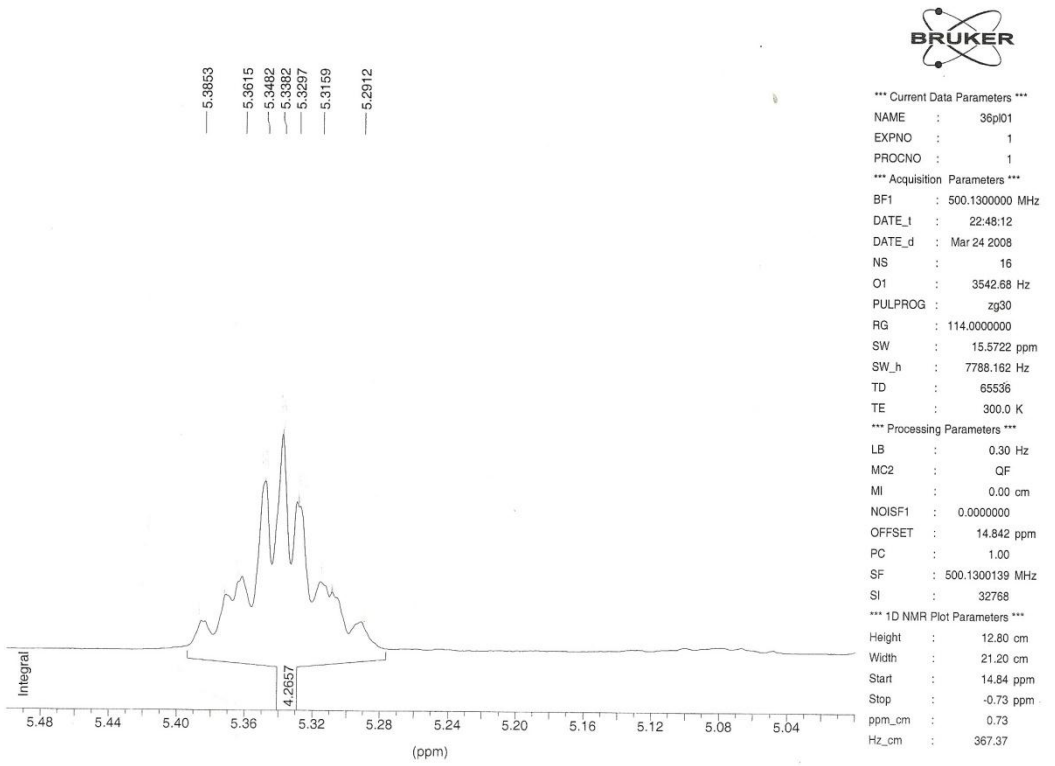


Figura 26: Expansão 1 do espectro de ^{1}H RMN da substância 1, solubilizada em MeOD, 500 MHz.

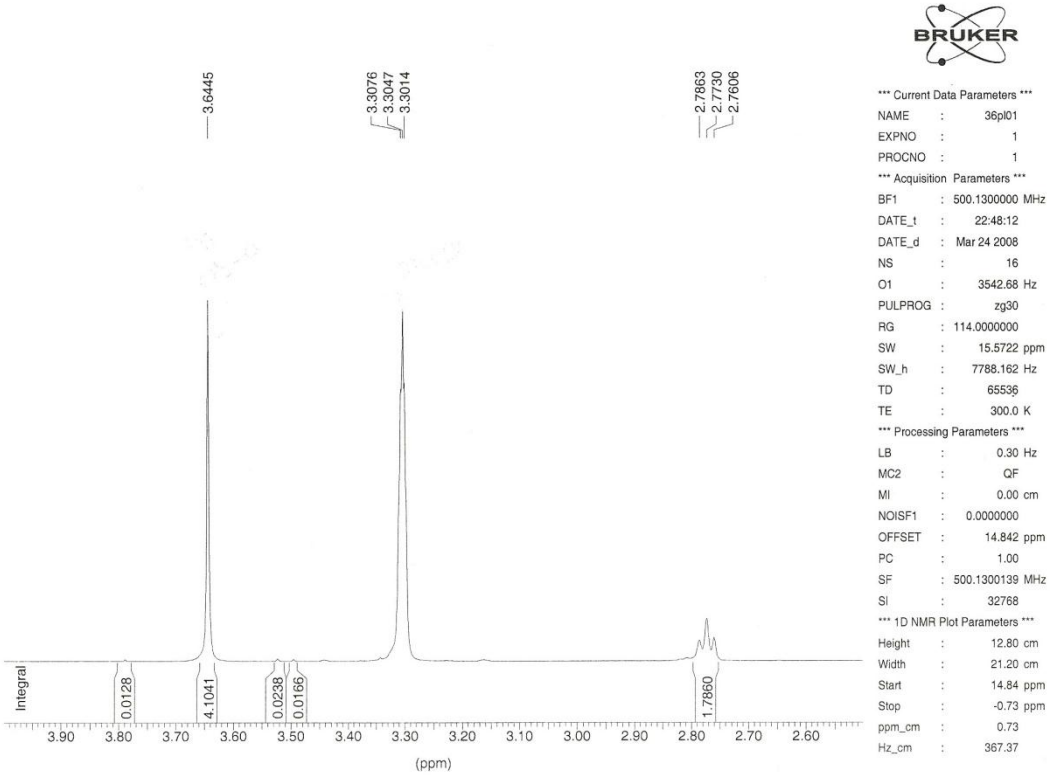


Figura 27: Expansão 2 do espectro de ^{1}H RMN da substância 1, solubilizada em MeOD, 500 MHz.

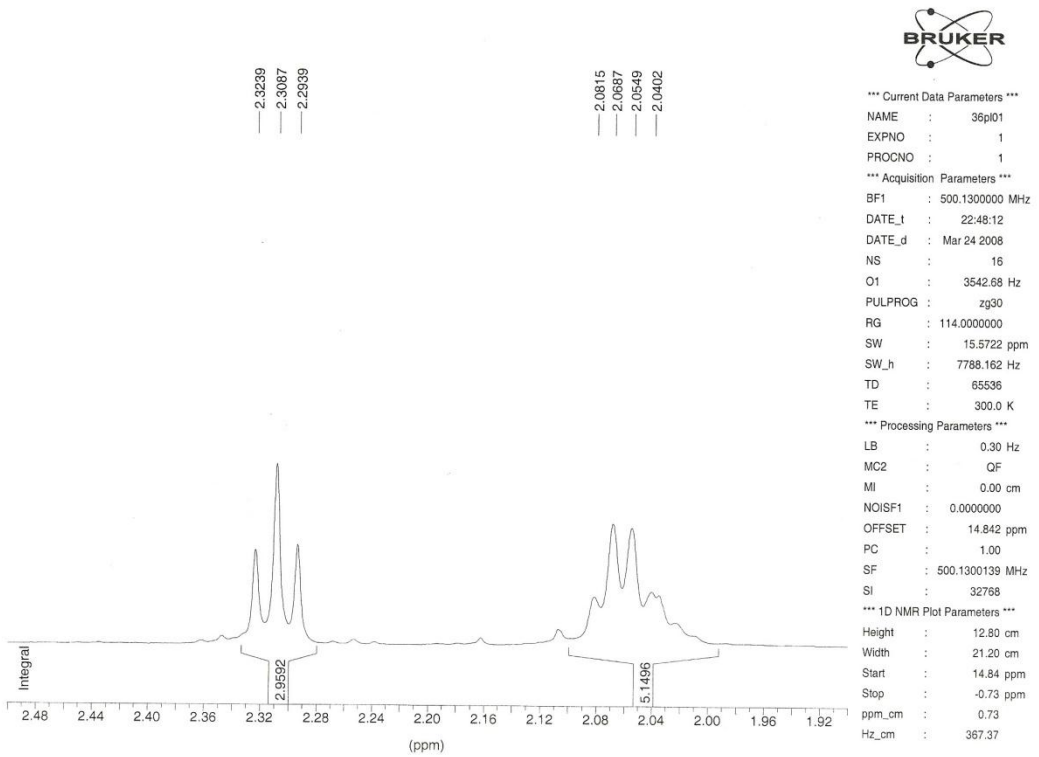


Figura 28: Expansão 3 do espectro de ^{1}H RMN da substância 1, solubilizada em MeOD, 500 MHz.

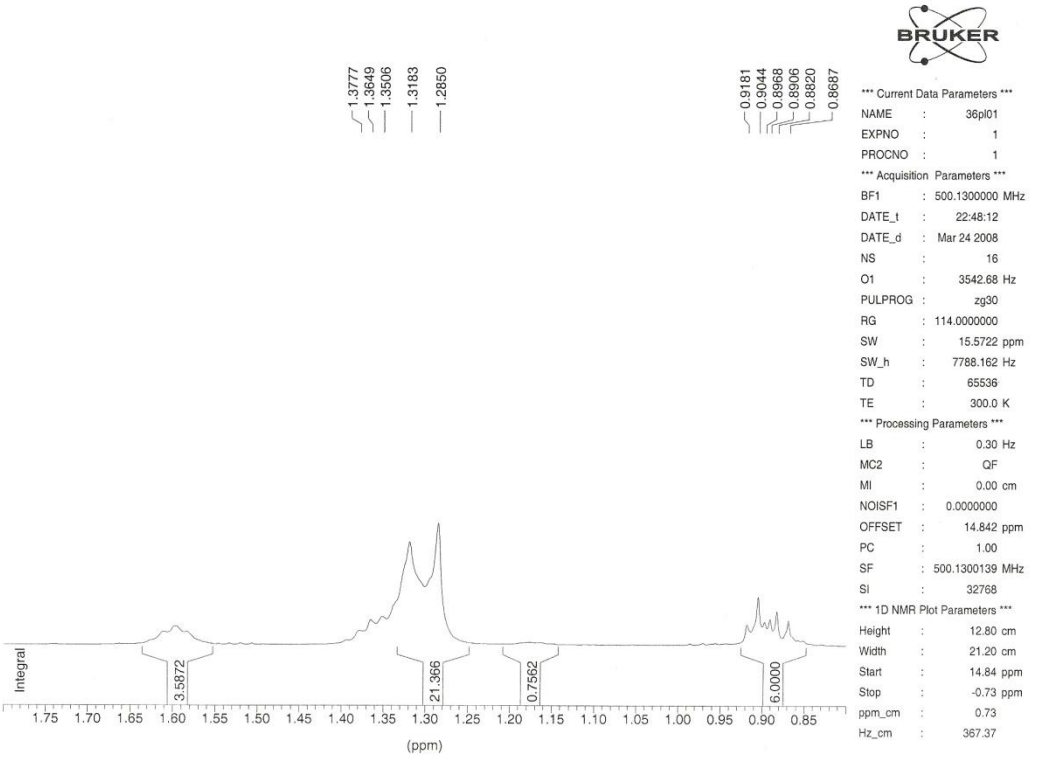


Figura 29: Expansão 4 do espectro de ^{1}H RMN da substância 1, solubilizada em MeOD, 500 MHz.

Os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C, **Figuras 33-35**, p.50-51, em δ 176,2 (C) e δ 52,1 (CH_3) evidenciaram a presença de grupo éster na molécula. Os sinais em δ 131,1 (CH), δ 131,0 (CH), δ 129,3 (CH) e δ 129,2 (CH) foram atribuídos aos carbonos sp^2 das duplas ligações. Os sinais observados na região de δ 35,0 a δ 23,8 evidenciaram a presença de uma cadeia longa de carbonos metilênicos. O sinal em δ 14,5 foi atribuído ao carbono metílico. Estes sinais comparados ao DEPT-135, **Figuras 36-37**, p.52 e em conjunto com as correlações observadas no espectro de *g*HMQC, **Figura 38-40**, p. 53-54, totalizaram sinais para 19 carbonos.

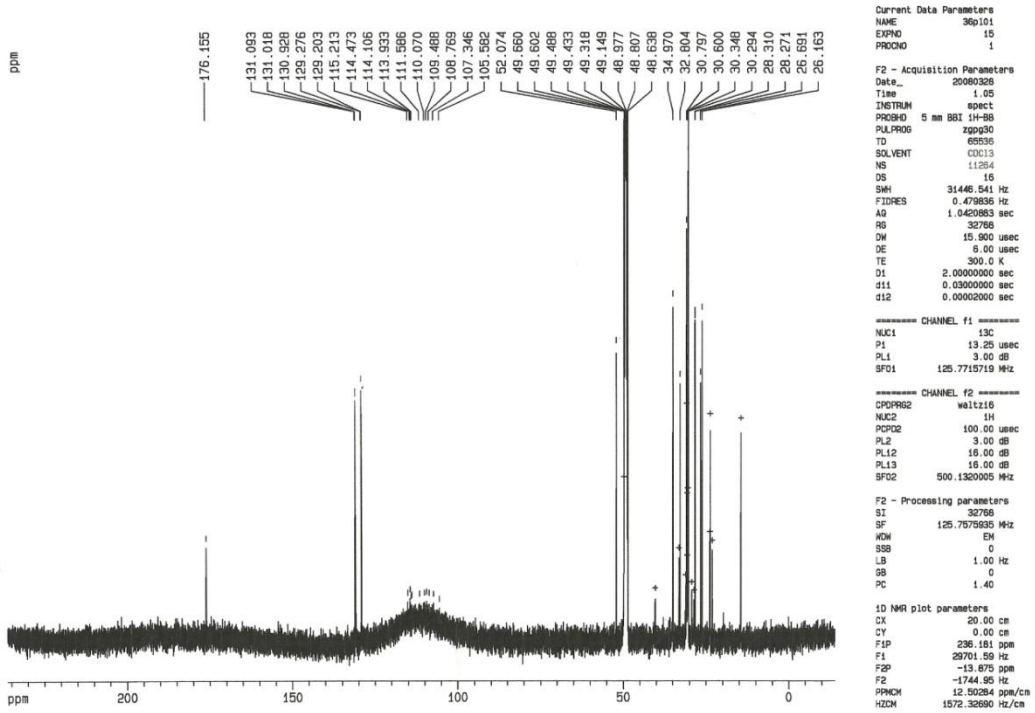


Figura 30: Espectro de ^{13}C RMN da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

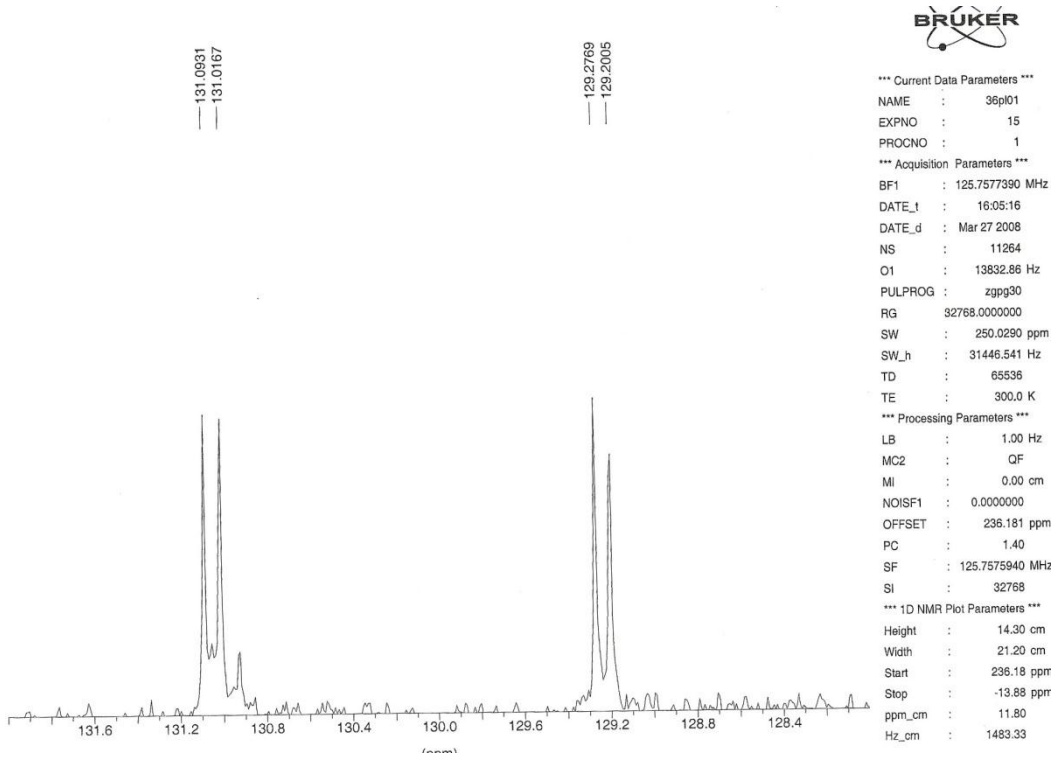


Figura 31: Expansão 1 do espectro de ^{13}C RMN da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

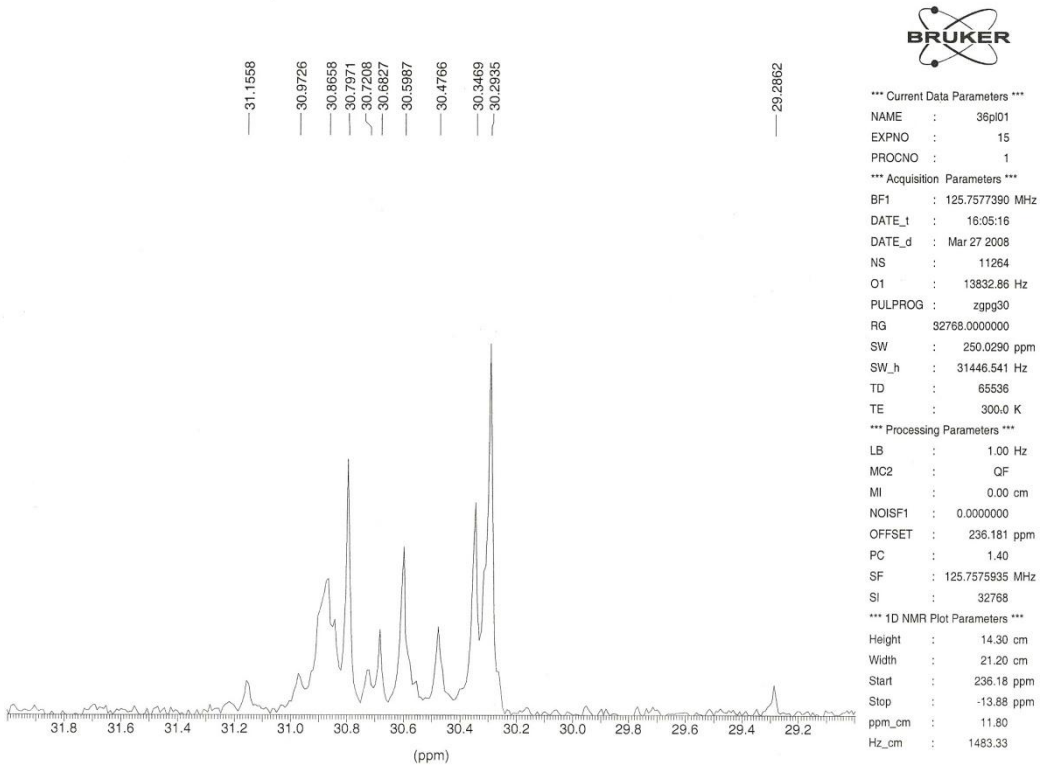


Figura 32: Expansão 2 do espectro de ^{13}C RMN da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

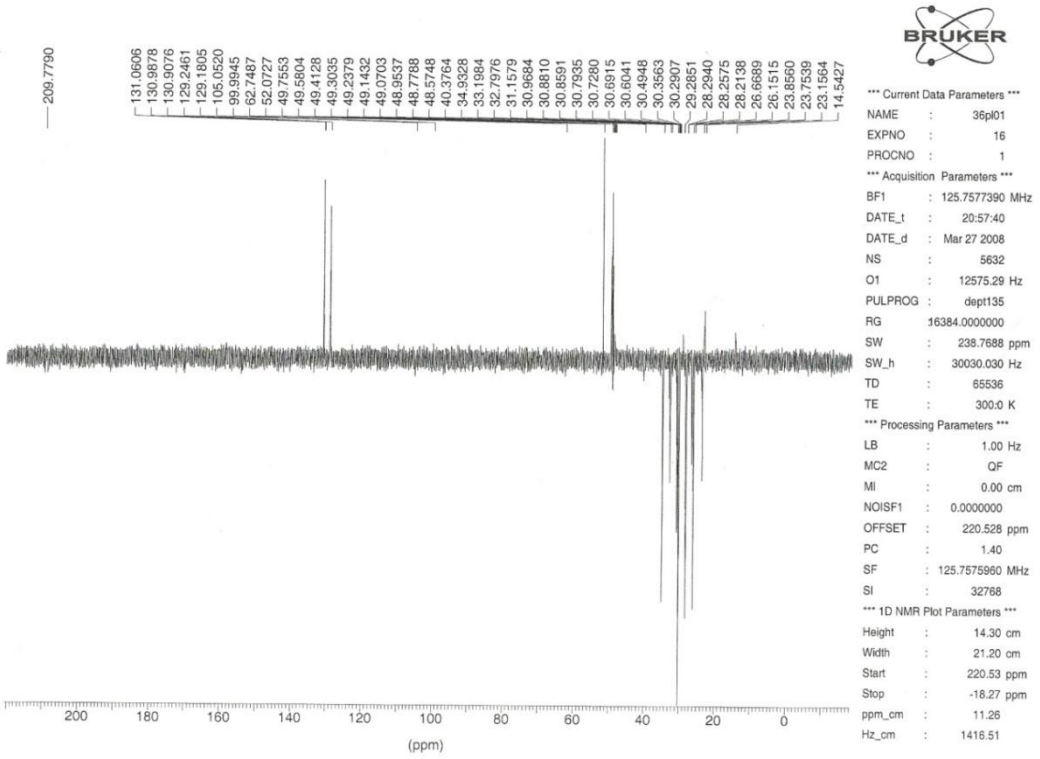


Figura 33: Espectro de DEPT 135 da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500MHz.

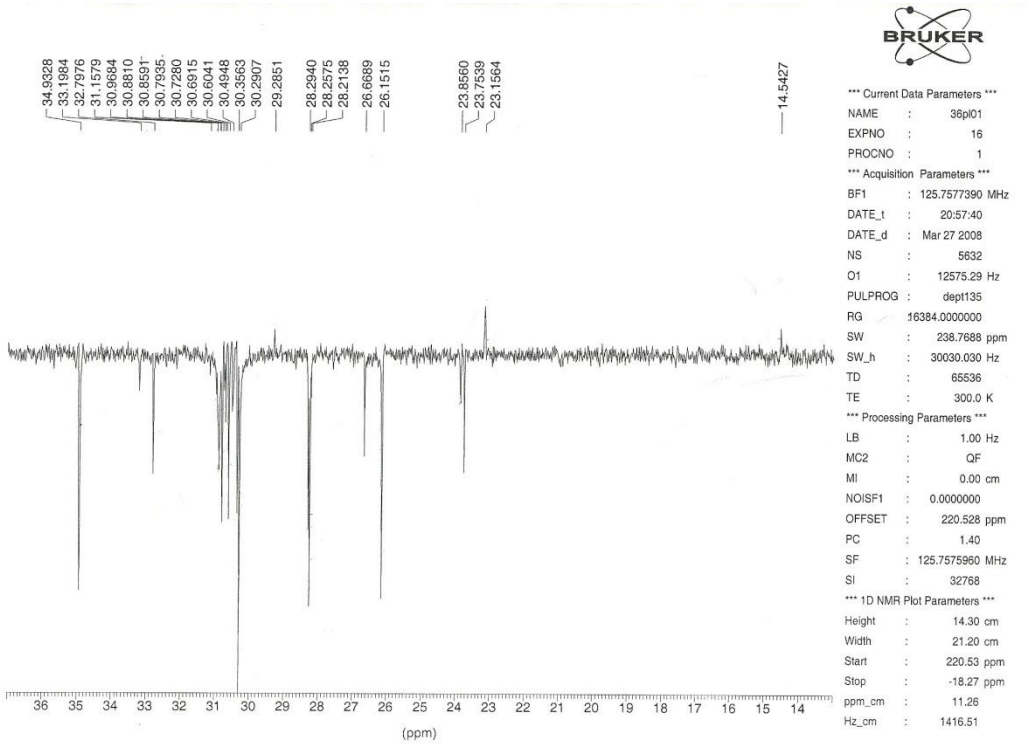


Figura 34: Expansão 1 do espectro de DEPT 135 da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500MHz.

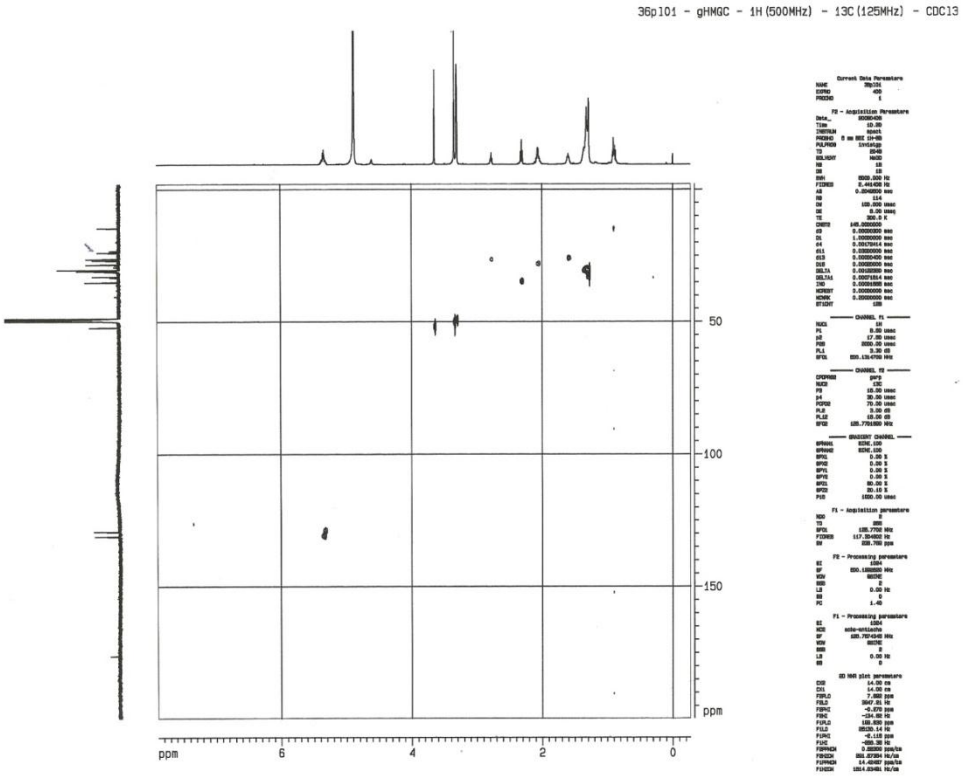


Figura 35: Espectro de *g*HMQC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

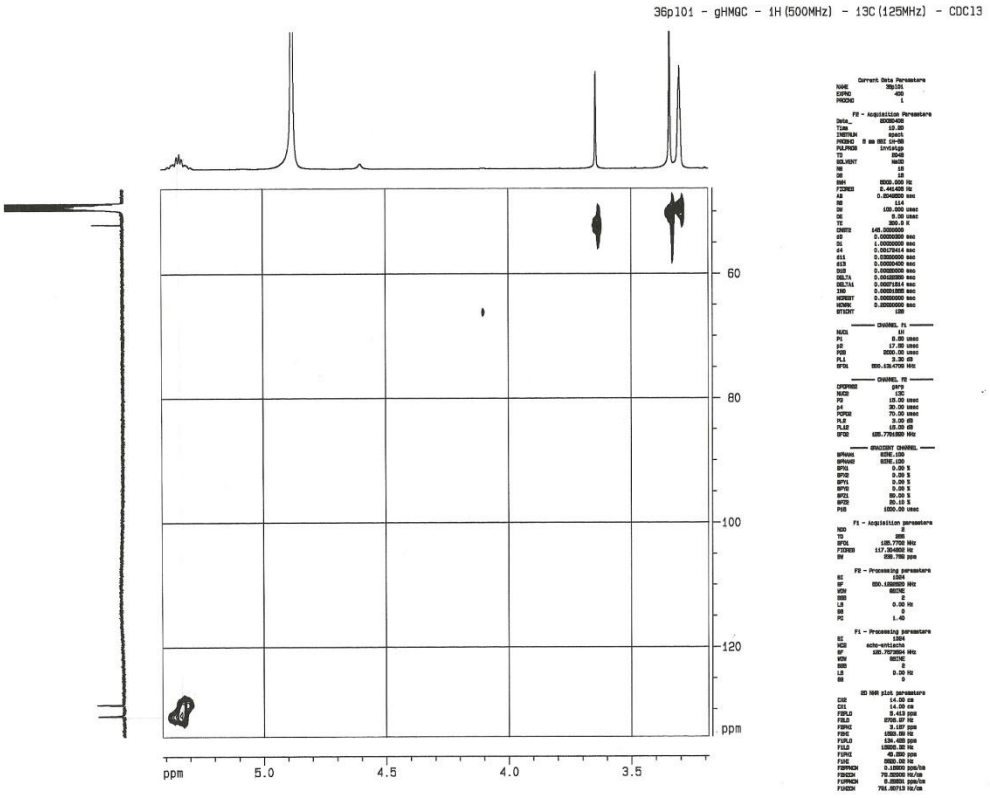


Figura 36: Expansão 1 do espectro de *g*HMQC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

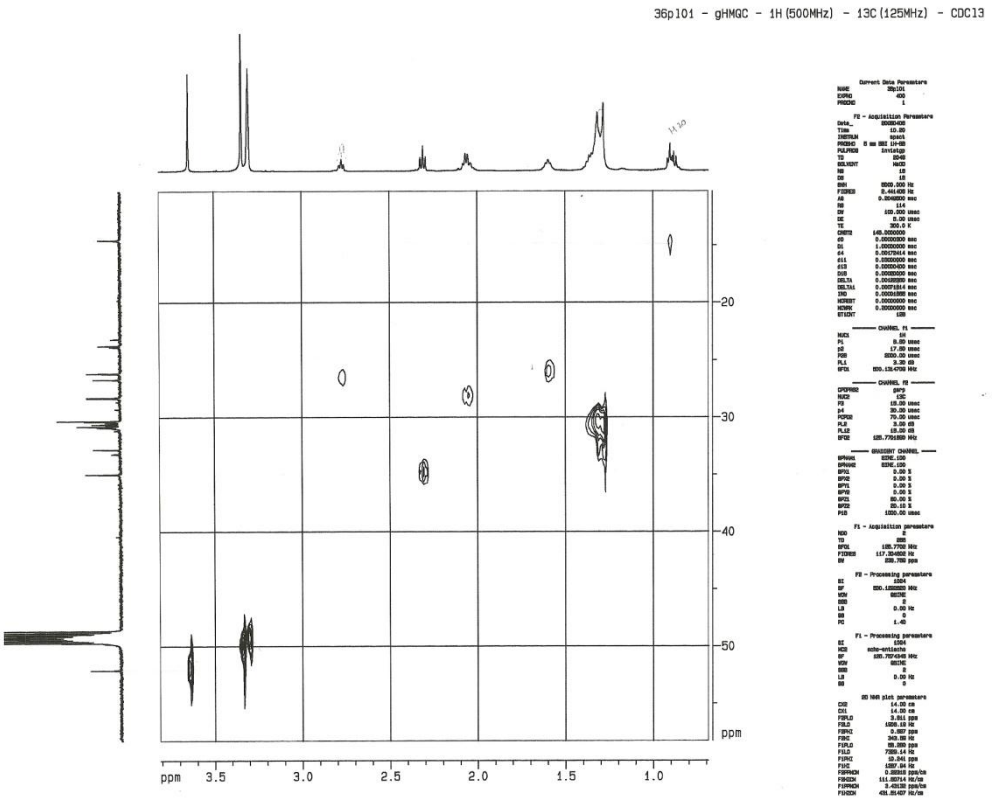
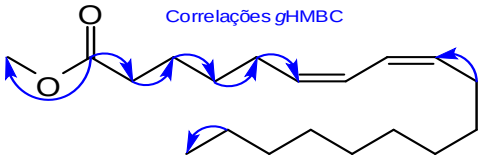


Figura 37: Expansão 2 do espectro de *g*HMQC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

As correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC, **Figuras 41-43**, p.55-56, permitiram definir a cadeia lateral dessa molécula. A correlação observada entre os sinais em δ 3,64 (H-2), δ 2,31 (H-4), δ 1,60 (H-6) e δ 176,2 (C-1) correspondente a uma carbonila de éster, permitiram inferir a presença desse grupo na cadeia lateral da molécula. A correlação entre δ 2,06 (H-5) e δ 2,77 (H-3) e os sinais de carbono δ 131,1 (C-8), δ 131,0 (C-5), δ 129,3 (C-6) e δ 129,2 (C-7) permitiram inferir duas ligações duplas *cis* a essa molécula e a correlação entre os sinais δ 0,90 (H-8) e δ 23,7 (C-18) permite inferir a outra extremidade da molécula.



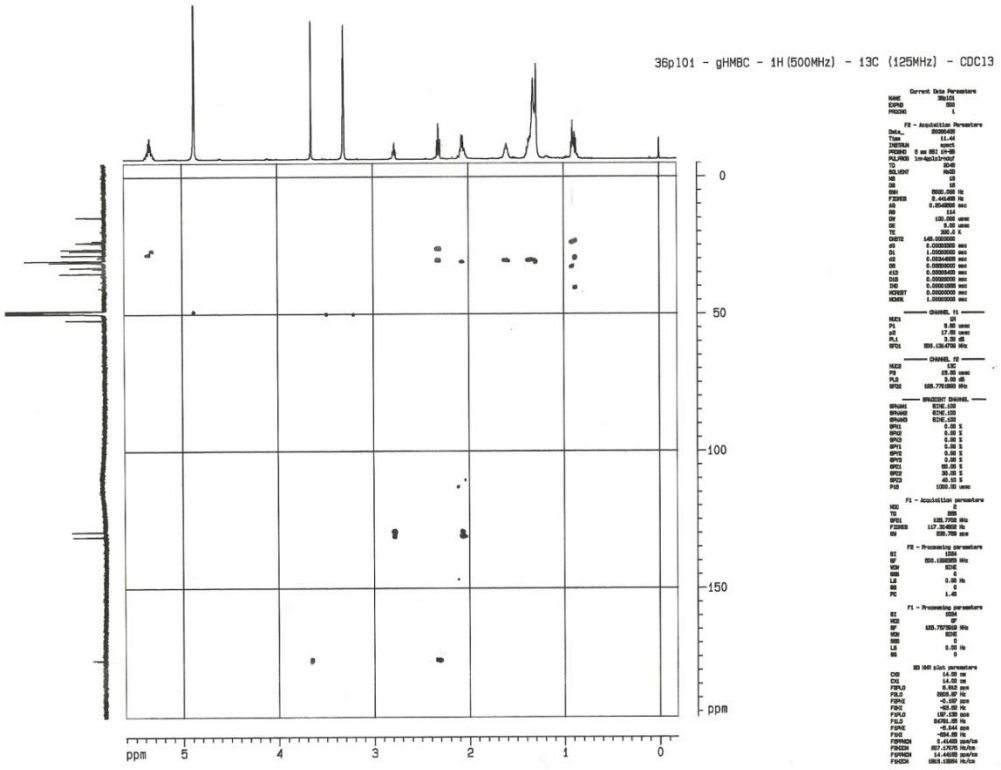


Figura 38: Espectro *g*HMBC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

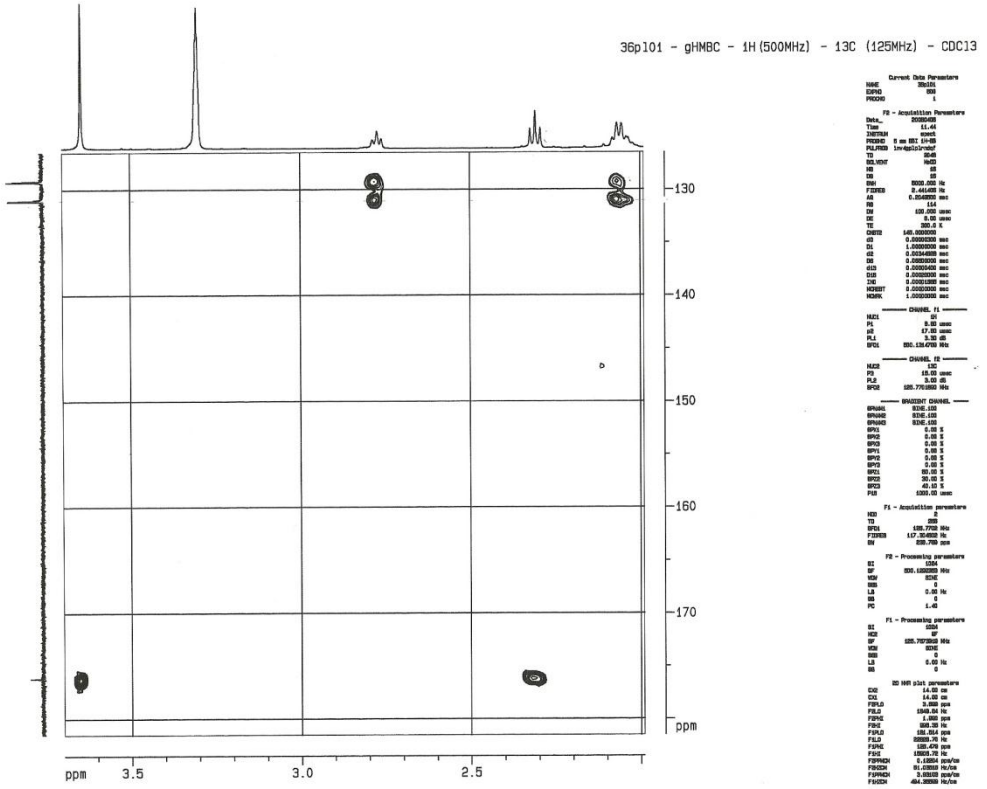


Figura 39: Expansão 1 do espectro *g*HMBC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

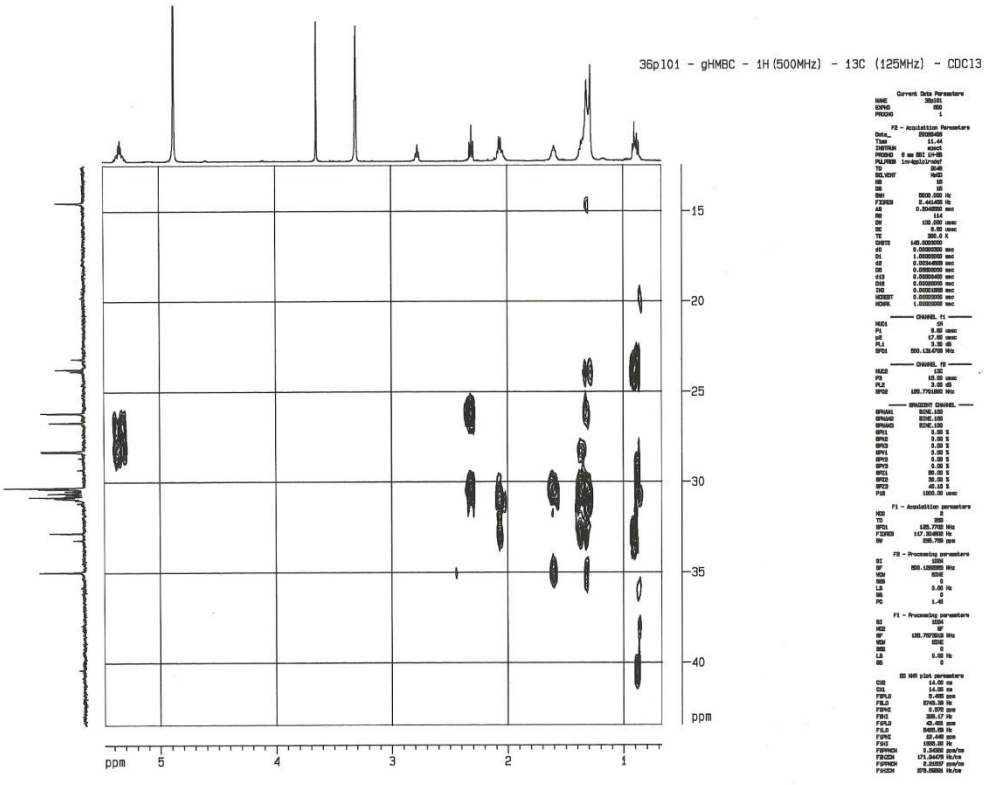
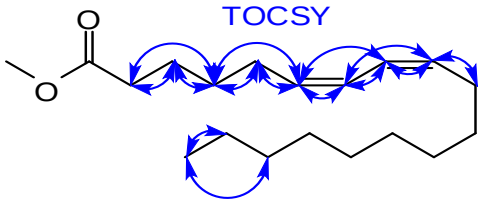


Figura 40: Expansão 2 do espectro *g*HMBC da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

As correlações, observadas no experimentoo de TOCSY **Figura 44**, p.57, do experimento TOCSY, aliado ao ^{1}H RMN, permitem afirmar que as duplas são *cis* e conjugadas.



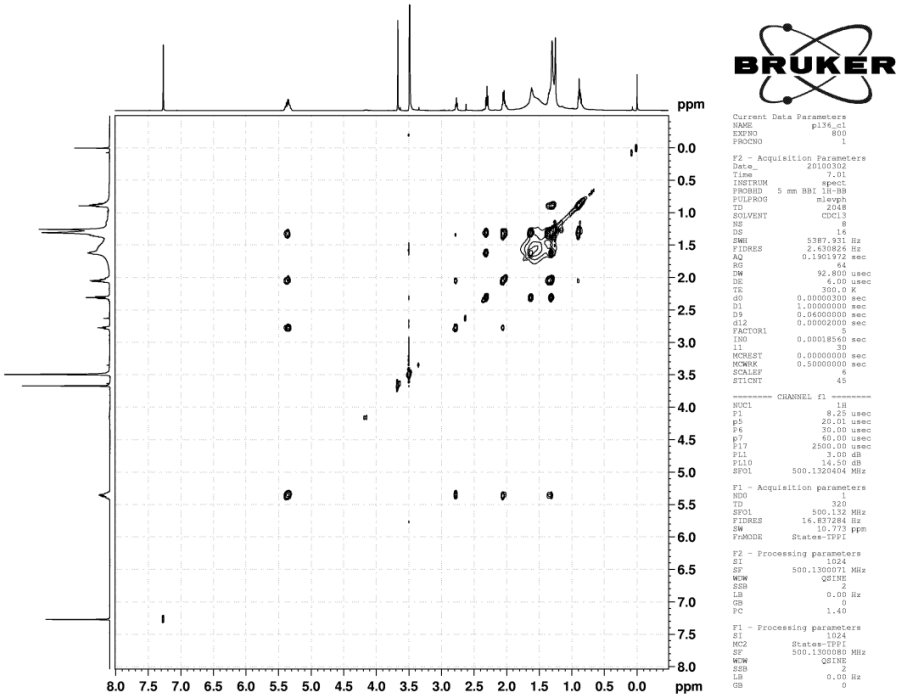


Figura 41: Espectro TOCSY da substância 1, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

O IDH calculado para a fórmula molecular proposta de $C_{19}H_{34}O_2$, 294g/mol, de valor igual a 3 corrobora com a estrutura proposta.

O espectro de massas, **Figura 45**, p.57, obtido em um espectrômetro Q-Tof 2 de alta resolução, no modo positivo (ESI+), fornece como pico base o sinal em *m/z* 295,2366, informação esta que vai de encontro a nossa proposta.

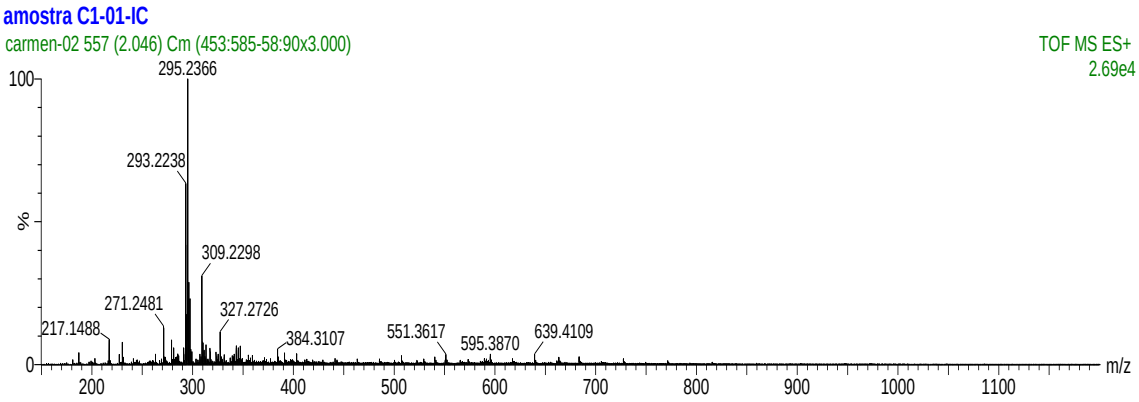
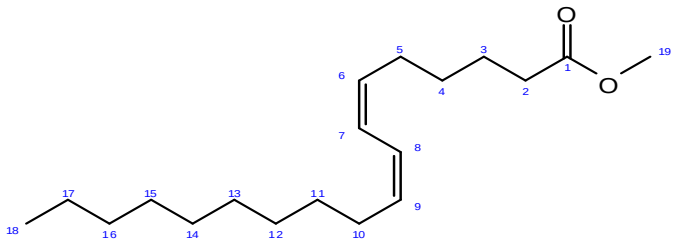


Figura 42: Espectro de massas em modo positivo (ESI+) da substância 1.

Baseado nestas informações foi feita a seguinte proposta estrutural, para a substância **1**. Todas correlações e deslocamentos químicos para esta substância estão descritos na **Tabela 10** anexa, p.117.



Os dados foram comparados com a literatura que confirmaram que a substância **1** é o éster metílico do ácido *cis*-6, *cis*-8 octadecadienóico [120, 121].

5.4.2. Substância 2 – amostra C2(1-14)

O espectro de RMN de ^{1}H em $CDCl_3$, **Figuras 46-50**, p.58-61, apresentam um singleto em δ 9,77, característico de hidrogênio de aldeído. Os sinais em 2,35 *t* (*J*= 7,5 Hz), δ 2,01 *m*, δ 1,63 *m* e δ 1,29 *m*, que foram atribuídos aos 24 hidrogênios metilênicos e um multipleto em δ 0,85 atribuído aos 3 hidrogênios metílicos.

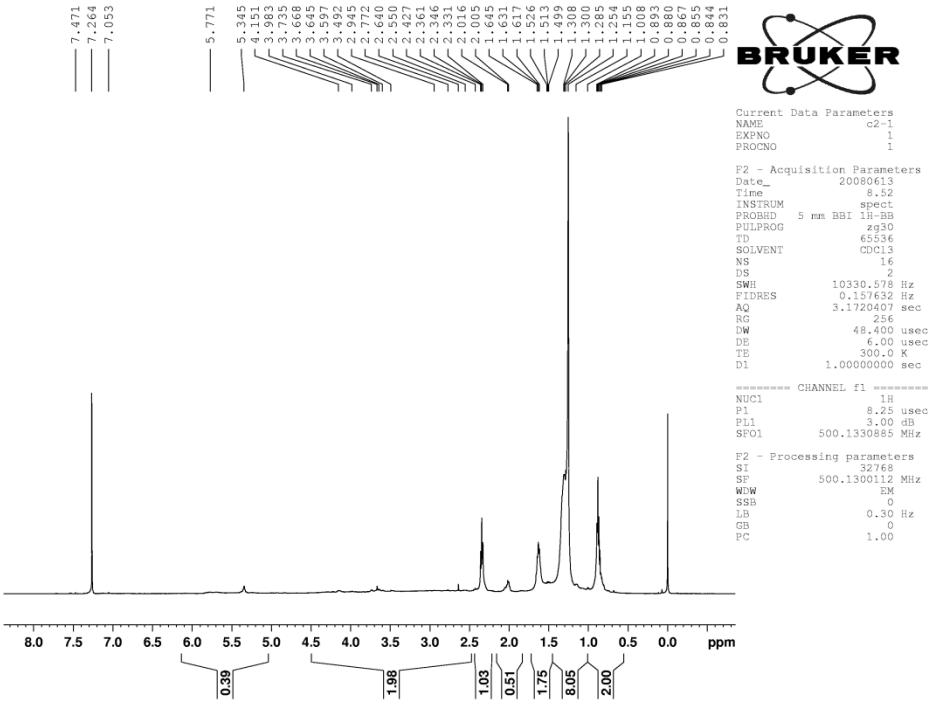


Figura 43: Espectro de ^{1}H RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

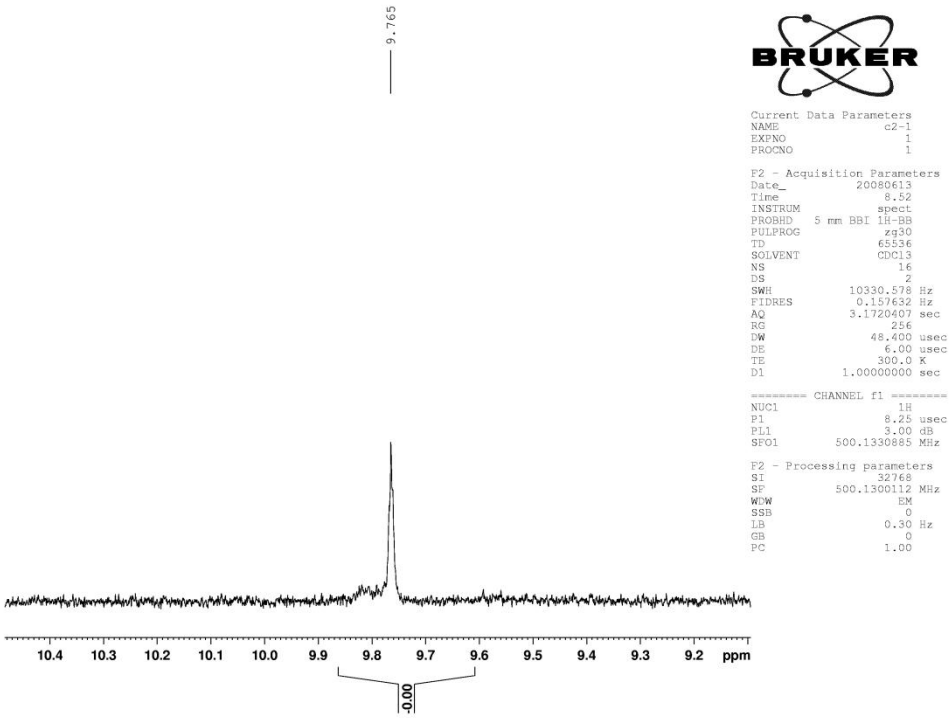


Figura 44: Expansão 1 do espectro de ^{1}H RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

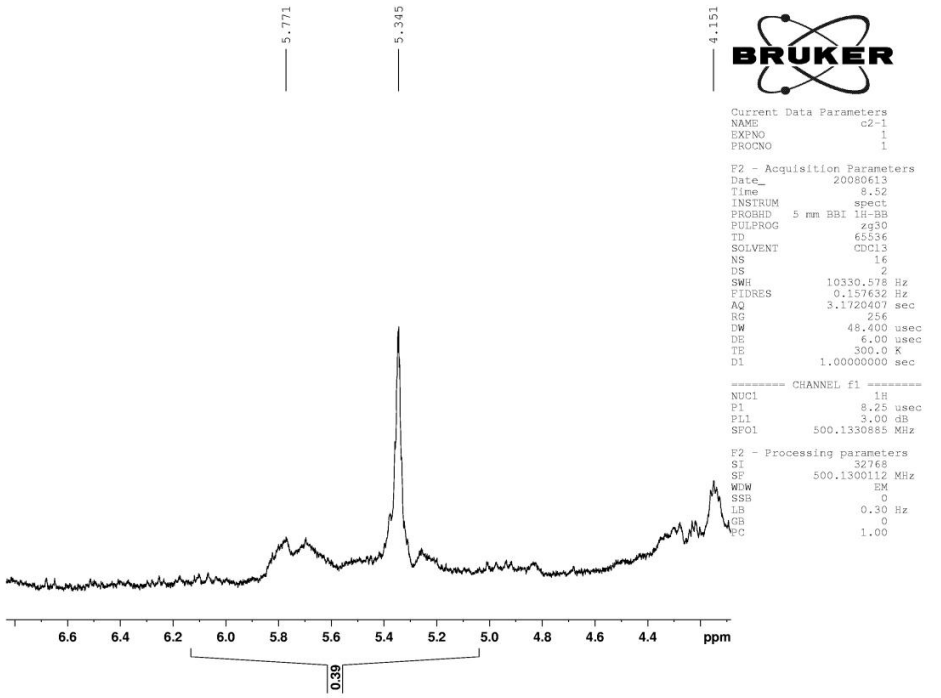


Figura 45: Expansão 2 do espectro de ^{1}H RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

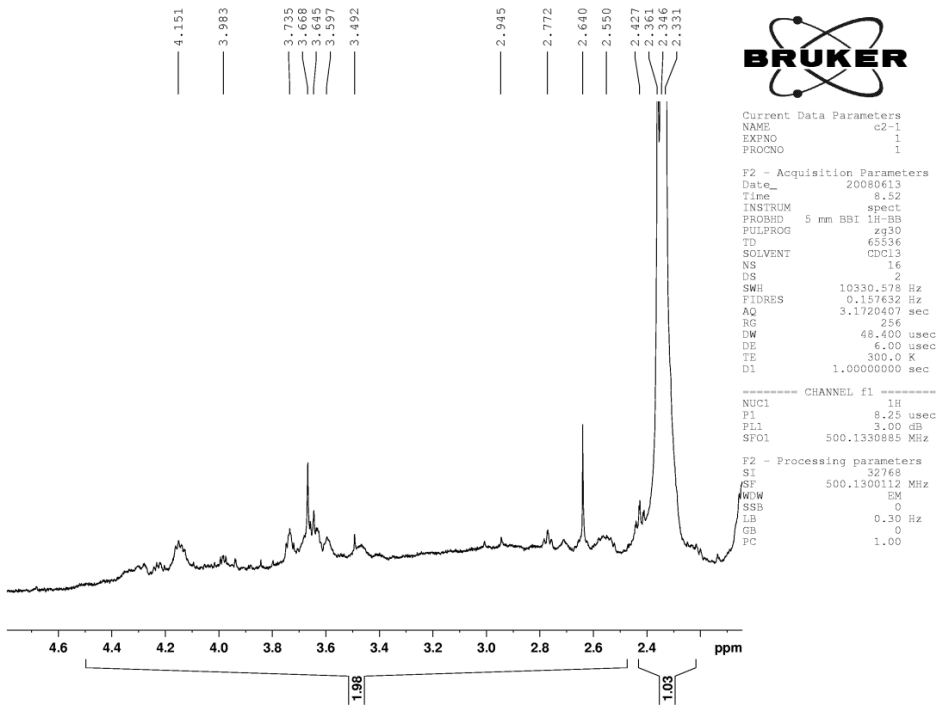


Figura 46: Expansão 3 do espectro de ^{1}H RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

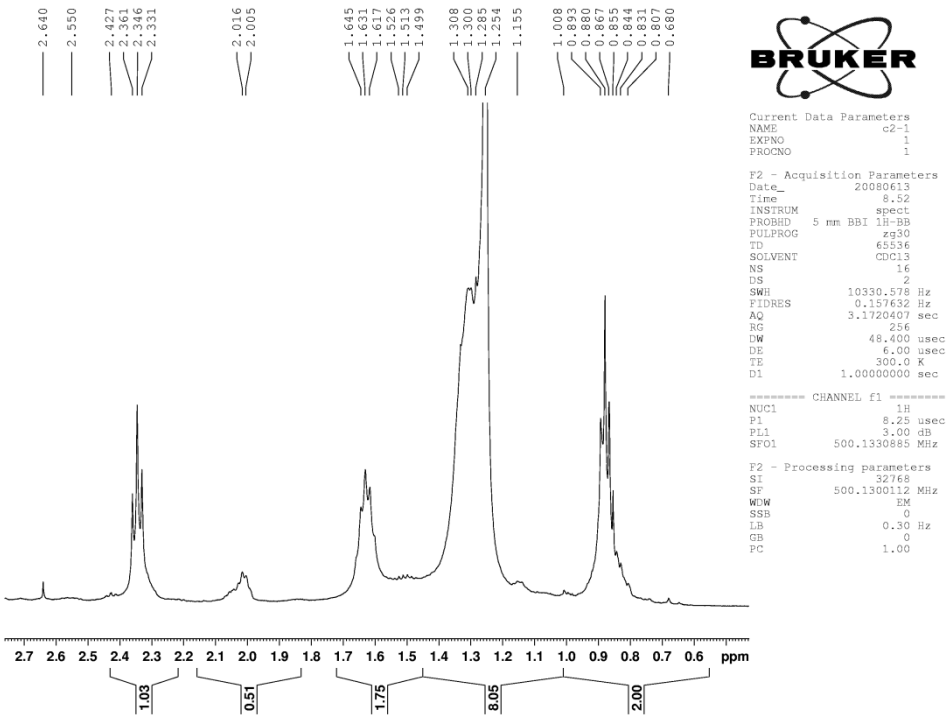


Figura 47: Expansão 4 do espectro de ^{1}H RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

Os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C, **Figuras 51-52**, p. 62, aliado ao DEPT-135, **Figuras 53-54**, p.63, fornecem as seguintes informações: δ 202,3 (C), δ 33,7 (CH_2), δ 31,9 (CH_2), δ 29,7 (CH_2), δ 29,6 (CH_2), δ 29,4 (CH_2), δ 29,3 (CH_2), δ 29,2 (CH_2), δ 29,1 (CH_2), δ 28,8 (CH_2), δ 24,7 (CH_2), δ 24,6 (CH_2) δ 22,7 (CH_2), δ 14,1 (CH_3), totalizando 14 carbonos para esta substância.

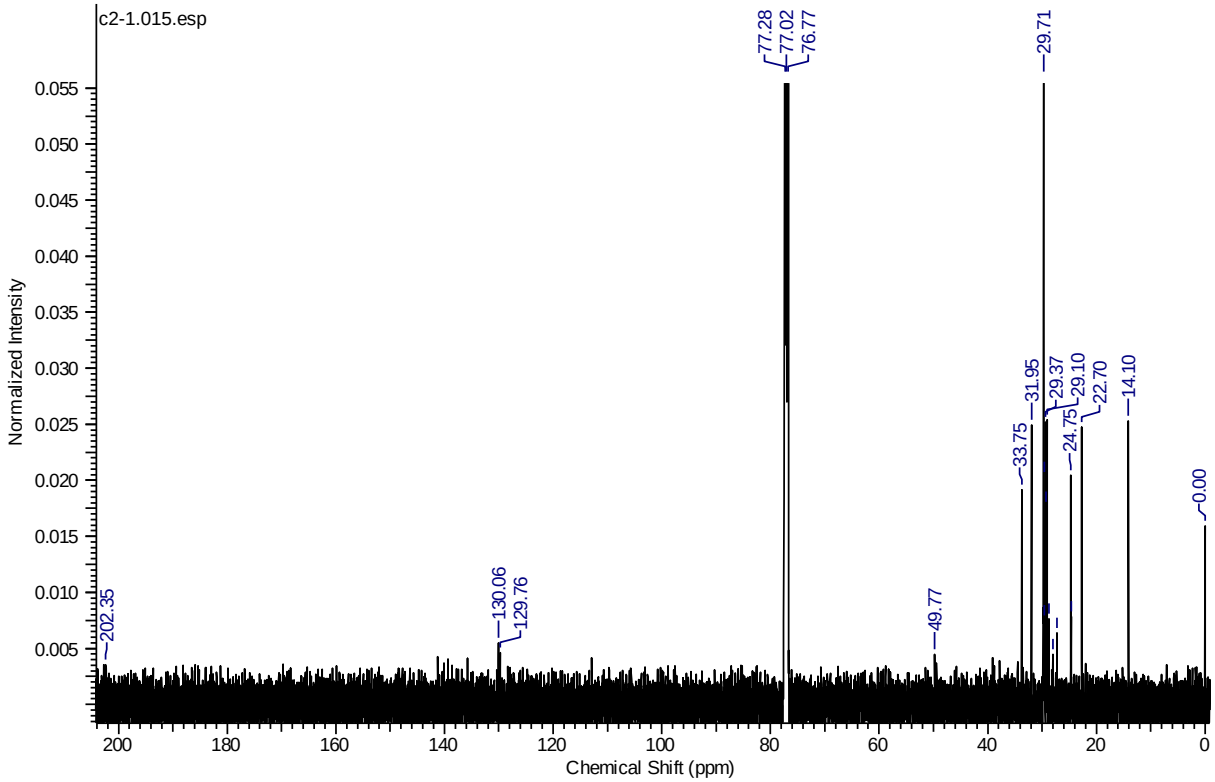


Figura 48: Espectro de ^{13}C RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

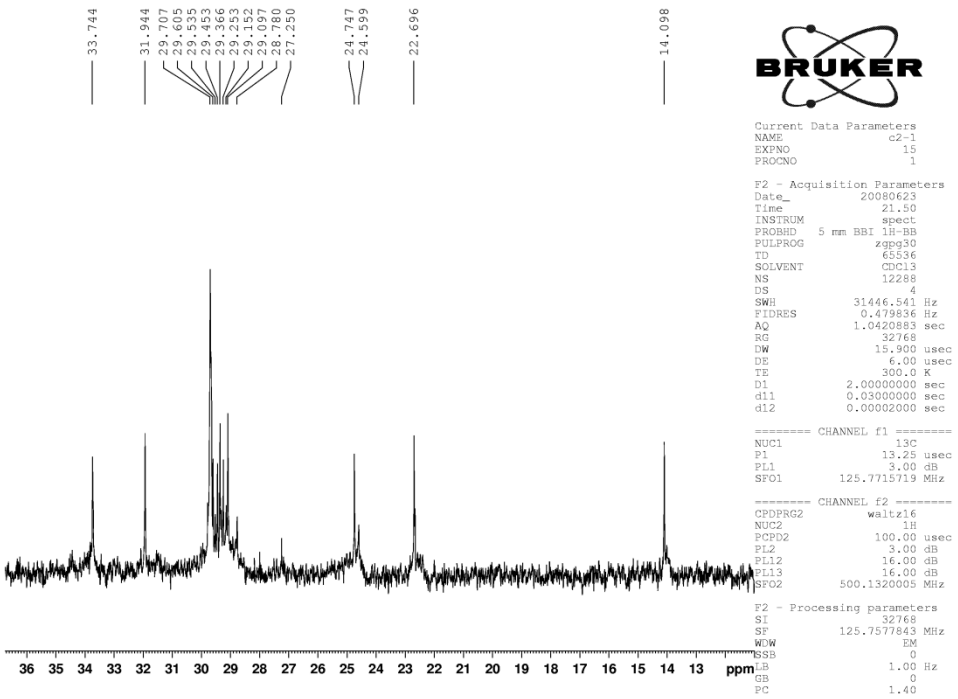


Figura 49: Expansão do espectro de ^{13}C RMN da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500 MHz.

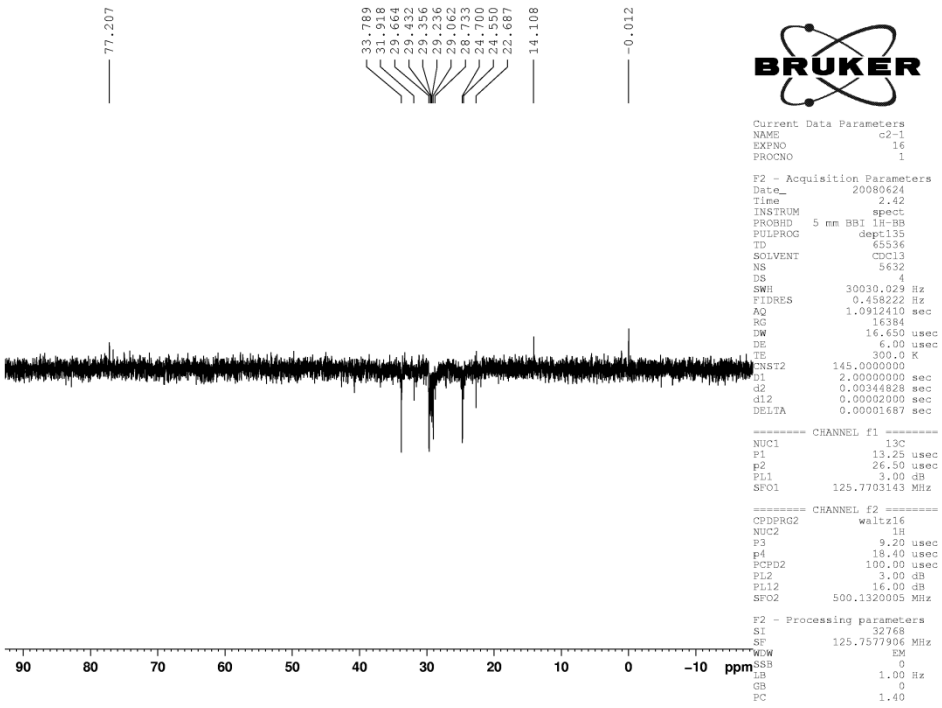


Figura 50: Espectro de DEPT 135 da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500MHz.

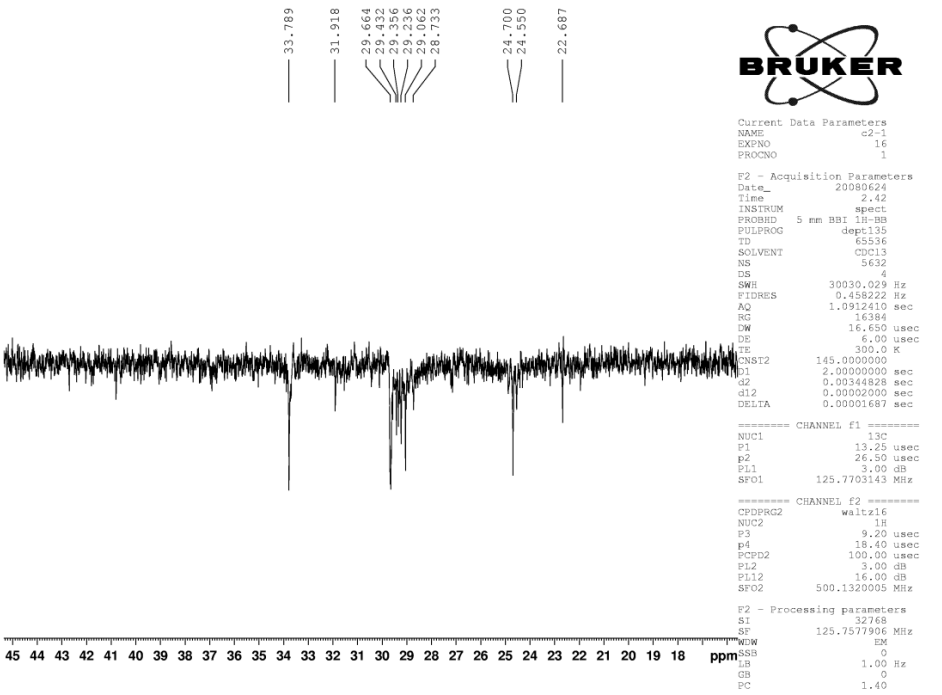
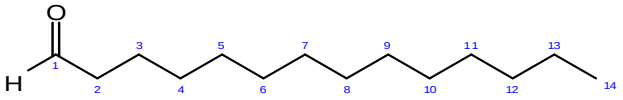


Figura 51: Expansão do espectro de DEPT 135 da substância 2, solubilizada em $CDCl_3$, 500MHz.

Com base no número de carbonos encontrados, nas informações do DEPT 135 e na integração dos hidrogênios, $C_{14}H_{26}O$ foi proposta como fórmula molecular, de massa molar 210g/mol.

Todos os dados de ^{1}H RMN, ^{13}C RMN e DEPT 135 da substância 2 estão compilados da **Tabela 11** anexa, p.118. Baseado nestas informações foi feita a seguinte proposta estrutural para a substância **2**.



Os dados foram comparados com a literatura, que confirmaram que a substância **2** é o tetradecanal isolado de *Ocotea usambarensis* e óleo de limão, é constituinte de feromônios sexuais Lipedópteros, é utilizado como aromatizante [122-126].

5.5. Análise do perfil químico dos extratos brutos das folhas e caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta

Os espectros de ^{1}H RMN dos extratos brutos de *P. carthagenensis* foram obtidos com o objetivo de conhecer seu perfil químico. Os extratos hexânicos dos caules **Figura 55**, p.64-65, e folhas **Figura 56**, p.65, apresentaram sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos quando comparados com os extratos etanólicos dos caules **Figura 57**, p.65, e folhas **Figura 58**, p.66**.**

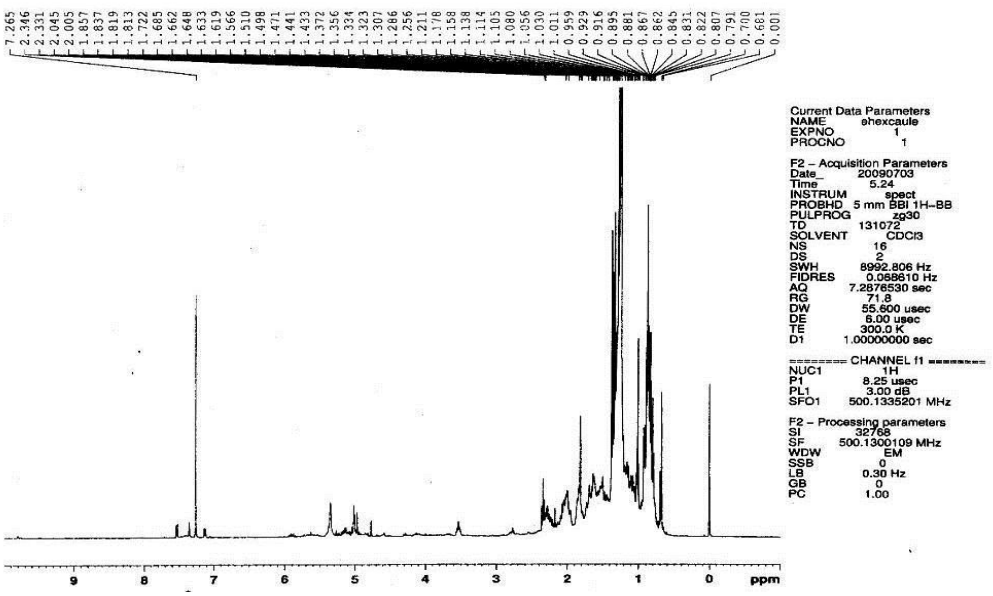


Figura 52: Espectro de ^{1}H RMN do extrato hexânico de caules de *P. carthagenensis*, solubilizado em $CDCl_3$, 500MHz.

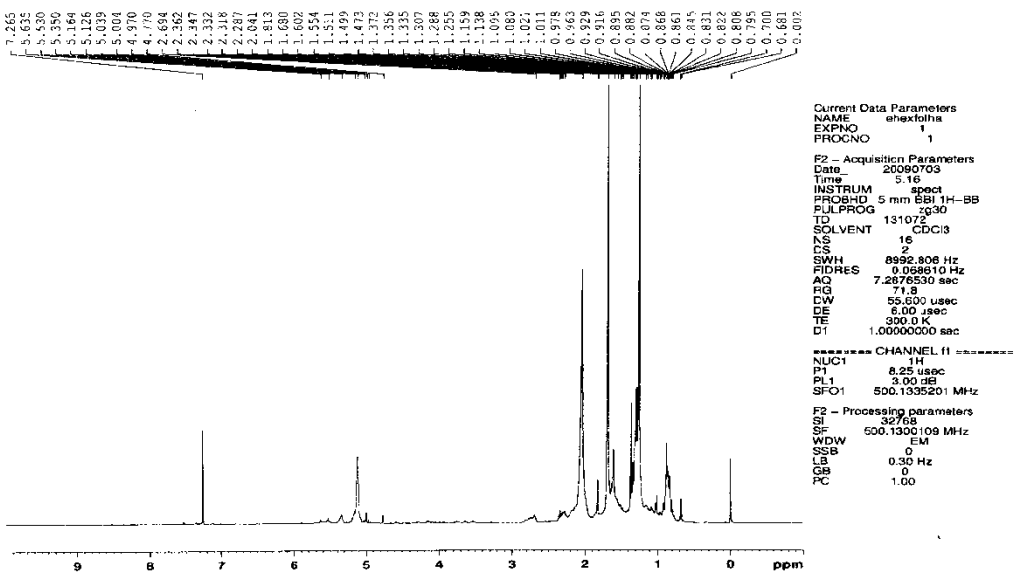


Figura 53: Espectro de ^{1}H RMN do extrato hexânico de folhas de *P. carthagenensis*, solubilizado em $CDCl_3$, 500MHz.

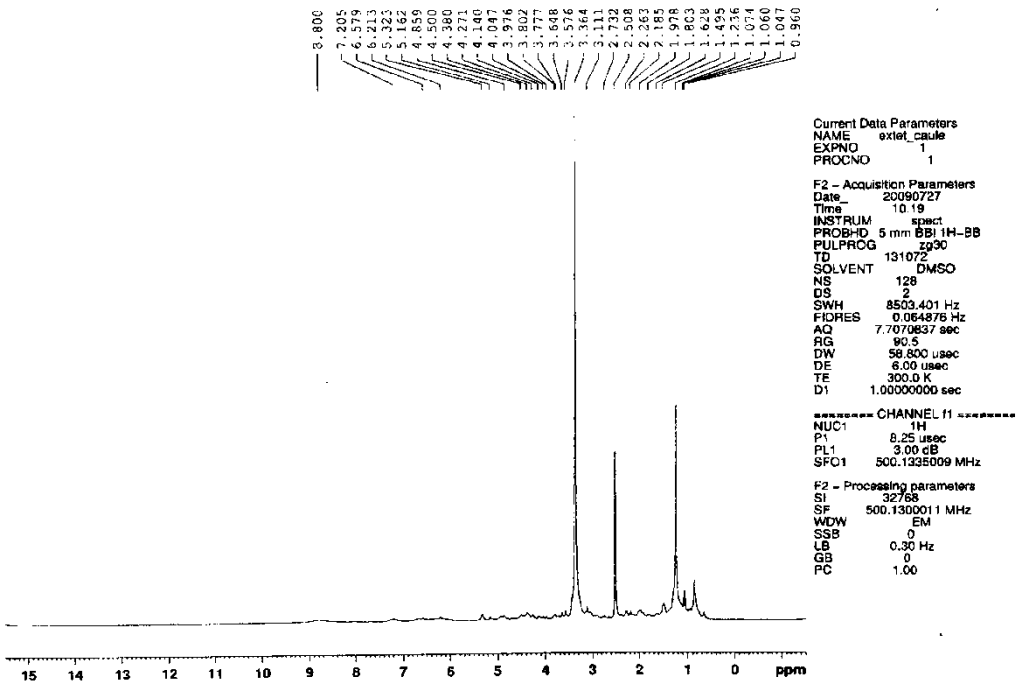


Figura 54: Espectro de ^{1}H RMN do extrato etanólico de caules de *P. carthagenensis*, solubilizado em DMSO, 500MHz.

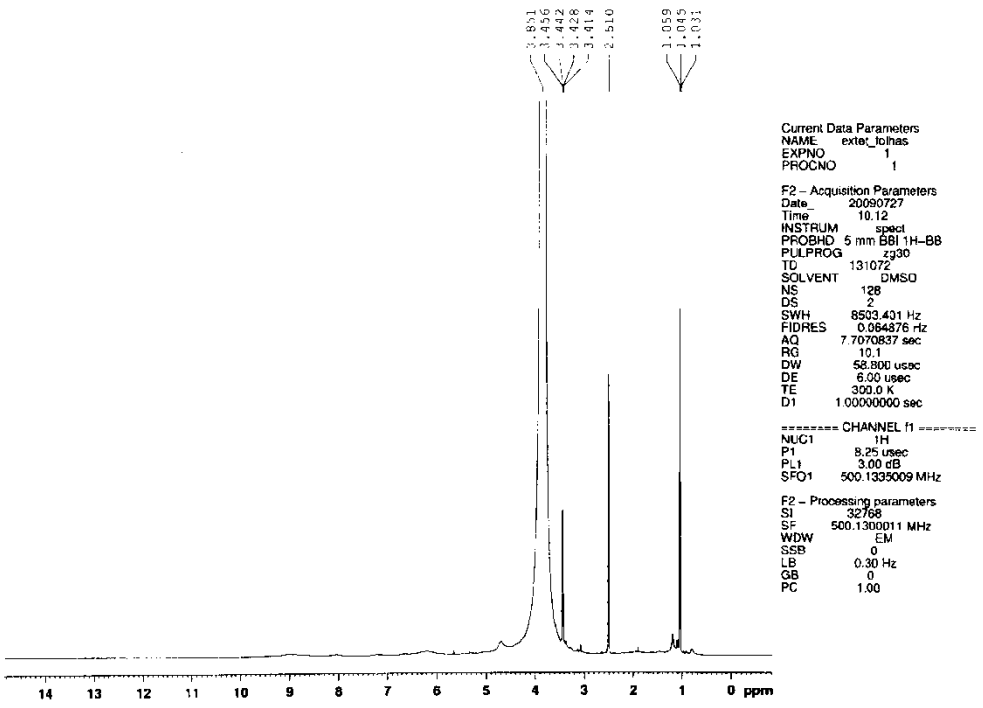


Figura 55: Espectro de RMN de ^{1}H do extrato etanólico de folhas de *P. carthagenensis*, solubilizado em DMSO, 500MHz.

5.6. Resultado dos ensaios dos extratos e frações de *P. carthagenensis*.

Das 206 amostras submetidas ao ensaio antiacetilcolinesterásico pelo método de Ellman, 64,56% (133) são ativas. Das 188 amostras submetidas ao teste falso positivo, 39,36% (74) são falso-positivas, ou seja, não são inibidores da enzima AChE. Das 196 amostras submetidas ao ensaio acetilcolinesterásico de Marston, 44,39% (87) mostraram resultado positivo. Das 181 amostras submetidas ao ensaio antioxidante com DPPH, 61,33% (111) apresentaram atividade. E das 69 amostras reveladas com β-caroteno, 57,97% (40) são ativas.

Com base nos resultados apresentados na **Figura 59**, p.67, podemos afirmar que as substâncias presentes no extrato de *P. carthagenensis* são excelentes inibidores da enzima AChE, principalmente pelo método de Ellman, além de excelentes sequestradores de radicais livres com DPPH e antioxidante com β-caroteno.

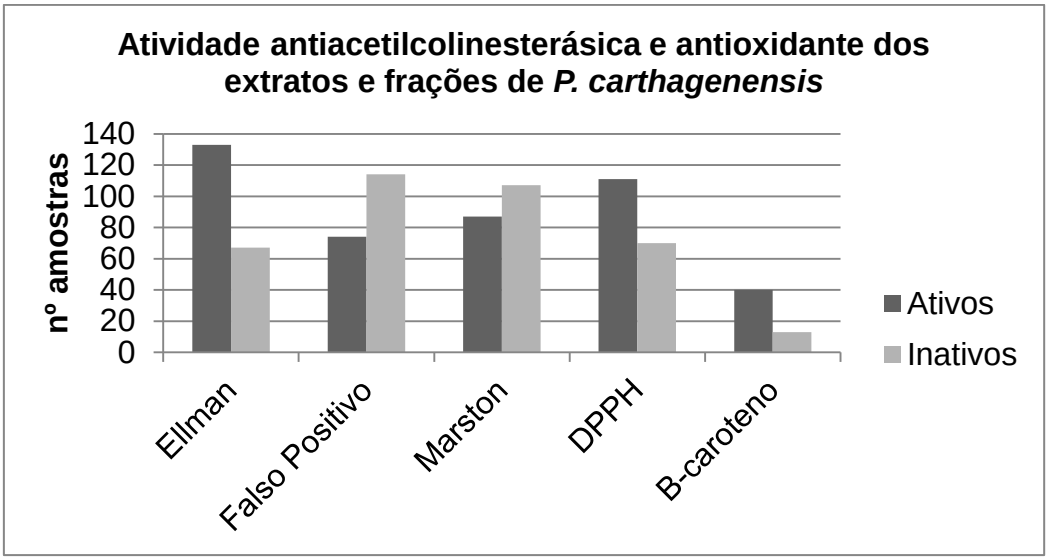


Figura 56: Gráfico dos extratos e frações de *P. carthagenensis* das atividades antioxidante e antiacetilcolinesterásica.

5.7. Análise do perfil químico das frações das folhas de *P. carthagenensis* – 1ª coleta

Os espectros de ^{1}H RMN das frações *P. carthagenensis* foram obtidos com o objetivo de conhecer seu perfil químico e analisar a pureza das seguintes frações isoladas: a subfração C9(6-8)-1ªcf, **Figura 60**, p.68, isolada da fr. AcOEt do extrato etanólico das folhas, a subfração C6(1)FM-1ªcf, **Figura 61**, p.68, a subfração C8(5)FC-1ªcf, **Figura 62**, p.69, a subfração C8(10)-1ªcf, **Figura 63**, p.69, e a subfração C8(6-7)FH-1ªcf, **Figura 64**, p.70, isoladas do extrato hexânico das folhas.

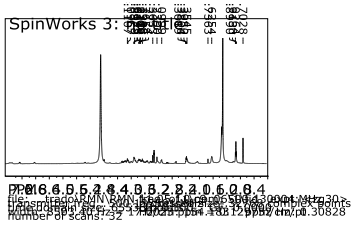


Figura 57: Espectro de ^{1}H RMN 500MHz da subfração C9(6-8)-1ªcf.

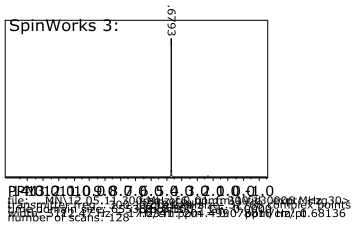


Figura 58: Espectro de ^{1}H RMN 300MHz da subfração C6(1)FM-1ªcf em D_2O.

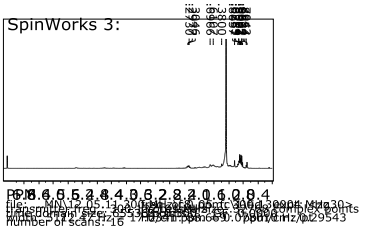


Figura 59: Espectro de ^{1}H RMN 300MHz da subfração C8(5)FC-1ªcf em $CDCl_3$.

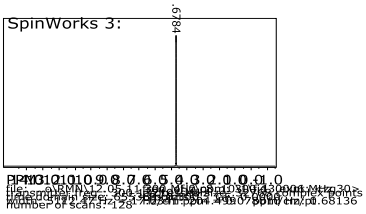


Figura 60: Espectro de ^{1}H RMN 300MHz da subfração C8(10)-1ªcf em D_2O.

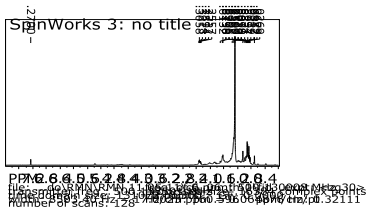


Figura 61: Espectro de ^{1}H RMN 500MHz da subfração C8(6-7)FH-1ªcf em $CDCl_3$.

5.8. Determinação estrutural da subfração C1(1)-1ªcf-SPE-Hex do extrato etanólico bruto das folhas de *P. carthagenensis*

Da fração hexânica do extrato etanólico bruto das folhas da 1ª coleta de *P. carthagenensis*, foi isolada uma subfração de aspecto oleoso e apolar, C1(1)-SPE-Hex-1ªc, sequestradora de radicais livres que foi caracterizada por CG/EM.

No cromatograma desta subfração C1(1)-SPE-Hex-1ªc **Figura 65**, p.70, foi possível identificar 32 picos, sendo o pico em 21,9min o majoritário. Pela expansão deste cromatograma **Figura 66**, p.71, outros cinco picos são notáveis, em 21,2min, 22,0min, 23,5min, 23,7min e em 28,8min.

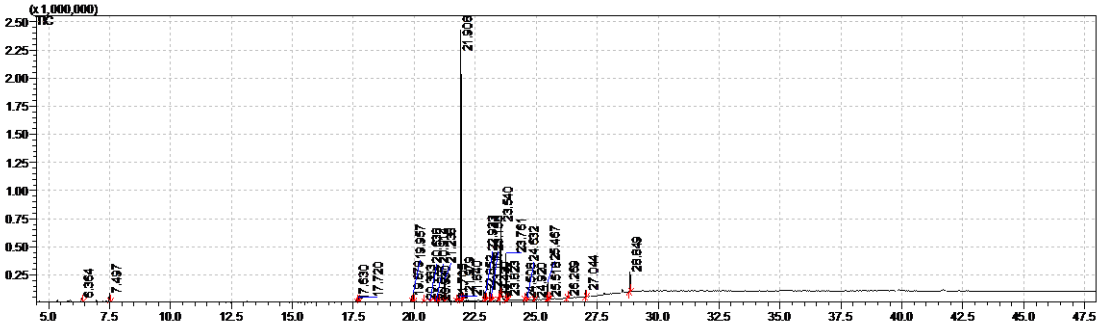


Figura 62: Cromatograma da subfração C1-1ªc(1)-SPE-Hex.

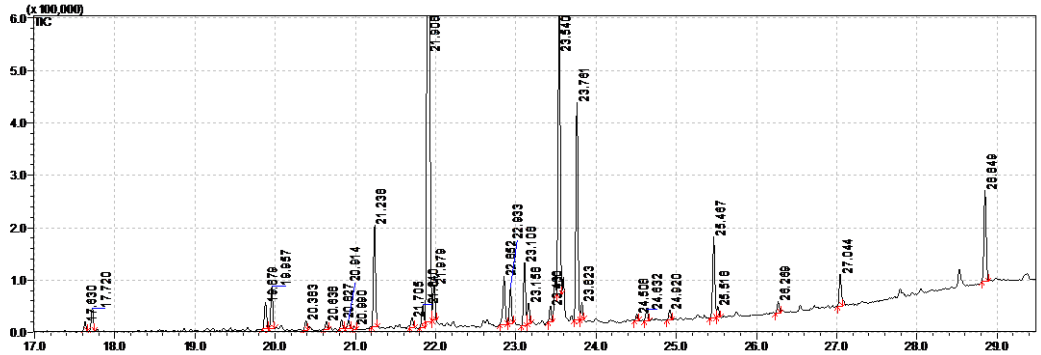


Figura 63: Expansão do cromatograma da subfração C1-1ªc(1)-SPE-Hex.

Através da análise da biblioteca NIST05s.LIB do CG/EM foi possível identificar seis possíveis componentes majoritários da subfração C1-1ªc(1)-SPE-Hex **Tabela 12** anexa, p.119.

Os outros 26 compostos minoritários também foram identificados **Tabela 13** anexa, p.120.

Pela absorção no infravermelho, **Figura 67**, p.71, algumas bandas características puderam ser observadas, tais como os estiramentos C-H alifático em 2925cm^{-1} e 2854cm^{-1} e o sinal em 1740cm^{-1} característico de C=O, confirmando a compatibilidade dos três etil ésteres alifáticos de longas cadeias de hidrocarbonetos majoritários propostos (21,9 min, 23,5 min e 23,7 min) na **Tabela 12** anexa, p.119.

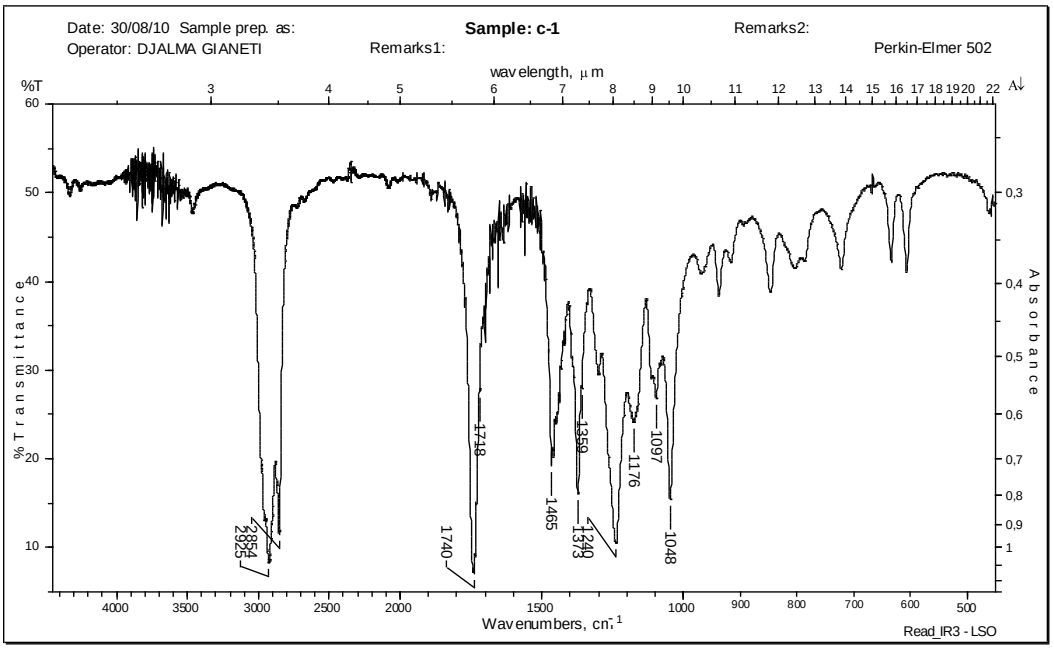


Figura 64: Espectro de infravermelho da subfração C1-1ªc(1)-SPE-Hex.

Pela análise do espectro de massas obtido no modo positivo (ESI+) por inserção direta em um sistema CL/EM, **Figura 68**, p.72, observam-se os sinais em *m/z* 214,2 e 282,7.

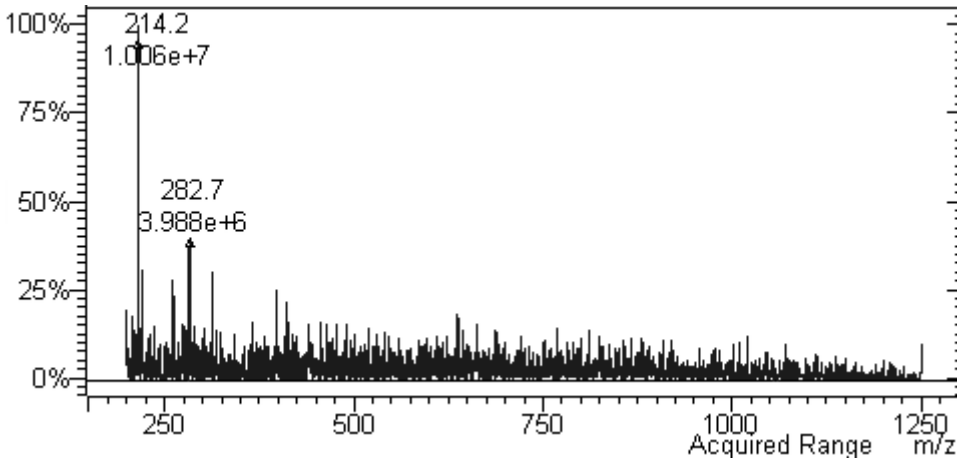
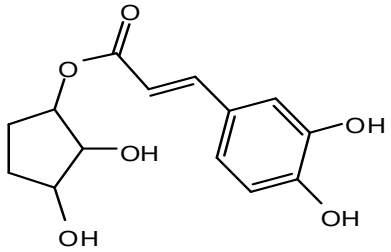
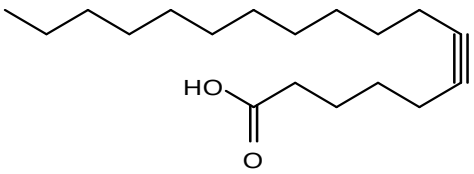


Figura 65: Espectro de massas (ESI+) em modo positivo da subfração C1-1ªc(1)-SPE-Hex.

O sinal em *m/z* 214,2 foi identificado como uma impureza do equipamento, e para o sinal em *m/z* 282,7 foi feita uma busca no dicionário de produtos naturais (http://dnp.chemnetbase.com) de compostos produzidos pela família Rubiaceae, na faixa entre 280-282, foram encontrados 2 compostos: 1,2,3-Ciclopentanetriol; (1α,2α,3α)-form, 1-*O*-(3,4-Dihidroxi-*E*-cinnamoil) (**26**), $C_{14}H_{16}O_6$, MM 280,277, um antioxidante de folhas de *Chimarrhis turbinata* [127], [126] e ácido 6-Octadecinóico (**27**), $C_{18}H_{32}O_2$, MM 280,450, constituinte de *Pentagonia gigantifolia* and *Sommera sabiceoides* [128], [129], [126].



(**26**)



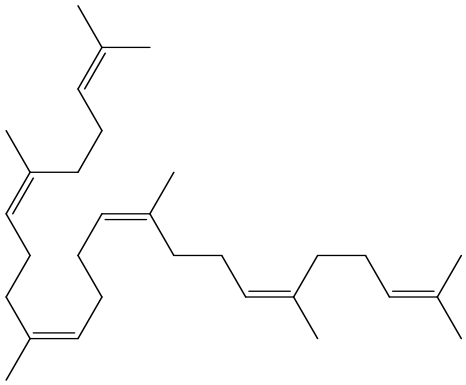
(**27**)

O composto (**26**) é excluído pela análise de IV, pois não apresenta banda característica de alcoóis, nem perfil característico das propostas apresentadas pelo banco de dados do CG-EM. O composto (**27**) é possível, pois apresenta o mesmo

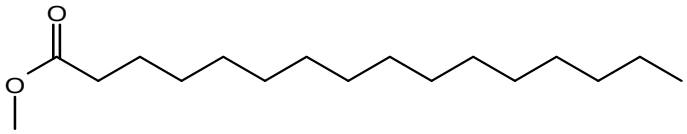
perfil das estruturas propostas pelo banco de dados do CG/EM, uma longa cadeia de hidrocarbonetos, porém a tripla ligação não é apresentada por nenhuma delas.

Pela análise dos compostos majoritários propostos pelo banco de dados do CG/EM, temos o 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno ,2,6,10,15,19,23-hexametil-, (all-E) (**28**), $C_{30}H_{50}$, 410g/mol, o ácido hexadecanóico, metil éster (**29**), $C_{17}H_{34}O_2$, 270g/mol, o eicosano (**30**), $C_{20}H_{42}$, 282g/mol, que difere em apenas 1u do sinal apresentado no espectro, porém não apresenta a carbonila presente no IV, o oleato de etila (**31**), $C_{20}H_{38}O_2$, 310g/mol, o ácido hexadecanóico, etil éster (**32**), $C_{18}H_{36}O_2$, 284g/mol, que difere em apenas 2u da massa molar do sinal do espectro de massas, o ácido octadecanóico, etil éster (**33**), $C_{20}H_{40}O_2$, 312g/mol.

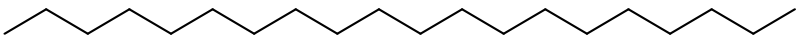
Dentre todas estas propostas, a mais provável é a substância (**32**).



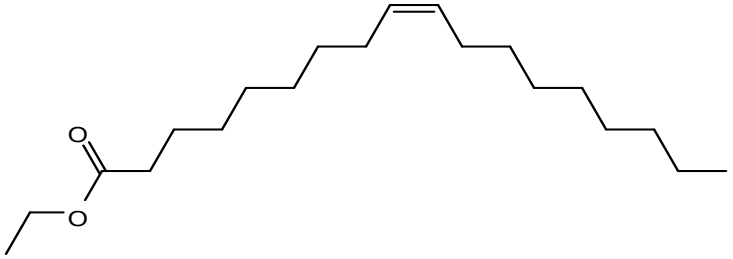
(**28**)



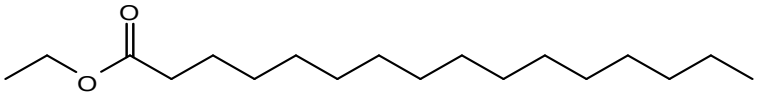
(**29**)



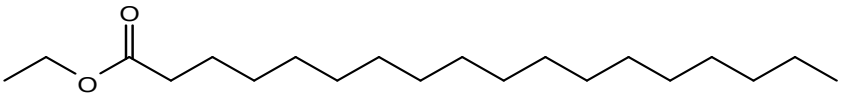
(**30**)



(**31**)



(**32**)



(**33**)

5.9. Ensaio antiacetilcolinesterásico no biorreator IMER-AChE

O resultado do ensaio acetilcolinesterásico no biorreator IMER-AChE é apresentado pela porcentagem de inibição do composto **Tabela 6** anexa, p.110.

Com base nos resultados apresentados na tabela, pode-se afirmar que as amostras em análise não são bons inibidores da enzima AChE uma vez que apresentam porcentagem de inibição menor que 50%, no entanto, dos compostos analisados, a amostra C8(5)FC-1ªcf foi a que apresentou melhor resultado, seguido de C6(6)cristais-1ªcf, C8(6)cristais-1ªcf, C6(1)FM-1ªc,f C7(122)cristais-1ªcf e C8(10)-1ªcf.

5.10. Revelação de alcalóides totais das folhas e caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta

O resultado da revelação com cloro-iodoplatinado das frações e extratos resultantes da extração ácido-base da 1ª coleta de caules e folhas de *P. carthagenensis* está resumido na **Tabela 14** anexa, p.127, que apresenta os valores de Rf dos compostos, assim como sua coloração e atividade.

Todas as frações de *P. carthagenensis* – 1ªcoleta apresentaram alcalóides: EEbf, EEbc, fr. Cácf, fr. Cácc, fr. Cbf, fr. Cbc, fr. Aqbf e fr. Aqbc.

As frações de alcalóides totais (fr. Cbf e fr. Cbc) foram analisadas por ESI em inserção direta em modo positivo. O espectro de massas da fr. Cbf **Figura 69**, p.75, apresentou cinco sinais distintos e o espectro de massas da fr. Cbc **Figura 70**, p.75, apresentou sete sinais distintos. Sendo que os sinais *m/z* 338, 393 e 619 são comuns às duas frações.

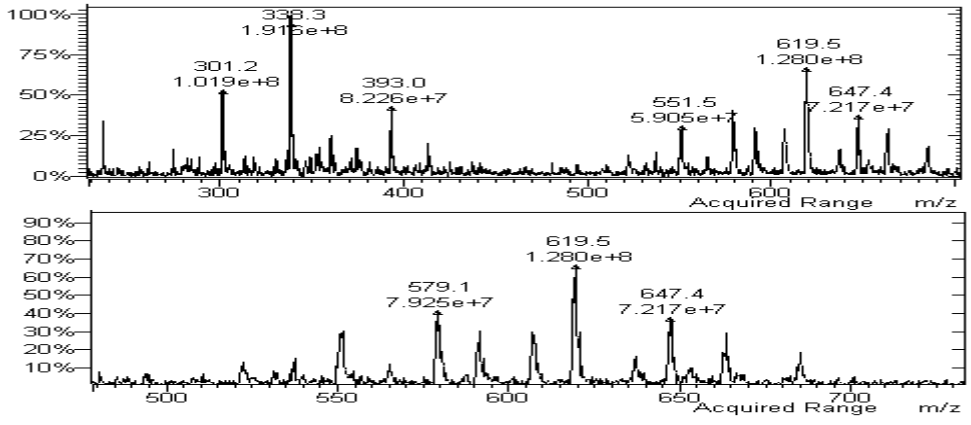


Figura 66: Espectro de massas da fr. clorofórmica básica das folhas (Cbf) de *P. carthagenensis* 1ª coleta: a) Espectro de massas; b) Expansão do espectro de massas.

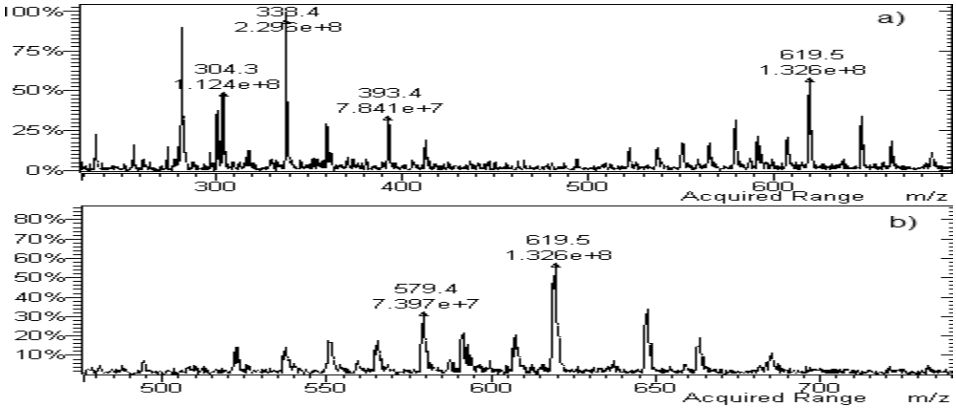
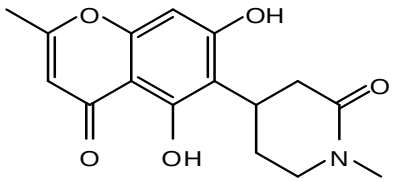


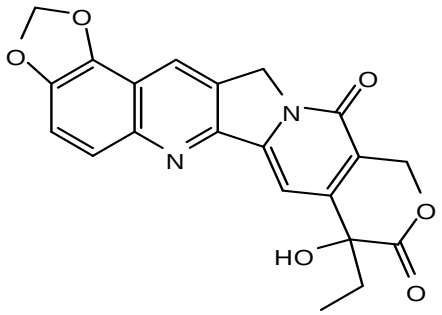
Figura 67: Espectro de massas da fr. clorofórmica básica dos caules (Cbc) de *P. carthagenensis* 1ª coleta: a) Espectro de massas; b) Expansão do espectro de massas.

Foi feita uma busca no dicionário de produtos naturais (http://dnp.chemnetbase.com) de compostos nitrogenados produzidos pela família Rubiaceae para cada um dos sinais.

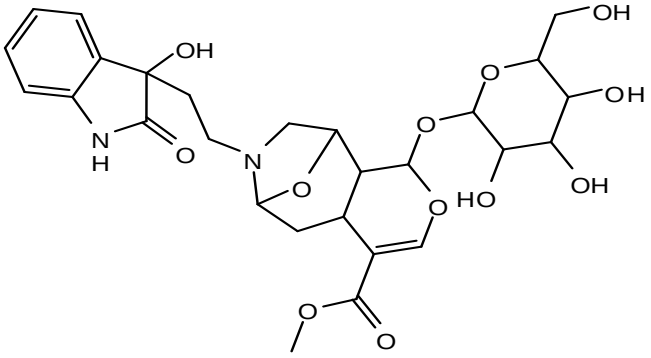
Na fr. Cbc, para o sinal *m/z* 304,3 a busca foi feita na faixa entre 302-304, foram encontrados quatro compostos, mas apenas um nitrogenado e compatível com a massa pesquisada, 4-(5,7-Diidroxi-2-metil-4-oxo-4*H*-1-benzopiran-6-il)-1-metil-2-piperidinona (**34**), $C_{16}H_{17}NO_5$, MM 303,3, um alcalóide isolado de *Schumanniophyton problematicum* [130], [126]. Para o sinal em *m/z* 338, entre 336-338, foram encontrados 2 compostos, um deles nitrogenado porém com massa diferente de 337. Para o sinal *m/z* 393,4, foram pesquisados os valores entre 391-393 e foram encontrados 4 compostos, sendo apenas 1 nitrogenado e com massa compatível, a 9,10-Metilenedioxicamptotecina (**35**), $C_{21}H_{16}N_2O_6$, MM 392,4, um alcalóide isolado de *Ophiorrhiza trichocarpon* [131], [126]. Para o sinal *m/z* 579,4, foram pesquisados valores entre 577-579, tendo sido encontrados 10 compostos, sendo apenas 1 nitrogenado e de massa compatível, a Anthocephalusine A (**36**), $C_{27}H_{34}N_2O_{12}$, MM 578,6, um alcalóide isolado das folhas de *Anthocephalus chinensis* [132], [126]. Para o sinal m/z 619,5, foram pesquisados valores entre 617-619, sendo encontrados 5 compostos, porém nenhum nitrogenado.



(**34**)

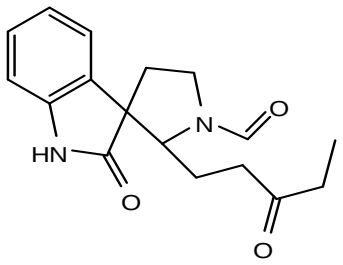


(**35**)



(**36**)

Na fr. Cbf, para o sinal *m/z* 301,2, a busca foi feita na faixa entre 299-301, e foram encontrados 32 compostos, 4 nitrogenados e dos quais um deles massa molecular compatível, a Salacina (**37**), $C_{17}H_{20}N_2O_3$, 300,357g/mol, um alcalóide isolado das folhas de *Uncaria salaccensis* (*Uncaria attenuata*) [133], [126]. Os sinais m/z 338, 393, 579 e 619 já foram analisados para fr. Cbc, as substâncias (**35**) e (**36**) também podem estar presentes nas folhas de *P. carthagenensis*. Para o sinal em *m/z* 551,5, foram pesquisados os valores entre 549-551, sendo encontrados 8 compostos, porém nenhum nitrogenado. Para o sinal *m/z* 647,4, entre 645-647, nenhum composto foi encontrado.



(**37**)

Este resultado nos permite inferir a presença dos alcalóides (**34**), (**35**) e (**36**) na fração rica em alcalóides dos caules da 1ª coleta de *P. carthagenensis* e que os alcalóides (**35**), (**36**) e (**37**) estejam presentes na fração rica em alcaloídes das folhas da 1ª coleta de *P. carthagenensis*. Um estudo de derreplicação será posteriormente realizado a fim de confirmar essas informações.

5.11. Revelação de alcalóides totais das sementes, caules e folhas de *P. carthagenensis* – 2ª coleta

O resultado da revelação com cloro-iodoplatinado das frações e extratos resultantes da extração ácido-base da 2ª coleta das sementes, caules e folhas de *P. carthagenensis* está resumido na **Tabela 15** anexa, p.127 que apresenta os valores de Rf dos compostos, assim como sua coloração e atividade.

Pode-se concluir que todos os extratos e frações submetidos à revelação com IP, apresentam alcalóides. As frações de alcalóides totais (fr. alcalóides sementes, fr. alcalóides caules e fr. alcalóides folhas) foram analisadas por ESI em inserção direta em modo positivo. O espectro de massas da fr. alcalóides sementes **Figura 71**, apresentou 3 sinais distintos, o espectro de massas da fr. alcalóides caules

Figura 72, apresentou 7 sinais distintos e o espectro de massas da fr. alcalóides folhas **Figura 73**, apresentou 7 sinais distintos. Sendo que os sinais *m/z* 338,5 e 619,2 são comuns às três frações.

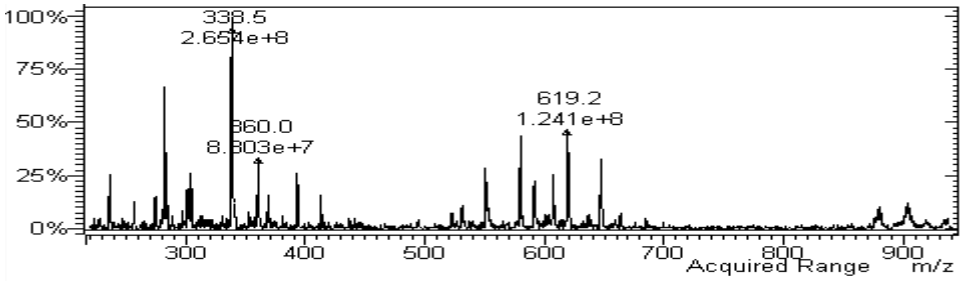


Figura 68: Espectro de massas da fr. alcalóides sementes de *P. carthagenensis* 2ª coleta.

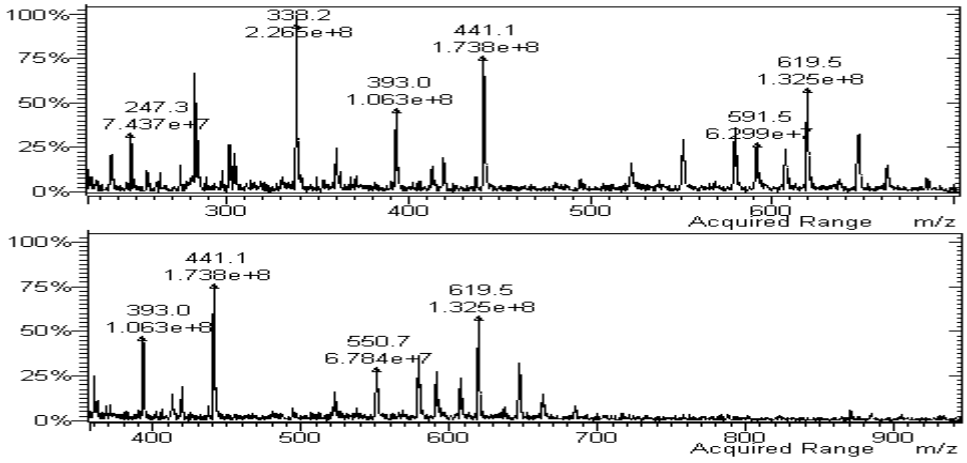


Figura 69: Espectro de massas da fr. alcalóides caules de *P. carthagenensis* 2ª coleta: a) Espectro de massas; b) Expansão do espectro de massas.

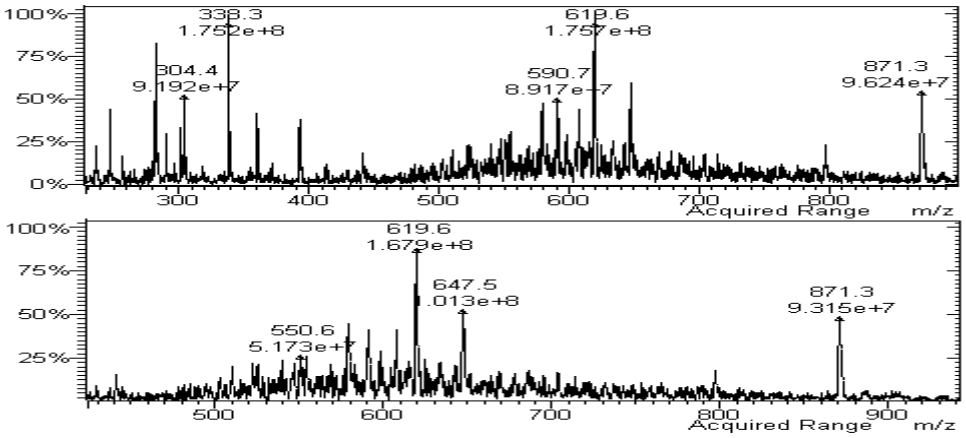
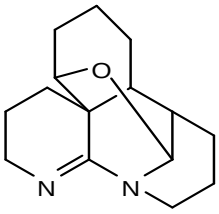


Figura 70: Espectro de massas da fr. alcalóides folhas de *P. carthagenensis* 2ª coleta: a) Espectro de massas; b) Expansão do espectro de massas.

Uma busca foi realizada no dicionário de produtos naturais (http://dnp.chemnetbase.com) por compostos nitrogenados produzidos por espécies da família Rubiaceae para cada um dos sinais.

Na fr. alcalóide sementes, para os sinais *m/z* 338 pesquisando valores entre 336-338 e m/z 619, valores entre 617 e 619, pesquisados anteriormente, nenhum composto foi sugerido. Para o sinal *m/z* 360,0, para os valores pesquisados entre 358-360, foram encontrados 8 compostos, entretanto nenhum deles é nitrogenado.

Na fr. alcalóide caules, além dos sinais *m/z* 338,2, os valores 393,0 e 619,5 encontrados no espectro da fr. Cbc, foram pesquisados anteriormente, sugerindo (**35**) como composto presente nesta fração. Para o sinal *m/z* 247,3, pesquisando os valores entre 245-247, um composto nitrogenado foi encontrado de massa compatível, a Nitraramine; 4,4*a*-Didehydro (**38**), $C_{15}H_{22}N_2O$, MM 246,4, alcalóide isolado de folhas de *Myrioneuron nutans* [134], [126]. Para 441,1, pesquisando valores entre 439-441, foram encontrados 8 compostos, mas nenhum nitrogenado. Para *m/z* 550,7, pesquisando valores entre 548-550, foram encontrados 11 compostos, porém nenhum nitrogenado. Para *m/z* 591,5, pesquisando os valores entre 589-591, apenas 1 composto foi encontrado, porém, ele não apresenta nitrogênio em sua composição.



(**38**)

Na fr. alcalóide folhas, além dos sinais em *m/z* 338,3 e 619,6 encontrados no espectro da fr. Cbf 1ªc e em todas as outras frações, pesquisadas anteriormente que não sugerem a presença de compostos nitrogenados o sinal em m/z 304,4, pesquisado anteriormente para a fr. Cbc 1ªc, sugere o composto (**34**) para esta fração. Para os sinais em *m/z* 550,6 e 590,7, pesquisados anteriormente para a fr. alcalóides caule 2ªc, não foram encontrados nos bancos de dados compostos nitrogenados. Para o sinal em *m/z* 647,4, pesquisado anteriormente para a fr. Cbf

1ªc, nenhum composto foi sugerido. E para o sinal *m/z* 871,3, pesquisando os valores entre 869-871, nenhum composto foi encontrado.

Este resultado, não sugere alcalóides para a fração alcaloídica das sementes da 2ª coleta de *P. carthagenensis*, mas é provável que os alcalóides (**35**) e (**38**) estejam presentes na fração alcaloídica dos caules da 2ª coleta de *P. carthagenensis* e que o alcalóide (**34**) esteja presente na fração alcaloídica das folhas da 2ª coleta de *P. carthagenensis*. A fim de confirmar esta presença, um estudo de derreplicação destas frações será feito posteriormente, iniciando-se pelo composto (**35**) que foi o único presente nos caules tanto na primeira quanto na segunda coleta de *P. carthagenensis*.

5.12. Resultado do ensaio de todos os extratos e frações testados.

Das 758 amostras submetidas ao ensaio antiacetilcolinesterásico pelo método de Ellman, 36,54% (277) são ativas. Das 387 amostras submetidas ao teste falso positivo, 28,68% (111) são falso-positivas, ou seja, não são inibidores da enzima AChE. Das 389 amostras submetidas ao ensaio acetilcolinesterásico de Marston, 43,96% (171) mostraram-se bons antiacetilcolinesterásicos. Das 627 amostras submetidas ao ensaio antioxidante com DPPH, 48,80% (306) apresentaram atividade. E das 75 amostras reveladas com β-caroteno, 53,33% (40) são ativas.

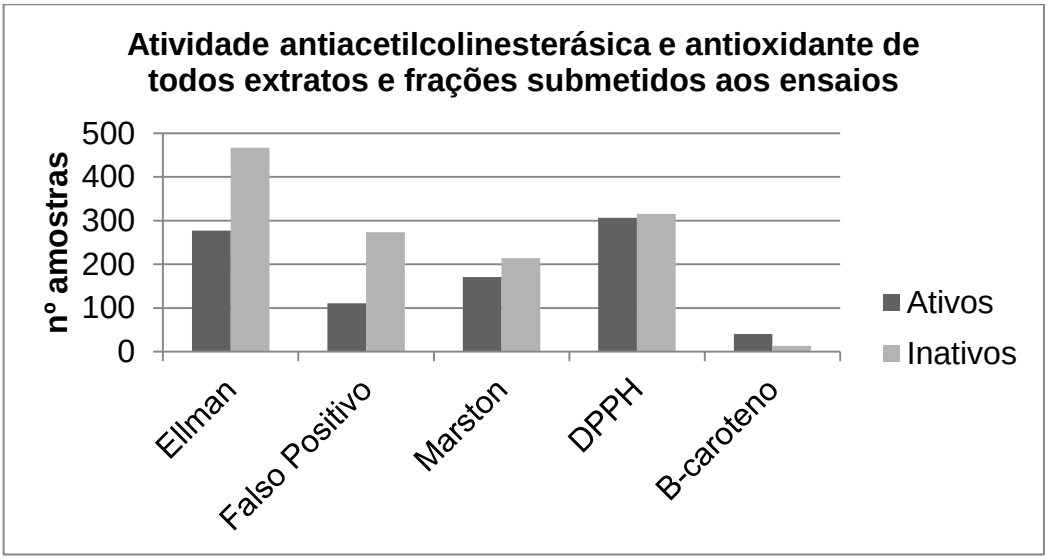


Figura 71: Gráfico dos todos extratos e frações de diversas origens submetidos aos ensaios.

Com base nos resultados apresentados na **Figura 74**, p.81, conclui-se que os extratos e frações de diversas origens, submetidos aos ensaios antioxidantes e

anticolinesterásicos, apresentaram melhores resultados como sequestradores de radicais livres do que inibidores da enzima AChE.

6. Conclusões

O fracionamento cromatográfico do extrato da actinobactéria-36 (50PL) resultou no isolamento de duas substâncias: o ácido graxo insaturado, éster metílico do ácido *cis*-6, *cis*-8 octadecadienóico, correspondente a fração C1(1)-1ªf e o aldeído, tetradecanal, correspondente a fração C2(1-14)-1ªf, já relatados anteriormente na literatura, não para micro-organismos.

O estudo da subfração C1(1)-SPE-Hex-1ªc proveniente da fração hexânica do extrato etanólico das folhas da espécie *P. carthagenensis* Jacq. resultou na identificação de seis substâncias por CG/EM (terpenóide, metil éster saturado, alcano, etil ester insaturado e etil ester saturado) e duas propostas por EM (éster aromático insaturado e ácido carboxílico insaturado), todos relatados na literatura.

A partir do extrato hexânico das folhas foram isoladas 8 compostos. Do extrato etanólico das folhas, além da fração C1(1)SPE-Hex-1ªcf, 4 compostos foram isolados. A partir do extrato etanólico dos caules isolou-se apenas um composto. No entanto, a massa isolada de algumas substâncias foi insuficiente para sua caracterização e três delas estão em fase de confirmação estrutural.

Como resultado deste trabalho, tem-se a evidência da ocorrência de alcalóides nas folhas e caules de *P. carthagenensis*, informação que vai de encontro aos resultados de Leal, uma vez que nenhum dos supostos alcalóides encontrados são opióides. A identificação dessas substâncias contribuem para a ampliação do conhecimento sobre a química da espécie *P. carthagenensis* e da actinobactéria-36 (50PL). Através da triagem inicial de extratos de origem microbiológica, principalmente micro-organismos, observou-se maior incidência de moléculas com atividade inibidora da enzima AChE do que com atividade antioxidante. Curiosamente, o micro-organismo escolhido para purificação, a actinobactéria-36 (50PL) apresentou em sua maioria, frações com sequestradores de radicais livres. Já para os extrato de *P. carthagenensis* foi possível identificar a maior presença de inibidores da enzima AChE, principalmente pelo método de Ellman, além de bons

sequestradores de radicais livres com DPPH e antioxidante com β-caroteno. De forma geral, a análise de extratos e frações de diversas origens apresentou melhores resultados como sequestradores de radicais livres do que inibidores da enzima AChE.

7. Referências

1. Pinto, A.C., et al. *Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas.* Química Nova, 2002. **25**: p. 45-61.
2. Hostettmann, K., E.F. Queiroz, and P.C. Vieira,. *Princípios ativos de plantas superiores*. 2003: EdUFSCar.
3. Viegas Jr, C., V.S. Bolzani, and E.J. Barreiro,. *The natural products and the modern medicinal chemistry.* Química Nova, 2006. **29**(2): p. 326-337.
4. Barreiro, E.J. and C.A.M. Fraga,. *The utilization of the safrole, principal chemical constituent of sassafras oil, in the synthesis of compounds actives in the arachidonic acid cascade: antiinflammatory, analgesic and antithrombotic.* Química Nova, 1999. **22**(5): p. 744-759.
5. Almeida, M.R., et al. *Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil?* Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2009. **19**(4): p. 942-952.
6. Briggs, L.H., H.T. Openshaw, and R. Robinson,. *Strychnine and Brucine. 42. Constitution of the Neo-Series of Bases and Their Oxidation Products.* Journal of the Chemical Society, 1946. p. 903-908.
7. Rosa, E.A.D. *Contribuição ao estudo químico das espécies vegetais Palicourea rigida e Palicourea coriacea e avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e moluscicida de Palicourea rigida.*, in *Departamento de Química*. 2009, Universidade Estadual de Maringá: Maringá. p. 216.
8. Micovic, V.M. and R. Robinson,. *The constitution of brazilein.* Journal of the Chemical Society, 1937. p. 43-46.
9. Hendrickson, J.B. *The molecules of nature,* 1965. Available from: http://quiprona.wordpress.com/2009/10/12/a-ciencia-de-produtos-naturais/.
10. Cechinel Filho, V. and R.A. Yunes,. *Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade.* Química Nova, 1998. **21**(1): p. 99-105.

11. Wall, M.E., et al. *Plant Antitumor Agents. I. Isolation and Structure of Camptothecin a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from Camptotheca Acuminata.* Journal of the American Chemical Society, 1966. **88**(16): p. 3888-3890.
12. Gold, P.E., L. Cahill, and G.L. Wenk,. *Ginkgo biloba: A cognitive enhancer?* Psychological Science, 2002. p. 2-11.
13. Barreiro, E.J. and C.A.M. Fraga,. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*, 2008. Artmed.
14. Strege, M.A. *High-performance liquid chromatographic electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening.* Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1999. **725**(1): p. 67-78.
15. Dewick, P.M. *The biosynthesis of C-5-C-25 terpenoid compounds.* Natural Product Reports, 1997. **14**(2): p. 111-144.
16. Costa-Lotufo, L.V., et al. *Marine organisms as a source of new pharmaceuticals: history and perspectives.* Química Nova, 2009. **32**(3): p. 703-716.
17. Montanari, C.A. and V.S. Bolzani,. *Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais.* Química Nova, 2001. **24**: p. 105-111.
18. Newman, D.J. *Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery?* Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **51**(9): p. 2589-2599.
19. Schmidt, B.M., et al. *Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics.* Nature Chemical Biology, 2007. **3**(7): p. 360-366.
20. Newman, D.J. and G.M. Cragg,. *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.* Journal of Natural Products, 2007. **70**(3): p. 461-477.
21. Farias, F.M. *Psychotria myriantha müll arg. (rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiquimiotáxica e sobre o sistema nervoso central,* 2006.
22. Inouye, H., et al. *Studies on Monoterpene Glucosides and Related Natural-Products .61. Chemotaxonomic Studies of Rubiaceous Plants Containing Iridoid Glycosides.* Phytochemistry, 1988. **27**(8): p. 2591-2598.
23. Pereira, G.F. *A família Rubiaceae Juss. na vegetação ripária de um trecho do alto rio Paraná, Brasil, com ênfase na tribo spermacoceae, in Departamento de Biologia,* 2007. Universidade estadual de Maringá, Maringá. p. 68.
24. Mongrand, S., et al. *Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition.* Phytochemistry, 2005. **66**(5): p. 549-559.

25. Adolpho L. O., et al. *Atividade antimicrobiana e antioxidante das frações de Richardia brasiliensis Gomes (Rubiaceae),* 2006, XIV Jornada de Jovens Pesquisadores do AUGM.
26. Coelho, V.P.M., M.F. Agra, and M.R.V. Barbosa,. *Estudo farmacobotânico das folhas de Tocoyena formosa (Cham. & Schltdl.) K. Schum.(Rubiaceae); Pharmacobotanical study of the leaves of Tocoyena formosa (Cham. & Schltdl.) K. Schum.(Rubiaceae).* Rev. bras. farmacogn, 2006. **16**(2): p. 170-177.
27. Agra, M.F., P.F. Freitas, and J.M. Barbosa-Filho,. *Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil.* Revista Brasileira de Farmacognosia, 2007. **17**(1): p. 114-140.
28. Pinto, D.S., et al., *Secondary metabolites isolated from Richardia brasiliensis Gomes (Rubiaceae).* Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2008. **18**(3): p. 367-372.
29. Robbrecht, E. *Tropical woody Rubiaceae*. Opera Botanica Belgica, 1988. **1**, 1-271.
30. Delprete, P.G. *Sinopse dos gêneros de Rubiaceae do Brasil*. 49º Congresso Nacional de Botânica, 1998. 85-86.
31. Bolzani V. S., et al. *Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species: Chemotaxonomical and biological significance*. Recent Res Devel Phytochem, 2001. **5**, 19-31.
32. Oliveira, P.L. *Contribuição ao estudo de espécies da família rubiaceae: fitoquímica da espécie amaioua guianensis aulb*., 2009. Universidade Federal de Goiás.
33. Dourado, R.S. *Isolamento de compostos secundários em extratos de caules e folhas de Hypericum cordatum (Vell. Conc.) N. Robson (Clusiaceae)*, in *Instituto de Botânica de São Paulo*, 2006. São Paulo.
34. Gottlieb, O.R., M. Kaplan, A., and M.R. Borin,. *Biodiversidade um Enfoque Quimio-biológico*, 1996. Rio de Janeiro: UERJ.
35. Cronquist, A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants: 1-1262*, 1981. Columbia University Press, New York.
36. Carbonezi, C.A., et al. *Determinação por RMN das configurações relativas e conformações de alcalóides oxindólicos isolados de Uncaria guianensis.* Química Nova, 2004. **27**(6): p. 878-881.
37. Hamerski, L., et al. *Saponinas triterpênicas de Tocoyena brasiliensis Mart.(Rubiaceae).* Química Nova, 2005. **28**(4): p. 601.
38. Silva, V.C., et al. *Isolation of lignans glycosides from Alibertia sessilis (Vell.) K. Schum.(Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography.* Eclética Química, 2006. **31**(4): p. 55-58.

39. Alam M. A., et al. *Antidiarrhoeal property of the hydroethanolic extract of the flowering tops of Anthocephalus cadamba.* Rev Bras Farmacogn, 2008. **18**: p. 155-159.
40. Cardoso, C.L., et al. *Indole monoterpene alkaloids from Chimarrhis turbinata DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family.* Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008. **18**(1): p. 26-29.
41. Delprete, P.G., et al. *Chemotaxonomy and macroclassification of Rubiaceae*. Third international rubiaceae conference rubiaceae, 2006. 28.
42. Faria, E.O. *Estudo Fitoquímico das folhas da espécie Psychotria prunifolia (Kunth) Steyerm (Rubiaceae)*. 2009, Universidade Federal de Goiás: Goiânia.
43. Porto, D.D. *Papel do alcalóide braquicerina na resposta ao estresse por radiação ultravioleta e dano mecânico em Psychotria brachyceras Müll Arg.*, in *Departamento de Botânica*. 2009, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre. p. 137.
44. Nepokroeff, M., B. Bremer, and K.J. Sytsma,. *Reorganization of the genus Psychotria and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data.* Systematic Botany, 1999. **24**(1): p. 5-27.
45. Davis, A.P., et al. *The typification and characterization of the genus Psychotria L. (Rubiaceae).* Botanical Journal of the Linnean Society, 2001. **135**(1): p. 35-42.
46. Farias, F.M., et al. *Strictosamide from Psychotria nuda (Cham. et Schltdl) Wawra (Rubiaceae).* Biochemical Systematics and Ecology, 2008. **36**(12): p. 919-920.
47. Lopes, S., et al. *Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae).* Biochemical Systematics and Ecology, 2004. **32**(12): p. 1187-1195.
48. Sakai, S. and S.J. Wright,. *Reproductive ecology of 21 coexisting Psychotria species (Rubiaceae): when is heterostyly lost?* Biological Journal of the Linnean Society, 2008. **93**(1): p. 125-134.
49. Petit, E. *Les espèces africaines du genre Psychotria L.(Rubiaceae): II.* Bulletin du Jardin botanique de l'État a Bruxelles, 1966. **36**(1): p. 65-144.
50. Steyermark, J.A. *The Botany of the Guayana Higlands.* Mem. New York Bot. Gard., 1972. **23**: p. 227-832.
51. Both, F.L., et al. *Analgesic properties of umbellatine from Psychotria umbellata.* Pharmaceutical Biology, 2002. **40**(5): p. 336-341.

52. Kerber, V.A., et al. *Psychollatine, a glucosidic monoterpene indole alkaloid from Psychotria umbellata.* Journal of Natural Products, 2008. **71**(4): p. 697-700.
53. Simoes-Pires, C.A., et al. *Indole monoterpenes with antichemotactic activity from Psychotria myriantha: Chemotaxonomic significance.* Natural Product Communications, 2006. **1**(12): p. 1101-1106.
54. Kerber, V.A., et al. *Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from Psychotria brachyceras.* Journal of Natural Products, 2001. **64**(5): p. 677-679.
55. Van De Santos, L., et al. *Indole monoterpene alkaloids from leaves of Psychotria suterella Mull. Arg. (Rubiaceae).* Biochemical Systematics and Ecology, 2001. **29**(11): p. 1185-1187.
56. Henriques, A.T., et al. *N,beta-D-glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of Psychotria leiocarpa.* Phytochemistry, 2004. **65**(4): p. 449-454.
57. Pimenta, A.T.A., et al. *Structure elucidation and NMR assignments of two unusual monoterpene indole alkaloids from Psychotria stachyoides.* Magnetic Resonance in Chemistry, 2010. **48**(9): p. 734-737.
58. Kerber, V.A., et al. *Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from Psychotria brachyceras.* Journal of Natural Products, 2003. **66**(7): p. 1038-1038.
59. Adjibadé, Y. *Pharmacognosie du Psychotria forsteriana A. Gray (Rubiaceae). Aspects Botanique, Chimique et essais pharmacologiques preliminares*. 1989, Universite Louis Pasteur de Strasbourg: Paris.
60. Mckenna, D.J., G.H.N. Towers, and F. Abbott,. *Monoamine-Oxidase Inhibitors in South-American Hallucinogenic Plants - Tryptamine and Beta-Carboline Constituents of Ayahuasca.* Journal of Ethnopharmacology, 1984. **10**(2): p. 195-223.
61. Liwszyc, G.E., et al. *Daime - a Ritual Herbal Potion.* Journal of Ethnopharmacology, 1992. **36**(1): p. 91-92.
62. Both, F.L. *Avaliação do perfil psicofarmacológico de psicolatina isolada de Psychotria umbellata (Rubiaceae)*, in *Ciências Farmacêuticas*. 2005, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre.
63. Lopes, S.O., P.R.H. Moreno, and A.T. Henriques,. *Growth characteristics and chemical analysis of Psychotria carthagenensis cell suspension cultures.* Enzyme and Microbial Technology, 2000. **26**(2-4): p. 259-264.
64. Klein, R.M., A. Reis, and O.B. Iza,. *Observações Ecológicas*, in *Flora Ilustrada Catarinense*. 2005: Itajaí. p. 542-549.

65. Delprete, P.G., L.B. Smith, and R.M. Klein,. *Rubiaceae.* Flora Ilustrada Catarinense, 2005. **I**: p. 542-549.
66. Vitarelli, N.C. and M. Santos,. *Anatomia de estípulas e coléteres de Psychotria carthagenensis Jacq.(Rubiaceae).* Acta Botanica Brasilica, 2009. **23**: p. 923-928.
67. Rivier, L. and J.E. Lindgren,. *Ayahuasca, the South American hallucinogenic drink: an ethnobotanical and chemical investigation.* Economy Botany, 1972. **26**: p. 101-129.
68. Leal, M.B. and E. Elisabetsky,. *Absence of alkaloids in Psychotria carthagenensis Jacq (Rubiaceae).* Journal of Ethnopharmacology, 1996. **54**(1): p. 37-40.
69. Lopes, W.A. and M. Fascio,. *Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho.* Química Nova, 2004. **27**(4): p. 670-673.
70. Oliveira, G.M. *Atividade queratinolítica de uma cepa de streptomyces sp isolada de um abatedouro de aves*. 2006, Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
71. Benavides, D.J.L. *Metabólitos Secundários de Strepetomyces clavuligerus ATCC 27064 e fungos endofíticos filamentosos*, in *Química*. 2008, Universidade Federal de São Carlos: São Carlos.
72. Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker,. *Bactérias gram-positivas filamentosas, com alto conteúdo de GC: Streptomyces e outros actinomicetos.* Microbiologia de Brock, 2004: p. 394-398.
73. Hokka, C.O., et al. *Produção de antibióticos beta-lactâmicos por Streptomices sp. em escala de bancada*, 2010. 16.03.2011]; Available from: http://www.racine.com.br/portal-racine/setor-industrial/manufatura/producao-de-antibioticos-beta-lactamicos-por-streptomyces-sp-em-escala-de-bancada.
74. Elander, R.P. *Industrial production of beta-lactam antibiotics.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2003. **61**(5-6): p. 385-392.
75. Brown, A.G., et al. *Naturally-Occurring Beta-Lactamase Inhibitors with Antibacterial Activity.* Journal of Antibiotics, 1976. **29**(6): p. 668-669.
76. Reading, C. and M. Cole,. *Clavulanic Acid - Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from Streptomyces-Clavuligerus.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1977. **11**(5): p. 852-857.
77. Ikeda, H., et al. *Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis.* Nature biotechnology, 2003. **21**(5): p. 526-531.
78. Martinez, A.F.C. *Aplicação da Espectrometria de Massas na Derreplicação de Extratos Brutos Produzidos por Actinobactérias*

Isoladas da Rizosfera do Milho (Zea mays L.), in *Química*. 2009, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto. p. 132.
79. Cunha, P.M.F. *Cuidadores Informais de Doentes de Alzheimer: sobrecarga física, emocional e social e psicopatologia*, in *Ciências Biomédicas*. 2011, Universidade do Porto. p. 204.
80. Touchon, J. and F. Portet,. *Guia prático da doença de Alzheimer*, 2002.
81. Belina, N. *A Demência em números*. A doença de Alzheimer e outras demências em Portugal, 2005.
82. *Alzheimer: a grande epidemia*. Available from: http://www.cuidardeidosos.com.br/alzheimer-a-grande-epidemia/, 2011.
83. *Alzheimer - Veja esses números!* Available from: http://www.cuidardeidosos.com.br/alzheimer-veja-esses-numeros/, 2011.
84. Balsemão, M. *Mal de Alzheimer atinge cerca de 1 milhão de idosos no Brasil*. Available from: http://www.clesio.net/cn/index.php/revista/2010/12/09/mal-de-alzheimer-atinge-1-milhao-de-idosos-no-pais, 2011.
85. Barbosa Filho, J.M., et al. *Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase.* Revista Brasileira de Farmacognosia, 2006. **16**: p. 258-285.
86. Holmstedt, B. *Cholinesterase inhibitors: an introduction*. Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. 2000, London: Martin Dunitz. 270.
87. Giacobini, E. *Cholinesterase inhibitors: from the Calabar bean to Alzheimer therapy*. Cholinesterases and cholinesterase inhibitors, ed. E. Giaconini. 2000, Switzerland: Martin Dunitz. 270.
88. Greenblatt, H.M., et al. *Acetylcholinesterase - A multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease.* Journal of Molecular Neuroscience, 2003. **20**(3): p. 369-383.
89. Gomes, A.M. and R. Koszuoski,. *Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular.* Rev Psiquiatr, 2005. **27**(2): p. 197-205.
90. 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, 2001. **915**(1-2): p. 217-223.
91. Trevisan, M.T.S., et al. *Seleção de plantas com atividade anticolinasterase para tratamento da doença de Alzheimer.* Química Nova, 2003. **26**(3): p. 301-304.

92. Heinrich, M. and H.L. Teoh,. *Galanthamine from snowdrop - the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge.* Journal of Ethnopharmacology, 2004. **92**(2-3): p. 147-162.
93. Sweeney, J.E., P.S. Puttfarcken, and J.T. Coyle,. *Galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor - a time course of the effects on performance and neurochemical parameters in mice.* Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1989. **34**(1): p. 129-137.
94. Thomsen, T. and H. Kewitz,. *Selective-inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine invitro and invivo.* Life Sciences, 1990. **46**(21): p. 1553-1558.
95. Tang, X.C., et al. *Effect of Huperzine-a, a New Cholinesterase Inhibitor, on the Central Cholinergic System of the Rat.* Journal of Neuroscience Research, 1989. **24**(2): p. 276-285.
96. Stadler, I. *Oxigen consumption methodos: xanthine oxidase and lipoxygenase.* Humana Press., 2002. **108**: p. 3-14.
97. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge,. *Role of free radical and catalytic metal irons in human disease: an overview.* Met. Enzymol., 1990. **186**: p. 1-85.
98. Zhao, B., S.M. Moochhala, and S.Y. Tham,. *Biologically active components of Physostigma venenosum.* Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2004. **812**(1-2): p. 183-192.
99. Cuzzocrea, S., et al. *Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury.* Pharmacological Reviews, 2001. **53**(1): p. 135-159.
100. Mattos, T.C.G.D. *Mecanismos da ação atioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro*, in *Química*. 2009, Universidade de Brasília: Brasília. p. 206.
101. Galvão, A.L.B. *Estresse oxidativo nos estágios finais da doença renal crônica em pequenos animais.* Archives of Veterinary Science, 2010. **14**(3).
102. Sousa, C.M.M., et al. *Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.* Química Nova, 2007. **30**(2): p. 351-355.
103. Bonita, J.S., et al. *Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies.* Pharmacological Research, 2007. **55**(3): p. 187-198.
104. Meyer, B.N., et al. *Brine Shrimp - a Convenient General Bioassay for Active-Plant Constituents.* Planta Medica, 1982. **45**(1): p. 31-34.
105. Ellman, G.L., et al. *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.* Biochemical Pharmacology, 1961. **7**: p. 88-95.

106. Rhee, I.K., R.M. van Rijn, and R. Verpoorte,. *Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography.* Phytochemical Analysis, 2003. **14**(3): p. 127-131.
107. Marston, A., J. Kissling, and K. Hostettmann,. *A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants.* Phytochemical Analysis, 2002. **13**(1): p. 51-54.
108. Rice-evans, C.A., et al. *The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids.* Free Radical Research, 1995. **22**(4): p. 375-383.
109. Oliveira, A.C., et al. *Fontes vegetais naturais de antioxidantes.* Química Nova, 2009. **32**(3): p. 689-702.
110. Harbone, J.B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.* Chapman and Hall, 1984. **2**: p. 55-136.
111. Zeraik, M.L. and J.H. Yariwake,. *Quantification of isoorientin and total flavonoids in Passiflora edulis fruit pulp by HPLC-UV/DAD.* Microchemical Journal, 2010. **96**(1): p. 86-91.
112. Duarte-Almeida, J.M., et al., *Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH.* Ciênc. Tecnol. Aliment., 2006.
113. Cardoso, C.L., et al. *Development and characterization of an immobilized enzyme reactor (IMER) based on human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies.* Journal of Chromatography A, 2006. **1120**(1-2): p. 151-157.
114. Cardoso, C.L., et al. *The development of an immobilized enzyme reactor containing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi: the effect of species specific differences on the immobilization.* Analyst, 2008. **133**(1): p. 93-99.
115. Silva, J.I. *Acetilcolinesterase imobilizada em capilares de sílica fundida: novo formato para triagem de inibidores seletivos*, in *Departamento de Química*. 2011, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto.
116. Pratt, D.E. and E.E. Miller,. *A Flavonoid Antioxidant in Spanish Peanuts (Arachia-Hypogoea).* Journal of the American Oil Chemists Society, 1984. **61**(6): p. 1064-1067.
117. Riston, J.R. *Estudos visando à síntese estereosseletiva do alcalóide 275A*, in *Química Orgânica*. 2006, Universidade Estadual de Campinas Campinas. p. 216.

118. Rates, S.M.K., et al. *Alcalóides indólicos em Peschiera australis (Muell. Arg.) Miers. var. australis.* Caderno de farmácia. Porto Alegre, RS, 1988. **4**, p. 51-62.
119. Wagner, H., S. Bladt, and E.M. Zgainski,. *Plant and drug analysis*. 1984: Springer-Verlag.
120. Gunstone, F.D. and M. Lie Ken Jie,. *Fatty acids. 24. Synthesis of ten octadecadiynoic acids and of the related cis,cis- and trans,trans-Octadecadienoic acids* Chemistry and Physics of Lipids, 1970. **4**(1): p. 1-14.
121. Gunstone, F.D., M. Lie Ken Jie, and R.T. Wall,. *Fatty acids. 23. Nuclear magnetic resonance spectra of some octadecadiynoic acids and of some methyl cis, cis- and trans, trans-octadecadienoates.* Chemistry and Physics of Lipids, 1969. **3**(4): p. 297-303.
122. Pouchert, C.J. *The Aldrich Library of NMR Spectra*, 1983. p. 361.
123. Stephen, H., Journal of the American Chemical Society, 1995. **127**: p. 1874.
124. Burdock, G.A. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. II, CRC Press: Boca Raton, FL, 1995. p. 585.
125. Hurd, L.E., et al. First identification of a putative sex pheromone in a praying mantid. J. Chem. Ecol., 2004. **30**: p. 155-166.
126. [cited 2011 20/08]; Available from: http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search/results.do?id=1623331&props=&struct=start&disp=&si=.
127. Cardoso, C.L., et al. *The Absolute Configuration of 1-(3',4'-Dihydroxycinnamoyl) cyclopentane-2,3-diol from the Amazonian Tree Chimarrhis turbinata.* Journal of Natural Products, 2006. **69**: p. 1046-1050.
128. Li, X.C., et al. *Acetylenic Acids Inhibiting Azole-Resistant Candida a lbicans from Pentagonia g igantifolia.* Journal of Natural Products, 2003. **66**(8): p. 1132-1135.
129. Lumb, P.B. and J.C. Smith,. *Higher aliphatic compounds. Part X. A synthesis of tariric and petroselinic acids.* J. Chem. Soc., 1952: p. 5032-5035.
130. Schlittler, E. and U. Spitaler,. *On the contents of schumanniophyton problematicum (rubiaceae).* Tetrahedron Letters, 1978. **19**(32): p. 2911-2914.
131. Klausmeyer, P., et al. *Identification of a new natural camptothecin analogue in targeted screening for HIF-1alpha inhibitors.* Planta Med., 2007. **73**: p. 49-52.
132. Zhou, H., et al. *Indole Alkaloids from the Leaves of Anthocephalus chinensis.* Helvetica Chimica Acta, 2008. **91**(11): p. 2148-2152.

133. Ponglux, D., et al. *Structure and synthesis of two new types of oxindole alkaloids found from uncaria salaccensis.* Chem. Pharm. Bull., 1990. **38**: p. 573-575.
134. Pham, V.C., et al. *Myrioneurinol: a novel alkaloid skeleton from Myrioneuron nutans.* Tetrahedron, 2007. **63**(46): p. 11244-11249.

ANEXOS

Tabela 1: Resultado da triagem inicial pontual com DPPH e Ellman dos extratos de micro-organismos.

Nº	Extratos	DPPH	Ellman
1	107 21 CL	-	-
2	29NPDC-1CL	-	-
3	5ASM-1	-	++
4	1BG-11CL	-	-
5	109339- CL	-	-
6	97 BGCL	-	-
7	111ASM1CL	-	-
8	92AACL	-	-
9	135339	-	-
10	215NPDF-2CL	-	-
11	71NPDC-1	-	-
12	142777-CL	-	X
13	213NPDF- 2cel.	-	-
14	206NPRG-1CL	-	++
15	123 759 CL	-	-
16	209 E1-CL	-	-
17	220 AA- CL	-	-
18	204NPRG-1cel	-	-
19	192 Rhiz.070-CL	-	X
20	120ASMAE	-	X
21	152782- CL	-	+
22	161804- CL	-	-
23	90 19- CL	-	-
24	143777- cel.	-	X
25	130 33- CL	-	-
26	132 64 Microc.CL	-	X
27	145484- CL	-	X
28	137NPDC-1(3L)CL	-	X
29	121ASMCL	-	-
30	146484-cel	-	X
31	122759-cel	-	-
32	1837942Glicerol AE	-	X
33	9464cél	-	-
34	187NPLJ-4AE	-	X
35	1867942- AE pH1	-	X
36	177 NPDC-1tempo AE	-	-
37	176 61- CL	-	-
38	1857942AE	-	X
39	1847942 glicerol AE	-	X
40	164584-CL	-	X
41	179NPDC-1 30d AE	-	X
42	1827942AE	-	X
43	180 NPDC-1 (30d) AE	-	X
44	16863-Fish cél.	-	-

Continua

Nº	Extratos	DPPH	Ellman
Continuação			
45	167NPLJ-4CL	-	-
46	165NPLJ-4cél.	-	++
47	166NPLJ-4AE	-	X
48	158 767 CL	-	-
49	190Rhiz.070-AE	-	X
50	FR-19	X	-
51	189 Rhiz. 18 AE	-	X
52	17461-cél.	-	-
53	17362 pinga CL	-	X
54	141777- AE	-	X
55	127 64- microc. cél.	-	X
56	160804- AE	-	X
57	151782- AE	-	X
58	377932 paeinoculo	-	X
59	144484- AE	-	X
60	196626 Rhiz. solos CL	-	X
61	197 AE	-	X
62	218 BG- CL	-	++
63	102339 cél.	-	X
64	140 NPLJ 4 CL	-	X
65	148 570-CL	-	X
66	155 76- CL	-	X
67	194 Rhiz. GPCL	-	X
68	175 61- AE	-	++
69	747942AE 30d	-	X
70	188NPLJ-4AE	-	X
71	112ASM 1AE	-	X
72	1316- Microc. AE	-	X
73	Sara (MeOH)	-	X
74	5B 5763 DMSO	-	X
75	5B73-83	-	-
76	6B 5dias	-	-
77	Fr.-08	X	X
78	1B 5dias	-	-
79	5B 10dias DMSO	-	+
80	5B TSB	-	+
81	5B- 15dias DMSO	-	++
82	13(7PL)	X	-
83	5B aveia	-	X
84	5B 24dias	-	X
85	5B quinua	-	X
86	5B 5dias	-	+
87	5B 11dias	-	-
88	3B 12dias MeOH	-	X
89	3B 11dias	+	+
90	2B 5dias	-	-

Continua

Nº	Extratos	DPPH	Ellman
Continuação			
91	3oct. iso.acetato	-	X
92	S.Rolfsii 5dias sais DMSO	-	X
93	S.Rolfsii BD DMSO	-	X
94	1B 11dias	-	-
95	2B 11dias	-	-
96	Guaco	X	+
97	Sc. Aq. C. oxisporium	X	-
98	Mikanólido DMSO	-	-
99	20	X	-
100	Bac. Isol. Ferment.3	+	X
101	Cladosp. oxisporium	X	++
102	Atrazina DMSO	-	X
103	Aquoso	X	-
104	26	X	-
105	Sclerotina Ferm. 20d	X	-
106	Sclerotina 15	X	-
107	Guaco	-	++
108	Bacteria isol.2	X	+
109	Mikanólido Dudu	-	-
110	Pitanga folha	-	X
111	S.Rolfsii Exudado	X	-
112	Fermen.Sclerotina20	X	-
113	Sc.aq.extr.B.pimentão	X	-
114	Sclerotina 10d s/agitar	X	-
115	Ferment. P.	X	-
116	Sclerotina 20d	X	-
117	Sc.aq s/ agitação	X	+
118	Bact.isol. acetato	X	-
119	Ferment S.Rolfsii	X	-
120	Sc.aq.Rolfsi	X	-
121	MCPA DMSO	-	-
122	ASBV-1-Tiago	+	-
123	Bac.Pimentão ferment.	X	-
124	Sc.aq. B. iso.	X	-
125	Ferment. Sclerotina	X	-
126	Extrato Pitanga 2	-	X
127	Fungo Pimentão	X	+
128	Ferment. Bac.Pim. Fungada	X	-
129	Sc. Aq. F. Pim.	X	-
130	µCPA	-	X
131	Sc.Aq. sclerot.20d	X	-
132	11RAC 30 Sara	-	++
133	Alendronat dia	-	-
134	2,4D DMSO	-	-
135	Extrato Bruto	-	+
136	Extrato Pitanga 1	-	-

Continua

Nº	Extratos	DPPH	Ellman
Continuação			
137	01 Ana	-	-
138	02 Ana	-	X
139	03 Ana	-	-
140	04 Ana	+	-
141	05 Ana	-	-
142	06 Ana	-	+
143	07 Ana	-	+
144	08 Ana	-	+
145	09 Ana	-	-
146	10 Ana	-	-
147	11 Ana	+	-
148	12 Ana	-	-
149	13 Ana	+	+
150	14 Ana	-	-
151	15 Ana	-	+
152	16 Ana	+	-
153	17 Ana	-	-
154	18 Ana	-	-
155	19 Ana	-	-
156	20 Ana	-	-
157	21 Ana	+	-
158	22 Ana	-	-
159	23 Ana	-	-
160	24 Ana	-	++
161	25 Ana	-	-
162	26 Ana	-	-
163	27 Ana	+	-
164	28 Ana	-	-
165	29 Ana	-	-
166	30 Ana	+	-
167	31 Ana	+	-
168	32 Ana	-	-
169	33 Ana	-	-
170	34 Ana	-	-
171	35 Ana	-	++
172	36 Ana	-	++
173	37 Ana	-	-
174	38 Ana	-	-
175	39 Ana	-	-
176	40 Ana	-	+
177	41 Ana	-	++
178	42 Ana	-	-
179	43 Ana	-	+
180	44 Ana	-	+
181	45 Ana	-	+
182	46 Ana	-	-
183	47 Ana	-	-

Continua

Nº	Extratos	DPPH	Ellman
Continuação			
184	48 Ana	-	++
185	49 Ana	+	-
186	50 Ana	-	+
187	51 Ana	-	++
188	52 Ana	+	-
189	53 Ana	-	-
190	54 Ana	-	-
191	Bac. Pimentão	-	-
192	Rolfsii	+	X
193	Scleratina	-	X
194	Enudato	-	X
195	Sc. Aq. Bac.Pim.	X	-
196	55	X	-
197	Rolfsii	-	X
198	Rolfsii 150com	-	-
199	Rolfsii 50com	-	X
200	Rolfsii 150sem	-	++
201	Rolfsii 300com	-	X
202	Rolfsii 300sem	-	X
203	Rolfsii 1,2160	+	-
204	56	X	-
205	Arroz actino 36(50PL)	-	X
206	Canjica Branca actino 36(50PL)	-	X
207	Canjica Amarela actino 36 (50PL)	++	X
208	Soja actino 36 (50PL)	-	X
209	Aveia actino36 (50PL)	-	X
210	Actino 49 (13PL)	++	X
211	Pitanga 1	-	-
212	Pitanga 2	-	-
213	Pitanga 3	-	-
214	Pitanga 4	-	-
215	Pitanga 5	-	-
216	Pitanga 6	-	-
217	Pitanga 7	-	-
218	Pitanga 80	-	-
219	Pitanga 9	-	-
220	Pitanga 10	-	-
221	Pitanga 11	-	-
222	Pitanga 12	-	-
223	Pitanga 13	-	-
224	57	X	-
225	15	X	-
226	Extr. S.8 MeOH	X	-
227	11	X	-
228	FR-2	X	++
229	MGE – 26A	X	-
230	MGE – 31	X	-

Continua

Nº	Extratos	DPPH	Ellman
Continuação			
231	MM2R -2	X	-
232	L–3–IDAC10 MM2R	X	-
233	R-2–9	X	-
234	AMC	X	-
235	22bMM2R	X	-
236	MMZA–2	X	-
237	MGE 45	X	-
238	R-2-4	X	-
239	A–1–9	X	-
240	MM3R–2	X	+
241	L–3–13	X	-
242	AERC- 1	X	-
243	R–3–11	X	-
244	AMB23	X	-
245	MSC433	X	-
246	MGE31C	X	-
247	MGE31A	X	-
248	MRGZ – A	X	+
249	MSC 334	X	-
250	MSC39	X	-
251	MSC426	X	-
252	38Actino	X	-
253	1 actino	X	+
254	A2521C	X	-
255	M R6–2-C	X	-
256	MMA–3-1	X	-
257	R–2-7	X	-
258	MGE30a	X	-
259	MR8-3–A	X	+
260	Actino8	X	-
261	A2521–A	X	-
262	MR11AS	X	+
263	MR8–3C	X	-
264	MGE30C	X	-
265	11 1,2256	X	-
266	1Actino DMSO	X	+
267	MR 11 5A C	X	+
268	MGE- 26 A	X	-
269	MGE–31Ac	X	-
270	MGE–30C	X	-
271	A2521 – C	X	-
272	MGE31 Cc	X	-
273	MRG-2A c	X	+
274	A2521–Ac	X	-
275	MGE 30 A	X	-
276	MR6–2–CC	X	+
277	MRB–3A C	X	+

Continua

Nº	Extratos	DPPH	Ellman
Continuação			
278	MR8–3–CC	X	+
279	Actino 8	X	-
280	38 actino	X	+
281	MSC408	X	-
282	MMA–3	X	-
283	R–2-17	X	-
284	AMC26	X	+
285	AMC39	X	-
286	L–3–10A159	X	-
287	AMC25	X	-
288	AMC16	X	-
289	AMC41	X	-
290	AMC23	X	-
291	MM2R–21R	X	-
292	AMC24	X	-
293	MSC463	X	-
294	MMA–4	X	-
295	AMC40	X	-
296	MM2A-3	X	-
297	L–3–24	X	-
298	MMA-2	X	-
299	L–2-6	X	+
300	13(7PL) conc.	X	-
301	13(7PL)	X	-
302	Actino14 feijão bco	X	+
303	Actino14 soja	X	+
304	Actino14amendoim bco	X	++
305	Actino14 trigo grosso	X	+
306	Actino 14 trigo grão	X	-
307	Actino 14 canjica	X	-
308	Actino 14 arroz	X	-
309	Fr-23	X	++
310	64microc AE	X	-
311	Microc. Cél.	X	-
312	Rhiz.soloCl	X	-
313	Rhiz.solo 6PCL	X	-
314	Rhiz. solo 18 CL	X	-
315	Rhiz. 070-AE	X	-
316	339 cél.	X	-
317	Fr.-05	X	-
318	Rhiz. solo 5	X	-
319	MMS AE	X	++
320	NPLJ4 CL	X	-
321	62F.pinga CL	X	-
322	777 AE	X	-
323	804 AE	X	-
324	7942AE30d	X	-

Continua

Nº	Extratos	DPPH	Ellman
Conclusão			
325	7942AE tempo 9	X	-
326	782- AE	X	-
327	7942 glicerolAE	X	-
328	484 – AE	X	-
329	76 CL	X	-
330	7932Pré-Inóculo CL	X	-
331	570 CL	X	-
332	NPDC-1 30dAE	X	-
333	60Fish célula	X	-
334	ASM 1AE64	X	-
335	NPLJ- AE	X	-
336	NPLV-4	X	-
337	BG 11 AE	X	-
338	64 AE	X	-
339	33 AE	X	-
340	19 AE	X	-
341	702 AE	X	-
342	767 AE	X	+
343	AAAE	X	-
344	570 AE	X	-
345	759AC	X	-
346	570 cél.	X	-
347	NPDCHAE	X	-
348	NPDC–1AG	X	++
349	804 cél.	X	-
350	B-24d	X	+
351	Ext.S. MEOH	X	++
352	Sact.Isol. Acetato	X	++
353	S.Rolfsii 5d.sais DMSO	X	++
354	5B-17dias	X	++
355	Fr.-1	X	-
356	Fr.-20	X	+
357	Fr.-27	X	+
358	ExtratoS.20	X	-
359	T-4	X	-
360	Actino 18	X	-
361	IAA Z.N.	X	-
362	IAA	X	-
363	Amostra2	X	-
364	49 (13PL) 2	+	-
365	49 (13PL) 1	+	-

++ Boa atividade, + Pouca atividade, - Não apresenta atividade, X Não foi testado.

Tabela 2: Resultado do ensaio pontual com DPPH e Ellman da actinobactéria-36 (50PL) – 1ª fermentação.

Nº	Extratos (1ªf)	DPPH	Ellman
1	C1(1)	+	-
2	C1(2-9)	+	-
3	C1(10-95)	+	-
4	C1(96-149)	+	-
5	C1(150-163)	+	-
6	C2(1-14)	+	+
7	C2(15-23)	+	-
8	C2(24-34)	+	-
9	C2(35-109)	X	-
10	C2(110-174)	+	-
11	C2(175-188)	+	-
12	C2(189-193)	+	-
13	C2(194)	+	-
14	C3(7)	+	-
15	C3(8)	+	-
16	C3(9)	+	-
17	C3(10)	+	-
18	C3(11)	+	-
19	C3(12)	+	-
20	C3(13)	+	-
21	C3(14)	+	-
22	C3(15)	+	-
23	C3(16)	+	-
24	C3(17)	+	-
25	C3(18)	+	-
26	C3(19)	+	-
27	C3(20-27)	++	-
28	C3(28)	+	-
29	C3(29)	+	-
30	C3(30)	+	-
31	C3(31)	+	-
32	C4(5)	+	-
33	C4(6)	+	-
34	C4(7-9)	+	-
35	C4(10)	+	-
36	C4(11)	+	-
37	C4(12)	+	-
38	C4(13)	+	-
39	C4(14)	+	-
40	C4(15)	+	-
41	C4(16)	+	-
42	C4(17)	+	-
43	C4(18)	+	-
44	C4(19)	+	-
45	C4(20)	+	-
46	C4(21-29)	+	-

Continua

Nº	Extratos (1ªf)	DPPH	Ellman
Conclusão			
47	C4(30-34)	++	-
48	C4(35)	++	-
49	C4(36-44)	+	-
50	C4(45)	+	-
51	C4(46)	+	-
52	C4(47)	+	-
53	C4(48-57)	+	-
54	C4(58-70)	+	-

++ Boa atividade, + Pouca atividade, - Não apresenta atividade, X Não foi testado.

Tabela 3: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásicos da actinobactéria-36 (50PL) - 2ª fermentação.

Nº	Extrato	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	Massa (g)
1	Fr. $CHCl_3$-2ªf	+	+	-	+	0,0765
2	Fr. AcOEt-2ªf	-	-	-	+	0,1715
3	Fr. BuOH-2ªf	*	-	-	+	0,0849
4	Fr. H_2O-2ªf	-	+	-	-	0,0575
5	Fr.$CHCl_3$(aq)-2ªf	-	+	-	+	0,0452
6	Fr. AcOEt(aq)-2ªf	-	-	-	+	0,0210
7	Fr. BuOH(aq)-2ªf	*	+	-	+	0,0216
8	C2(1)-2ªf	++	+	++	++	0,0067
9	C2(2)-2ªf	++	+	++	++	0,0064
10	C2(3)-2ªf	-	+	++	++	0,0033
11	C2(4)-2ªf	-	-	++	+	0,0006
12	C2(5)-2ªf	-	-	++	++	0,0043
13	C2(6)-2ªf	-	-	++	++	0,0099
14	C2(7-8)-2ªf	-	-	+	++	0,0072
15	C2(9)-2ªf	-	-	-	+	0,0049
16	C2(10-11)-2ªf	-	-	-	+	0,0050
17	C2(12-13)-2ªf	-	-	-	+	0,0008
18	C2(14-18)-2ªf	-	-	-	+	0,0060
19	C2(19)-2ªf	*	-	-	+	0,0030
20	C2(20-21)-2ªf	*	-	-	-	0,0276
21	C2(23)-2ªf	*	-	+	-	0,0161

++ Boa atividade, + Pouca atividade, - Não apresenta atividade, X Não foi testado, * a cor da matriz está mascarando o resultado.

Tabela 4: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásicos dos extratos e frações das folhas e caules de *P. carthagenensis* – 1ª coleta.

Nº	Extrato (1ªc)	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	β-caroteno	Massa (g)
1	Bruto f	+	-	-	+	x	125,318
2	Fr. Hex f	+	x	-	+	-	8,1341
3	Fr. DCM f	-	x	-	+	*	5,2815
4	Fr. AcOEt f	-	-	*	+	+	44,6131
5	Fr. BuOH f	-	x	-	+	+	16,4499
6	Fr. H_2O f	-	x	-	-	-	5,0133
7	Bruto c	+	+	+	-	*	
8	Hex c	+	+	+	+	*	
9	DCM c	-	-	+	+	*	
10	AcOEt c	-	-	+	++	*	
11	BuOH c	-	-	-	+	*	
12	H2O c	+	+	-	+	*	

++ Boa atividade, + Pouca atividade, - Não apresenta atividade, X Não foi testado, * a cor da matriz está mascarando o resultado.

Tabela 5: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásico das subfrações de *P. carthagenensis* – 1ª coleta.

Nº	Extrato (1ªc)	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	β-caroteno	Massa (g)
1	C1(1)	++	-	+	++	+	0,1263
2	C1(2)	++	-	*	++	+	0,0500
3	C1(3)	++	+	+	++	+	0,0383
4	C1(4)	++	-	+	++	+	0,0108
5	C1(5-9)	++	-	*	+	+	0,0166
6	C1(10-11)	++	+	+	+	+	0,0504
7	C1(12)	++	+	*	+	+	0,0011
8	C1(13-18)	++	+	*	+	+	0,0316
9	C1(19)	++	+	-	-	+	0,0010
10	C1(20)	++	+	-	-	X	0,0009
11	C1(21-23)	++	+	-	-	X	0,0014
12	C1(24-27)	++	+	-	-	+	0,0003
13	C1(28)	-	+	-	-	+	0,0006
14	C1(29-36)	-	+	+	-	+	0,0008
15	C1(37-39)	+	+	+	-	+	0,0123
16	C1(40)	+	-	++	-	-	0,0039
17	HPLC(1)	+	-	-	X	X	

Continua

Nº	Extrato (1ªc)	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	β-caroteno	Massa (g)
Continuação							
18	HPLC(2)	+	-	+	X	X	
19	HPLC(3)	+	-	+	X	X	
20	HPLC(4)	-	-	-	X	X	
21	HPLC(5)	+	-	+	X	X	
22	HPLC(6)	+	-	-	X	X	
23	C3(1-3)	-	-	-	+	X	0,1555
24	C3(4-28)	+		-	+	X	1,3946
25	C3(29-37)	+	+	-	+	X	0,8240
26	C3(38-43)	++	+	-	+	X	0,8468
27	C3(44-68)	++	-	+	+	X	4,0212
28	C3(69-85)	++	+	+	+	X	1,1242
29	C3(86-102)	++	+	+	+	X	0,4445
30	C3(103-112)	++	+	+	+	X	0,1771
31	C3(113-116)	++	+	+	+	X	0,6654
32	C3(117)	-	+	-	-	X	0,8605
33	C4(1-4)	+	-	-	+	+	0,9857
34	C4(4-FH)	-	-	X	X	X	0,0167
35	C4(4-FA)	+	-	X	X	X	0,0436
36	C4(4-FM)	++	+	X	X	X	0,0201
37	C4(5-7)	+	X	-	+	+	0,016
38	C4(8)	+	X	-	+	+	0,0067
39	C4(9-12)	+	+	-	+	+	0,0175
40	C4(13-14)	+	+	-	+	+	0,0041
41	C4(15-17)	+	-	-	+	+	0,0173
42	C4(18)	+	-	-	+	-	0,0025
43	C4(19)	+	+	-	+	-	0,0038
44	C4(20-22)	+		-	+	+	0,0052
45	C4(23-25)	+	+	-	+	+	0,0015
46	C4(26-28)	+	+	-	+	+	0,0062
47	C4(29)	+	-	-	-	-	
48	SPE Hex	-	-	-	+	-	0,0700
49	SPE AcOEt	-	+	-	+	-	0,0404

Continua

Nº	Extrato (1ªc)	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	β-caroteno	Massa (g)
Continuação							
50	SPE MeOH	+	+	-	+	-	0,0096
51	SPE H_2O	+	-	+	-	-	0,0004
52	C5(1-2)	-	+	-	+	-	0,0363
53	C5(3-4)	+	+	-	+	-	0,0415
54	C5(5-9)	-	+	-	+	+	0,0445
55	C5(10)	+	+	-	+	+	0,0027
56	C5(11)	+	+	-	+	*	0,0029
57	C5(12-14)	*	+	-	+	*	0,0225
58	C5(15-19)	+	+	-	+	+	0,0830
59	C5(20)	+	+	-	+	+	0,0359
60	C5(21-24)	+	+	-	+	+	0,1811
61	C5(25-30)	+	+	-	+	+	0,4111
62	C5(31-32)	+	+	-	+	+	0,2088
63	C5(34-42)	+	+	+	+	+	0,7321
64	C5(43-45)	+	+	-	+	+	0,1271
65	C5(46-47)	+	+	-	+	-	0,0717
66	C5(48)	+	+	-	+	+	0,0259
67	C5(49-52)	+	+	+	+	+	0,0767
68	C5(53)	+	+	-	+	+	0,0113
69	C5(54-58)	+	+	-	+	+	0,0986
70	C5(59-60)	+	+	-	+	+	0,0965
71	C5(61-62)	+	+	-	+	+	0,0237
72	C5(63-64)	+	+	+	+	+	0,0359
73	C6(1)	+	X	*	-	X	0,0531
74	C6(1-FH)	+	-	-	X	X	0,0002
75	C6(1-FC)	++	-	+	X	X	0,0423
76	C6(1-FM)	++	-	+	X	X	0,2053
77	C6(2-5)	+	X	*	-	X	1,0310
78	C6(6-7)	*	X	+	-	X	0,1937
79	C6(6-7FH)	-	-	-	X	X	0,0215
80	C6(6-FA)	-	-	-	X	X	0,1484

Continua

Nº	Extrato (1ªc)	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	β-caroteno	Massa (g)
Continuação							
81	C6(8-11)	*	-	+	-	X	0,0085
82	C6(12-27)	*	-	+	-	X	0,0075
83	C6(28-34)	*	-	+	-	X	0,0025
84	C6(35)	-	-	-	-	X	0,0346
85	C7(1-5)	-	-	-	-	X	0,0017
86	C7(6-9)	-	-	+	-	X	0,0061
87	C7(10-17)	++	+	+	-	X	0,0345
88	C7(18-38)	++	+	++	-	X	0,1837
89	C7(39-54)	+	-	+	-	X	0,1002
90	C7(55-69)	+	-	-	-	X	0,0473
91	C7(70-75)	+	-	-	-	X	0,0095
92	C7(76-77)	+	-	-	-	X	0,0158
93	C7(78-82)	+	-	-	-	X	0,0245
94	C7(83)	+	-	-	-	X	0,0029
95	C7(84-93)	+	-	+	-	X	0,0463
96	C7(94-99)	+	-	+	-	X	0,0915
97	C7(100)	-	-	+	-	X	0,0393
98	C7(101-114)	+	-	+	-	X	0,0418
99	C7(115-121)	-	-	-	-	X	0,0077
100	C7(122)	+	-	-	-	X	0,1290
101	C7(122-FH)	*	-	-	X	X	0,0025
102	C7(122-FA)	+	-	-	X	X	0,0004
103	C7(122-FC)	-	-	-	X	X	0,0002
104	C7(122-FM)	+	-	-	X	X	0,0308
105	C7(122-cristais)	X	X	X	X	X	
106	C8(1)	-	X	-	-	X	0,0002
107	C8(2)	-	-	-	-	X	0,0001
108	C8(3)	+	+	+	-	X	0,0141

Continua

Nº	Extrato (1ªc)	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	β-caroteno	Massa (g)
Continuação							
109	C8(5-FH)	+	-	-	X	X	0,0001
110	C8(5-FC)	+	-	-	X	X	0,0115
111	C8(5-FA)	+	-	-	X	X	0,1949
112	C8(5-FM)	-	-	-	X	X	0,0046
113	C8(5-cristais)	X	X	X	X	X	
114	C8(6-FM)	-	-	-	X	X	0,0116
115	C8(6-cristais)	X	X	X	X	X	
116	C8(7)	+	-	-	-	X	0,0208
117	C8(8)	+	+	-	-	X	0,0533
118	C8(9)	+	-	-	-	X	0,0021
119	C8(10)	+	-	-	-	X	0,0516
120	C9(1-5)	+	-	-	+	X	0,0165
121	C9(6-8)	+	-	+	+	X	0,0380
122	C9(9-14)	+	-	-	+	X	0,1494
123	C9(15)	+	-	-	+	X	0,0103
124	C9(16-20)	-	-	-	+	X	0,1081
125	C9(21-28)	-	-	-	+	X	0,1449
126	C9(29-63)	-	-	-	+	X	1,0002
127	C9(64-67)	-	-	-	+	X	0,0053
128	C9(68-80)	-	-	-	+	X	0,4722
129	C9(81)	-	-	-	+	X	
130	C9(82)	-	-	-	+	X	0,1087
131	C9(83)	-	-	-	+	X	0,0616
132	C9(84)	-	-	-	+	X	
133	C9(85)	-	-	-	+	X	0,0925
134	C9(86)	-	-	-	+	X	0,0372
135	C9(87)	-	-	-	+	X	0,2854
136	C9(88-91)	-	-	-	+	X	1,4024
137	C9(92)	-	-	-	+	X	0,2887
138	C9(93)	+	-	+	+	X	0,0447
139	C9(94-96)	-	-	-	+	X	0,0700
140	C9(97)	-	-	-	+	X	0,0647
141	C9(98)	-	-	-	+	X	0,0430
142	C10(1-2)	+	-	+	+	X	0,0063
143	C10(3)	-	+	+	-	X	0,0713
144	C10(4)	+	+	+	-	X	0,2923
145	C10(5-7)	+	+	-	+	X	0,0713

Continua

Nº	Extrato (1ªc)	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	β-caroteno	Massa (g)
Continuação							
146	C10(8-10)	+	+	-	+	X	0,2456
147	C10(11-17)	+	+	-	+	X	0,1503
148	C10(18-20)	+	+	-	+	X	0,0917
149	C10(21-24)	-	-	-	+	X	0,0306
150	C10(25)	-	-	-	+	X	0,0089
151	C10(26-40)	+	+	-	+	X	0,01595
152	C10(41-42)	+	-	-	+	X	0,0056
153	C10(43-49)	-	-	-	+	X	0,0102
154	C10(49-52)	-	-	-	+	X	0,0074
155	C10(53)	+	+	-	+	X	0,0027
156	C10(54-74)	+	+	-	+	X	0,0512
157	C10(75-80)	+	-	-	+	X	0,0186
158	C10(81-82)	-	-	-	+	X	0,0034
159	C10(83-84)	-	-	-	+	X	0,0026
160	C10(85-88)	-	-	-	+	X	0,0063
161	C10(89-92)	-	-	-	+	X	0,0039
162	C10(93-94)	+	+	-	-	X	0,0010
163	C10(95)	+	-	-	-	X	0,0004
164	C10(96)	+	-	-	-	X	0,0036
165	C10(97)	-	-	-	-	X	0,0001
166	C10(98)	-	-	-	+	X	0,0073
167	C10(99)	-	-	-	+	X	0,0022
168	C10(100)	-	-	-	+	X	0,6296
169	C11(13-25)	-	-	-	-	*	
170	C11(26-38)	+	-	-	-	*	
171	C11(39-50)	++	+	-	-	*	
172	C11(51-62)	++	+	-	-	*	

Continua

Nº	Extrato (1ªc)	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	β-caroteno	Massa (g)
Conclusão							
173	C11(63-72)	++	+	++	-	*	
174	C11(73-83)	++	+	++	-	*	
175	C11(84-96)	++	+	++	-	*	
176	C11(97-108)	++	+	++	-	*	
177	C11(109-129)	++	-	++	-	*	
178	C11(130-151)	++	+	+	-	*	
179	C11(152-158)	++	+	+	-	*	
180	C11(159-165)	++	+	+	-	*	
181	C11(166-169)	++	+	+	-	*	
182	C11(170)	-	-	-	-	*	

++ Boa atividade, + Pouca atividade, - Não apresenta atividade, X Não foi testado, * a cor da matriz está mascarando o resultado.

Tabela 6: Porcentagem de inibição dos compostos testados no biorreator IMER-AChE na concentração de 200µg/mL.

Amostras	IMER AChE - % de inibição
Tacrina 200µM (inibidor padrão)	93,1
Galantamina 200µM (inibidor padrão)	75,1
C6(1)FM-1ªcf	20,0
C6(6)cristais-1ªcf	27,5
C7(122)cristais1ªcf	12,7
C8(5)FC-1ªcf	38,0
C8(6)cristais-1ªcf	20,3
C8(10)-1ªcf	8,3

Tabela 7: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásico dos extratos e frações de *P. carthagenensis* - 2ª coleta.

Nº	Extrato (2ªc)	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	Massa (g)
1	Alc. Sem.	+	-	+	*	0,0079
2	Alc. Caule	+	-	+	+	0,0035
3	Alc Folha	+	-	+	*	0,0072
4	Torta Sem.	-	-	-	*	1,3732
5	Torta Caule	-	-	-	+	
6	Torta Folha	-	-	-	-	13,7276
7	$CHCl_3$ Sem.	+	*	+	-	
8	$CHCl_3$ Caule	+	*	+	-	0,3069
9	$CHCl_3$ Folha	+	*	+	-	1,7417
10	Aq. Sem.	+	*	-	-	2,4796
11	Aq. Caule	+	*	-	-	5,3885
12	Aq. Folha	+	*	-	-	2,8575
13	EE Sem.	-	-	-	++	1,0717
14	EE Caule	-	-	-	++	1,0738
15	EE Folha	-	-	-	++	1,0725

++ Boa atividade, + Pouca atividade, - Não apresenta atividade, X Não foi testado.

Tabela 8: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásico dos extratos e frações de algumas espécies estudadas pelo grupo.

Nº	Amostra	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	β-caroteno
1	*S. adstringens* EtOH folha	-	-	-	++	*
2	*C. vernalis* EtOH folha	-	-	-	++	*
3	*A.Virgata* EtOH folha	+	+	+	+	*
4	*A. virgata* EtOH caule	-	X	X	+	*
5	*E. uniflora* EtOH folha	+	+	+	++	*
6	*T. roseoalba* flor (casa12) EtOH	-	-	+	+	*
7	*S. adstringens* Hex	-	-	X	*	X
8	*S. adstringens* EtOH	-	-	X	+	X
9	*A. coriacea* Hex	-	-	X	-	
10	*A. coriacea* EtOH	-	-	X	+	
11	*C. vernalis* Hex	-	-	+	*	
12	*C. vernalis* EtOH	-	-	X	+	
13	*S. lycocarpum* Hex	-	-	X	+	

Continua

Nº	Amostra	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	β-caroteno
Conclusão						
14	*S. lycocarpum* EtOH	-	-	X	+	
15	*H. impetiginosa* f Fr. Hex	-	-	X	*	
16	*H. impetiginosa* f Fr. DCM	-	-	X	*	
17	*H. impetiginosa* f Fr. AcOEt	-	-	X	+	
18	*H. impetiginosa* f Fr. BuOH	-	-	X	+	
19	*H. impetiginosa* f Fr. H_2O	-	-	X	-	
20	*H. impetiginosa* f Fr. MeOH	-	-	X	-	
21	*H. impetiginosa* f cristais	-	-	X	-	
22	*H. impetiginosa* c Fr. Hex	X	X	X	-	
23	*H. impetiginosa* c Fr. DCM	-	-	X	+	
24	*H. impetiginosa* c Fr. AcOEt	-	-	X	+	
25	*H. impetiginosa* c Fr. BuOH	-	-	X	+	
26	*H. impetiginosa* c Fr. H_2O	-	-	X	+	
27	*H. impetiginosa* c óleo	-	-	*	*	
28	*C. pachystachya* f Fr. Hex	-	-	*	*	
29	*C. pachystachya* f Fr. DCM	-	-	*	+	
30	*C. pachystachya* f Fr. AcOEt	-	-	*	+	
31	*C. pachystachya* f Fr. BuOH	-	-	*	+	
32	*C. pachystachya* c Fr. Hex	-	*	*	-	
33	*C. pachystachya* c Fr. AcOEt	-	-	*	+	
34	*C. pachystachya* c Fr. BuOH	-	-	*	+	
35	*C. pachystachya* c Fr. H_2O	-	-	*	-	

++ Boa atividade, + Pouca atividade, - Não apresenta atividade, X Não foi testado, * a cor da matriz está mascarando o resultado.

Tabela 9: Resultado dos ensaios antioxidante e anticolinesterásico de compostos e frações provenientes de outros grupos de pesquisa em trabalho de colaboração.

Nº	Amostra	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	Massa (mg)
1	1 a	+	+	-	++	2,7
2	2 a	+	+	-	++	2,7
3	3 a	-	-	-	++	1,6
4	4 a	++	+	+	-	4,6
5	5 a	-	-	-	+	6,1
6	6 a	-	-	-	+	2,5
7	7 a	-	-	-	+	3,2
8	9 a	-	+	-	-	2,7
9	10 a	-	-	-	-	2,1
10	11 a	-	-	-	-	2,1
11	12 a	-	-	-	++	4,9
12	13 a	-	-	-	+	3
13	14 a	+	+	+	+	2,4
14	15 a	++	+	++	-	3,4
15	16 a	-	+	-	+	3,6
16	17 a	++	+	++	-	3,2
17	18 a	++	+	++	+	3,6
18	19 a	+	-	-	+	4,9
19	21 a	-	-	-	+	1,9
20	22 a	-	-	-	++	2,8
21	23 a	-	+	-	++	2
22	24 a	-	-	-	+	2,9
23	25 a	-	-	-	++	2,4
24	27 a	-	-	-	++	3
25	28 a	++	+	++	+	4,5
26	29 a	+	-	+	+	1,8
27	30 a	+	-	+	+	1,8
28	31 a	-	-	-	+	2,9
29	32 a	-	-	-	+	1,8
30	33 a	+	+	+	+	1,9
31	34 a	-	-	-	-	8,6
32	1 b	-	-	-	++	3,5
33	2 b	-	-	-	++	2,6
34	3 b	-	-	-	-	5
35	4 b	+	-	+	-	4,2
36	5 b	+	-	+	-	3,8
37	7 b	-	-	-	+	3,4
38	8 b	-	-	-	-	4,5
39	10 b	-	-	-	-	6,4
40	11 b	+	+	-	+	2,3
41	12 b	-	-	-	-	6,2
42	13 b	-	-	-	-	5,1
43	14 b	-	-	-	-	2,7
44	15 b	-	-	-	+	4,8
45	16 b	-	-	-	+	2,9

Continua

Nº	Amostra	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	Massa (mg)
Continuação						
46	17 b	+	-	-	+	3,2
47	18 b	+	-	+	++	2,5
48	1 c	-	-	+	+	2,5
49	2 c	-	+	-	-	3
50	3 c	-	-	-	-	3
51	4 c	-	-	-	+	2,1
52	5 c	+	-	+	++	2,2
53	6 c	+	-	+	+	2,6
54	7 c	+	-	+	++	2,4
55	8 c	+	-	+	+	2,7
56	9 c	-	+	+	+	2,2
57	10 c	+	-	-	+	2,5
58	11 c	-	-	-	++	2,2
59	12 c	+	-	-	+	2,8
60	13 c	++	-	++	+	2
61	14 c	-	-	-	+	2,5
62	15 c	-	-	-	++	2,1
63	16 c	+	-	-	++	2,5
64	17 c	-	-	-	++	2,4
65	18 c	-	-	-	-	3
66	19 c	++	-	++	-	2,5
67	20 c	-	-	-	-	3,2
68	21 c	++	+	+	-	3,2
69	22 c	+	-	+	-	3,2
70	23 c	+	-	+	-	2,2
71	25 c	+	-	+	-	2,7
72	27 c	++	-	+	-	2,8
73	28 c	+	-	+	-	2,4
74	29 c	-	-	-	-	3,5
75	32 c	+	-	+	-	2,7
76	35 c	+	-	+	-	2,1
77	36 c	+	-	+	+	3
78	37 c	+	-	+	+	2
79	38 c	-	-	-	+	2,3
80	39 c	+	-	+	-	3,2
81	40 c	+	-	-	++	3,5
82	41 c	+	-	-	+	2,5
83	43 c	++	+	++	-	3,9
84	44 c	-	-	-	+	2,3
85	45 c	+	-	+	+	2
86	46 c	-	-	-	+	3,6
87	47 c	++	+	+	-	2,7
88	48 c	+	-	+	+	2,2
89	49 c	+	-	+	+	2,7
90	50 c	+	-	-	+	3,5
91	51 c	+	-	+	+	2,2

Continua

Nº	Amostra	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	Massa (mg)
Continuação						
92	52 c	-	-	-	+	2,3
93	1 D	+	-	+	+	2,5
94	3 D	++	+	++	+	2,9
95	4 D	+	-	+	-	2,6
96	6 D	+	-	-	+	2,7
97	7 D	-	-	-	+	3,4
98	8 D	-	-	-	++	2,6
99	9 D	-	-	-	+	2,5
100	1 AH	-	-	-	-	13,9
101	2 AH	-	-	+	+	3,0
102	3 AH	+	-	+	-	14,0
103	4 AH	-	-	-	-	4,8
104	5 AH	-	-	-	-	9,2
105	6 AH	-	-	-	+	2,1
106	7 AH	-	+	-	-	2,7
107	8 AH	-	-	-	++	4,0
108	9 AH	-	-	-	+	1,5
109	10 AH	+	-	-	-	28,6
110	11 AH	+	-	-	+	4,2
111	12 AH	+	-	+	-	12,0
112	13 AH	++	-	-	-	8,9
113	14 AH	-	-	-	-	8,7
114	15 AH	-	-	-	-	14,2
115	16 AH	++	-	++	+	2,5
116	17 AH	-	+	-	+	3,5
117	18 AH	-	-	-	-	19,4
118	19 AH	-	-	+	+	5,5
119	20 AH	+	-	-	+	1,1
120	21 AH	+	-	-	+	1,3
121	22 AH	++	+	-	++	6,2
122	23 AH	-	-	+	+	1,8
123	24 AH	-	-	+	+	3,6
124	25 AH	-	-	-	+	5,1
125	26 AH	-	-	-	-	13,3
126	28 AH	+	-	+	+	0,7
127	29 AH	-	-	-	++	2,1
128	30 AH	-	-	-	+	2,8
129	Cumarina 1	X	X	+	X	1,9
130	Cumarina 2	X	X	++	X	2,0
131	Cumarina 3	X	X	+	X	2,5
132	Cumarina 4	X	X	-	X	2,5
133	Cumarina 5	X	X	+	X	2,1
134	Cumarina 6	X	X	+	X	2,5
135	Cumarina 7	X	X	+	X	3,2
136	Cumarina 8	X	X	-	X	2,5
137	Cumarina 9	X	X	-	X	2,5

Continua

Nº	Amostra	Ellman	Falso Positivo	Marston	DPPH	Massa (mg)
Conclusão						
138	Cumarina 10	X	X	-	X	3,1
139	Cumarina 11	X	X	-	X	4,2
140	Cumarina 12	X	X	-	X	3,5
141	Cumarina 13	X	X	-	X	3,4
142	Cumarina 14	X	X	+	X	3,2
143	Cumarina 15	X	X	++	X	4,4
144	Cumarina 16	X	X	-	X	4,1
145	Cumarina 17	X	X	++	X	3,6
146	Cumarina 18	X	X	++	X	6,6
147	Cumarina 19	X	X	++	X	3,8
148	Cumarina 20	X	X	-	X	5,5
149	Cumarina 21	X	X	++	X	2,1
150	CAAT 6-3	+	-	+	-	
151	CAAT 6-3 BuOH	*	-	-	-	
152	CAAT 8-1	+	-	+	-	
153	CAAT 8-23	+	-	+	-	
154	CAAT 5-65	+	-	+	-	
155	CAAT 1-42	+	-	+	-	
156	EUCAL 12	*	*	*	-	
157	EUCAL 15	+	-	+	-	
158	EUCAL 23	+	-	+	-	
159	EUCAL 24	-	-	*	-	
160	EUCAL 26	+	+	+	-	
161	EUCAL 30	-	+	+	-	
162	EUCAL 31	+	+	+	-	
163	EUCAL 48	+	+	-	-	
164	EUCAL 70	+	+	+	-	
165	EUCAL 74	+	+	+	-	

++ Boa atividade, + Pouca atividade, - Não apresenta atividade, X Não foi testado, * a cor da matriz está mascarando o resultado.

Tabela 10: Dados de RMN de 13C, DEPT 135, gHMQC, 1H, multiplicidade, J, gHMBC e TOCSY da Substância 1.

C	δ C	DEPT	*g*HMQC, δ H, mult, *J* (Hz)	*g*HMBC	TOCSY
1	176,2	C	-	H-7, H-5	-
2	35,0	CH_2	2,31 (H-5), *t*, 6,5; 6,3	H-3, H-2	H-3, H-2
3	26,2	CH_2	1,60 (H-3), *m*	H-5, H-2	H-2
4	30,7	CH_2	1,34 (H-2), *m;* 1,60 (H-3), *m*	H-5, H-4, H-3	H-1
5	28,3	CH_2	2,06 (H-4), *m*	H-8, H-2	H-2
6	131,1	CH	5,34 (H-8), *m*	H-6, H-4	H-6, H-4, H-2
7	129,3	CH	5,34 (H-8), *m*	H-6, H-4	H-6, H-4, H-2
8	129,2	CH	5,34 (H-8), *m*	H-6, H-4	H-6, H-4, H-2
9	131,0	CH	5,34 (H-8), *m*	H-6, H-4	H-6, H-4, H-2
10	26,7	CH_2	2,77 (H-6), *t*, 6,5;6,3	H-8	-
11	31,0	CH_2	1,34 (H-2), *m*	-	H-1
12	30,3	CH_2	1,34 (H-2), *m*	H-2	H-1
13	30,3	CH_2	1,34 (H-2), *m*	H-2	H-1
14	28,3	CH_2	2,06 (H-4), *m*	H-2	H-2
15	29,3		1,34 (H-2), *m*	H-1	H-1
16	32,8	CH_2	1,34 (H-2), *m*	H1	H-1
17	23,7	CH_2	-	H-1	-
18	14,5	CH_3	0,90 (H-1), *m*	-	-
19	52,1	CH_3	3,64 (H-7), *s*	-	-

Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C, DEPT 135, ^{1}H, multiplicidade e *J*, da Substância 2.

C	δ C	DEPT	δ H, mult, *J* (Hz)
1	202,3	C	9,77, *s*
2	33,7	CH_2	2,35, *t*, 7,5
3	24,6	CH_2	2,01, *m*
4	29,7	CH_2	1,29, *m*
5	24,7	CH_2	1,29, *m*
6	29,3	CH_2	1,29, *m*
7	29,1	CH_2	1,29, *m*
8	29,4	CH_2	1,29, *m*
9	29,2	CH_2	1,29, *m*
10	29,6	CH_2	1,29, *m*
11	28,8	CH_2	1,29, *m*
12	31,9	CH_2	1,29, *m*
13	22,7	CH_2	1,63, *m*
14	14,1	CH_3	0,85, *m*

Tabela 12: Identificação dos componentes majoritários na fração C1-1ªc(1)-SPE-Hex por CG/MS.

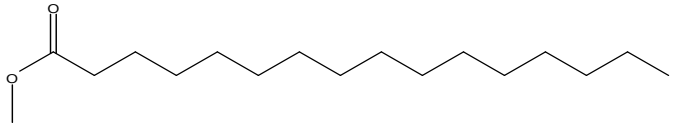
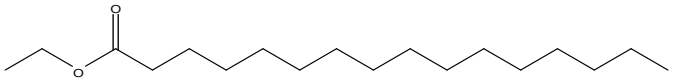
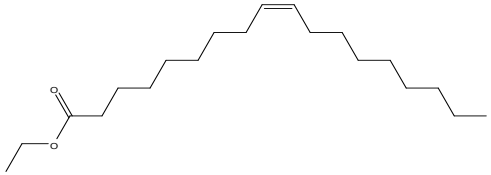
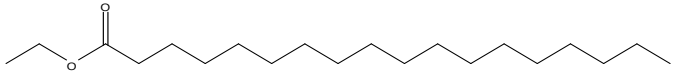
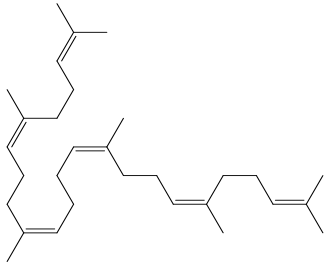
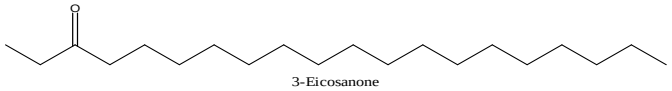
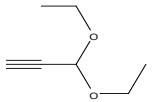
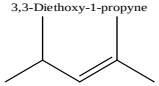
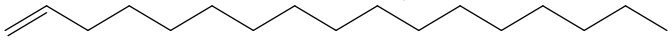
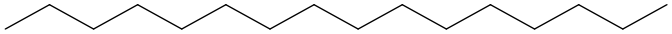
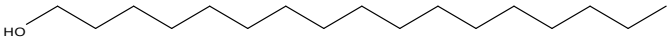
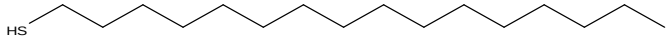
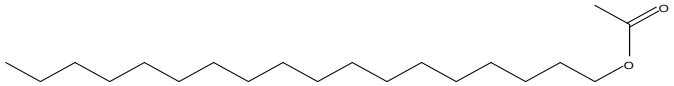
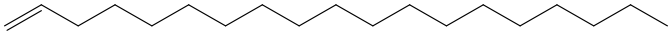
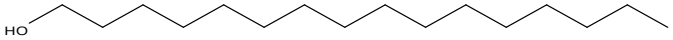
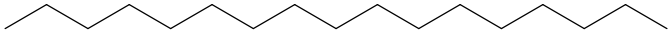
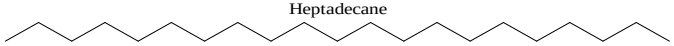
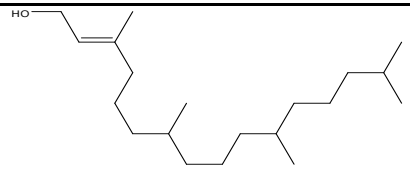
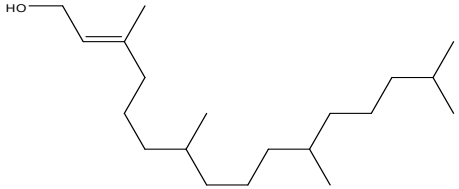
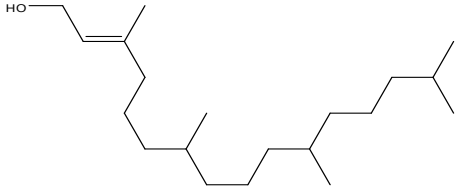
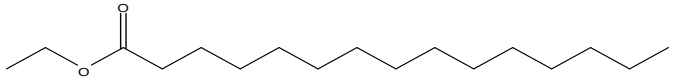
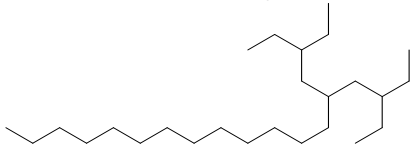
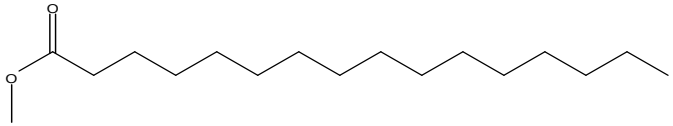
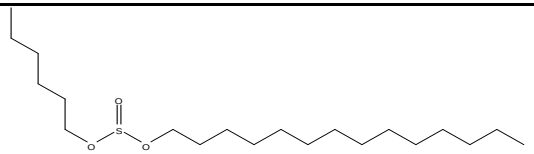
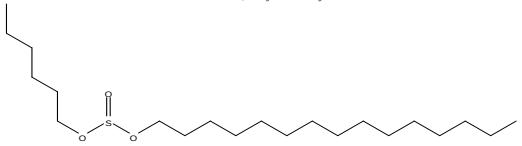
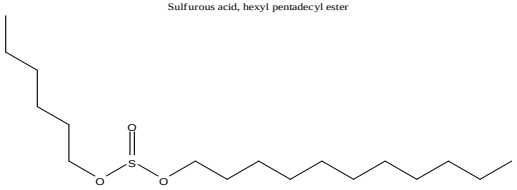
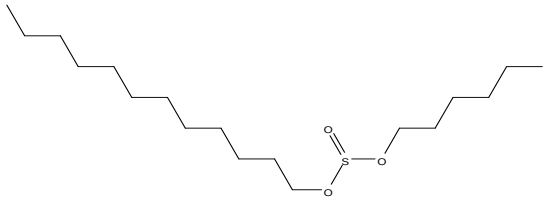
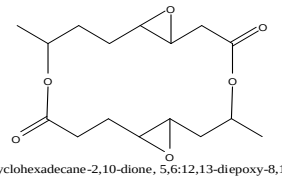
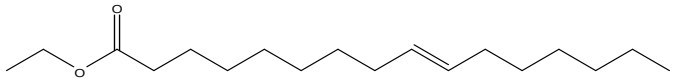
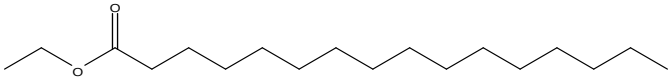
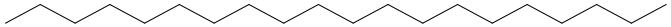
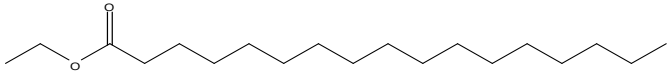
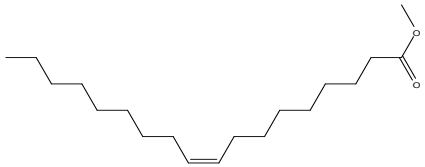
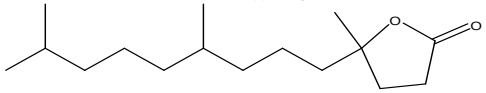
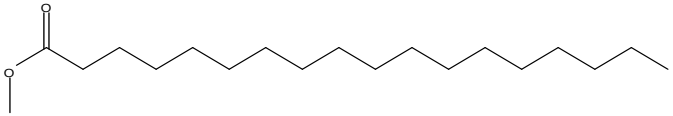
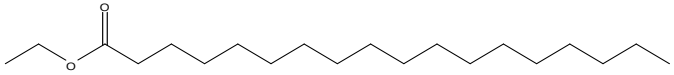
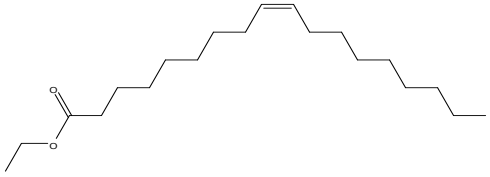
T_R (min)	Área	Similaridade (%)	MM (g/mol)	Nome	Molécula
21,2	356289	95	270	Éster metílico do ácido hexadecanóico	 Hexadecanoic acid, methyl ester
21,9	4517815	90	284	Éster etílico do ácido hexadecanóico	 Hexadecanoic acid, ethyl ester
22,0	113831	92	282	Eicosano	Eicosane
23,5	1110758	92	310	Oleato de etila	 Ethyl Oleate
23,7	762380	90	312	Éster etílico do ácido octadecanóico	 Octadecanoic acid, ethyl ester
28,8	334716	96	410	2,6,10,15,19,23- Hexametil, 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno (all-E)	 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-

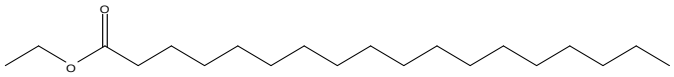
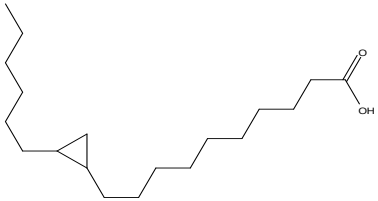
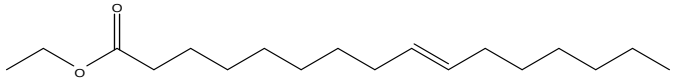
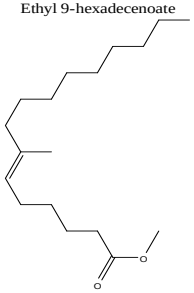
Tabela 13: Identificação dos componentes da fração C1-1ªc(1)-SPE-Hex por CG/MS.

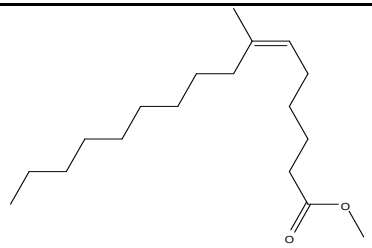
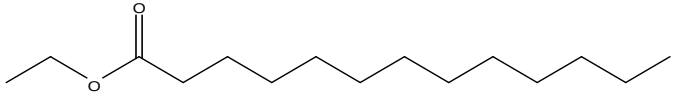
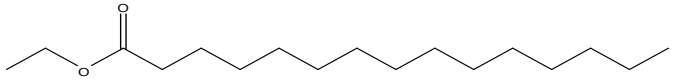
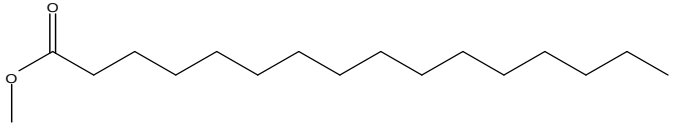
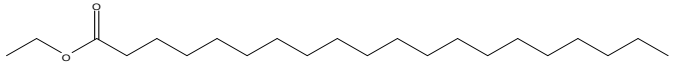
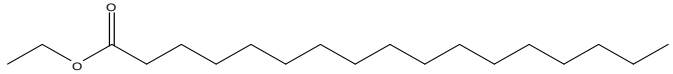
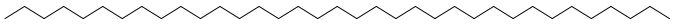
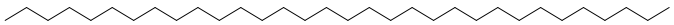
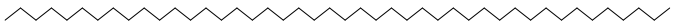
T_R (min)	Área	Similaridade (%)	MM (g/mol)	Nome	Moléculas
6,4	81453	77	296	3-Eicosano	 3-Eicosanone
7,5	173488	87	128	3,3-Dietoxi-1-propino 2,4-Dimetil-2-Penteno	 3,3-Diethoxy-1-propyne  2-Pentene, 2,4-dimethyl-
17,6	32334	92	238	1-Heptadeceno	 1-Heptadecene
17,7	81078	95	226	Hexadecano	 Hexadecane
19,9	97219	85	256	1-Heptadecanol 1-Hexadecanotiol Éster octadecil do ácido acético 1-Nonadeceno 1-Hexadecanol	 1-Heptadecanol  1-Hexadecanethiol  Acetic acid, octadecyl ester  1-Nonadecene  1-Hexadecanol
20,0	136306	96	240	Heptadecano Heneicosano	 Heptadecane  Heneicosane

T_R (min)	Área	Similaridade (%)	MM (g/mol)	Nome	Moléculas
20,4	38321	85	296	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol
20,6	32171	87	296	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol
20,8	32123	86	296	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol
20,9	33215	82	270	Éster etílico do ácido pentadecanóico	 Pentadecanoic acid, ethyl ester
21,0	11425	67	366	3-Etil-5-(2-etil,butil)-octadecano Nonacosano	 Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)- Nonacosane
21,2	356289	95	270	Éster metílico do ácido hexadecanóico	 Hexadecanoic acid, methyl ester

T_R (min)	Área	Similaridade (%)	MM (g/mol)	Nome	Moléculas
21,7	39537	78	362	Éster tetradecil hexil do ácido sulfuroso	 Sulfurous acid, hexyl tetradecyl ester
				Éster pentadecil hexil do ácido sulfuroso	 Sulfurous acid, hexyl pentadecyl ester
				Éster undecil hexil do ácido sulfuroso	 Sulfurous acid, hexyl undecyl ester
				Éster hexil dodecil do ácido sulfuroso	 Sulfurous acid, dodecyl hexyl ester
				8,16-Dimetil, 5,6:12,13-diepoxi, 2,10-dione,1,8-dioxaciclohexadecano	 1,8-Dioxacyclohexadecane-2,10-dione, 5,6:12,13-diepoxy-8,16-dimethyl-
21,8	86547	86	282	9-Hexadecenoato de etila	 Ethyl 9-hexadecenoate

T_R (min)	Área	Similaridade (%)	MM (g/mol)	Nome	Moléculas
21,9	4517815	90	284	Éster metílico do ácido hexadecanóico	 Hexadecanoic acid, ethyl ester
22,0	113831	92	282	Eicosano	 Eicosane
22,9	186009	89	298	Éster etílico do ácido heptadecanóico	 Heptadecanoic acid, ethyl ester
22,9	118541	93	296	Éster metílico do ácido 9(Z)-octadecenóico	 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester
23,1	216267	86	254	4,8,12-Trimetiltridecan-4-ólico	 4,8,12-Trimethyltridecan-4-olide
23,2	59363	91	298	Éster metílico do ácido octadecanóico	 Octadecanoic acid, methyl ester
23,4	53868	82	312	Éster etílico do ácido octadecanóico	 Octadecanoic acid, ethyl ester
23,5	1110758	92	310	Oleato de etila	 Ethyl Oleate

T_R (min)	Área	Similaridade (%)	MM (g/mol)	Nome	Moléculas
23,8	762380	90	312	Éster etílico do ácido octadecanóico	 Octadecanoic acid, ethyl ester
23,8	53641	92	282	Eicosano	Eicosane
24,5	22156	70	296	10-(2-hexilciclopropil) do ácido decanóico	 Decanoic acid, 10-(2-hexylcyclopropyl)
				9-Hexadecenoato de etila	 Ethyl 9-hexadecenoate
				Éster metílico, 7-metil do ácido 6(E)-hexadecenóico	 6-Hexadecenoic acid, 7-methyl,methyl ester (E)

T_R (min)	Área	Similaridade (%)	MM (g/mol)	Nome	Moléculas
				Éster metílico, 7-metil do ácido 6(Z)-hexadecenóico	 6-Hexadecenoic acid, 7-methyl,methyl ester (Z)
24,6	41034	82	242	Tridecanoato de etila	 Ethyl tridecanoate
				Éster etílico do ácido pentadecanóico	 Pentadecanoic acid, ethyl ester
24,9	37370	79	270	Éster metílico do ácido hexadecanóico	 Hexadecanoic acid, methyl ester
25,4	289611	87	340	Éster etílico do ácido eicosanóico	 Eicosanoic acid, ethyl ester
				Éster etílico do ácido heptadecanóico	 Heptadecanoic acid, ethyl ester
25,5	34200	87	492	Pentatriacontano	 Pentatriacontane
				Eicosano	Eicosane
				Dotriacontano	 Dotriacontane
				Tetrapentacontano	Tetrapentacontane
				Tetratetracontano	 Tetratetracontane

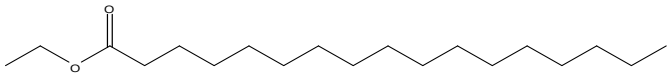
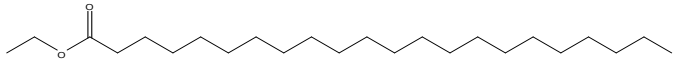
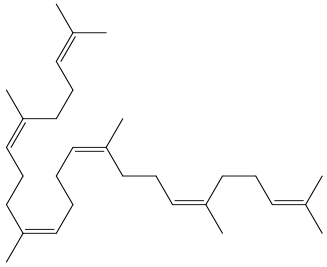
T_R (min)	Área	Similaridade (%)	MM (g/mol)	Nome	Moléculas
26,3	40856	82	298	Éster etílico do ácido heptadecanóico	 Heptadecanoic acid, ethyl ester
27,0	117864	85	368	Éster etílico do ácido docosanóico	 Docosanoic acid, ethyl ester
28,8	334716	96	410	2,6,10,15,19,23-Hexametil, 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaeno-(all-E)	 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-

Tabela 14: Resultado da revelação com iodoplatinado dos extratos e frações de *P. carthagenensis* – 1ª coleta.

Amostra	Rf	5min	30min	60min	Resultado
EE folha	0	* e Branco	* e Branco	*	Ativo
EE caule	0	* e Branco	* e Branco	*	Ativo
	0,93	*	X	X	X
Fr. torta folha	0	*	Amarelo	Rosa	X
	0,96	*	Branco	Rosa	Ativo
Fr. torta caule	0	*	Branco	X	Ativo
	0,96	*	Branco	X	Ativo
Fr. $CHCl_3$ folha	0	X	Branco	Rosa	Ativo
	0,24	X	X	Roxo	X
	0,93	*	Branco	Verde e Rosa	Ativo
Fr. $CHCl_3$ caule	0	X	Branco	Rosa	Ativo
	0,23	X	X	Rosa	X
	0,93	Rosa	Branco	Rosa	Ativo
Fr. aquosa folha	0	* e Branco	Roxo	Azul	Ativo
	0,71	X	Branco	Azul	Ativo
Fr. aquosa caule	0	* e Branco	Roxo	Azul	Ativo
	0,64	X	Branco	X	Ativo

X – não apresenta coloração, * cor da matriz mascara o resultado.

Tabela 15: Resultado da revelação das frações e extratos de *P. carthagenensis* - 2ª coleta com iodoplatinado.

Amostra	**Rf**	**5min**	**15min**	**60min**	**Resultado**
Fr. alcalóide semente	0	Branco	Marrom	Marrom	Ativo
Fr. alcalóide caule	0	Branco	Marrom	Marrom	Ativo

Continua

Amostra	Rf	5min	15min	60min	Resultado
Continuação					
Fr. alcalóide folha	0	Branco	Marrom	Marrom	Ativo
	0,85	Bege	Verde	Amarelo	
	0,91	Azul	Azul	Azul	Ativo
Fr. torta semente	0	Amarelo e Marrom	Marrom	Marrom	Ativo
Fr. torta caule	0	Amarelo	Marrom	Marrom	Ativo
Fr. torta folha	0	Amarelo	X	X	
Fr. $CHCl_3$ semente	0	Branco	Branco	X	Ativo
	0,88	X	Rosa	X	
	0,94	Branco	Branco	X	Ativo
Fr. $CHCl_3$ caule	0	Branco	Marrom	Marrom	Ativo
	0,05	Branco	X	X	Ativo
	0,11	Branco	X	X	Ativo
	0,53	X	Amarelo	X	
	0,66	X	Rosa	X	
	0,73	X	Rosa	X	
	0,84	Bege	Verde	Amarelo e Marrom	Ativo
	0,89	Azul	Azul	Azul	Ativo
	0,99	Laranja	Amarelo	Amarelo	

Continua

Amostra	Rf	5min	15min	60min	Resultado
Continuação					
Fr. $CHCl_3$ folha	0	Branco	Marrom	Marrom	Ativo
	0,03	Branco	X	X	Ativo
	0,11	Branco	X	X	
	0,53	Branco	Amarelo	X	
	0,66	X	Rosa	X	
	0,73	X	Rosa	X	
	0,85	Bege	Verde	Amarelo e Marrom	Ativo
	0,90	Azul	Azul	Azul	Ativo
	0,99	Laranja	Amarelo	Amarelo	
Fr. aquosa semente	0	Marrom	Roxo	X	Ativo
Fr. aquosa caule	0	Marrom	Roxo	Roxo	Ativo
Fr. aquosa folha	0	Marrom	Roxo	X	Ativo
EE semente	0	Branco	Marrom	Laranja	Ativo
EE caule	0	Branco	Marrom	Laranja	Ativo
	0,63	X	Rosa	X	
	0,68	X	Rosa	X	

Continua

Amostra	Rf	5min	15min	60min	Resultado
Conclusão					
EE folha	0	Branco	Marrom	Marrom	Ativo
	0,15	X	Marrom	X	Ativo
	0,29	X	Marrom	X	Ativo
	0,31	X	Marrom	Marrom	Ativo
	0,39	X	Marrom	Marrom	Ativo
	0,63	X	Rosa	X	
	0,68	X	Roxo	X	
	0,81	X	Rosa	X	
	0,88	X	Roxo	Roxo	

X – não apresenta coloração.