



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

DANIELLE VARELA DE MORAIS SANTOS

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO
BRUTO EXTRAÍDO DA PLANTA *Psychotria viridis* Ruíz & Pavón (Rubiaceae)**

**BOA VISTA - RR
2015**

DANIELLE VARELA DE MORAIS SANTOS

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO
BRUTO EXTRAÍDO DA PLANTA *Psychotria viridis* Ruiz & Pavón (Rubiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de mestre na área de concentração em Produtos Naturais.

**Orientador: Prof. Dr. Habel Nasser Rocha
da Costa**

BOA VISTA - RR

2015

DANIELLE VARELA DE MORAIS SANTOS

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO
BRUTO EXTRAÍDO DA PLANTA *Psychotria viridis* Ruíz & Pavón (Rubiaceae)**

Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ da Universidade Federal de Roraima. Defendida em 17 de agosto de 2015 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa
Orientador / Departamento de Química – UFRR

Prof. Dr. Antônio Alves de Melo Filho
Departamento de Química – UFRR

Prof. Dr. André Camargo de Oliveira
Departamento de Química – UERR - Rorainópolis

BOA VISTA – RR

2015

Aos meus avós, que são e eternamente serão meus pais, que sempre me incentivaram a prosseguir nessa jornada, quaisquer que fossem os obstáculos. Aos meus pais biológicos, ao meu namorado, a meus irmãos, tios e amigos, que foram meu alicerce. Aos meus mestres que me conduziram brilhantemente durante esta caminhada. E principalmente, à minha querida bisavó, que mesmo distante fisicamente sempre esteve ao meu lado e lutou pelo meu sucesso. **DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força espiritual para a realização deste trabalho.

À minha mãe Maria Madalena de Moraes Santos por estar sempre ao meu lado me apoiando em tudo, me incentivando nos estudos para que eu atingisse o objetivo final.

Ao meu pai Éros da Silva Santos, pelo eterno orgulho durante toda a minha caminhada.

A meu irmão Diego Varela de Moraes Santos e, cunhada, Jaqueline Ximenes Figueiredo Fernandes, pelo apoio, compreensão e pela grande ajuda.

Ao meu pai Marcus Vinícius de Moraes Santos, minha mãe Ruth Nagib Coelho Abumussa e irmã Marisabel Abumussa Santos, pela ajuda e, em especial, por todo o carinho ao longo deste percurso.

À minha bisavó, Isabel Pereira de Moraes (*in memoriam*) que apesar de estar tão longe, ainda se encontra tão perto, dando-me forças e perseverança em meus objetivos de vida.

Ao professor Dr. Habel Nasser Rocha da Costa, pela paciência na orientação e incentivo, pela amizade, e finalmente, por ter sido importante nesta trajetória acadêmica e no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Antônio Alves, pela ajuda e todo o apoio proporcionado no decorrer desta etapa final.

Aos meus amigos, pela força e amizade partilhada durante esta etapa de minha vida.

Aos colegas e companheiros do Laboratório de Produtos Naturais, pelo companheirismo e aprendizado.

À Assunção Ribeiro Coutinho, pelo apoio proporcionado durante toda essa trajetória acadêmica, pela paciência e incentivo.

À Universidade Federal de Roraima (UFRR), ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

"Por mais árdua que seja a luta, por mais distante que um ideal se apresente, por mais difícil que seja a caminhada, existe sempre uma maneira de vencer: A Nossa Fé."

(Autor Desconhecido)

RESUMO

A utilização de plantas medicinais para tratamento humano, cura e prevenção de doenças, é realizada pela humanidade há muito tempo. A família Rubiaceae é uma ampla família, de 630 gêneros e cerca de 13.000 espécies encontradas em todo o mundo. O trabalho a ser abordado teve como objetivo geral estudar e avaliar os componentes presentes no óleo essencial e no extrato bruto das partes da planta *Psychotria viridis*, como o caule, a folha e fruto. Foram coletadas as amostras na região do Jacamim, município do Cantá, Boa Vista-RR. Extraíu-se o óleo essencial, das amostras coletadas, pelo processo de hidrodestilação com sistema tipo Clevenger por 4 horas no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Roraima e também o extrato bruto utilizando o sistema de Soxhlet e solventes como hexano, etanol e clorofórmio, por um período de aproximadamente 2-5 horas. Foi calculado o rendimento do óleo essencial do fruto, 0,11%, da folha, 0,02%, e do caule, 0,07%. Foi utilizado o sistema CG/EM e foram identificados 29 constituintes no óleo essencial extraído do fruto da planta e 3 constituintes no óleo essencial da folha. A partir dos constituintes identificados na amostra aqueles considerados majoritários de acordo com a concentração, foram Tetradecanal (20,10%), 1-Hexadecanol (9,25%) e Tetradecanal (70,65%) na folha, e no fruto foi o Ácido Dodecanóico (5,28%), Ácido Tetradecanóico (11,08%), 2-pentadecanona (3,36%), (Isotiocianatometil)benzeno (4,66%) e Ácido Pentadecanóico (58,22%). De acordo com a prospecção fitoquímica foi detectado nas partes da planta *Psychotria viridis*, ou seja, na folha e no fruto, alguns metabólitos secundários como, a presença de alcaloides no óleo essencial das duas partes estudadas, enquanto que no extrato extraído da espécie em questão utilizando o solvente hexano foi detectada na folha a presença de saponinas e no fruto esteróides e triterpenóides, saponinas e bases quaternárias. Foram utilizados também outros dois solventes na extração do extrato bruto, o clorofórmio e o etanol, e neles foram detectados mais alguns outros metabólitos secundários que estão especificados no presente trabalho. No teste de inibição da enzima acetilcolinesterase as amostras A25 e A26, que correspondem respectivamente ao extrato extraído do caule e da folha da planta estudada, foram as que apresentaram maior percentual de inibição 84,22% e 82,46%, respectivamente, apresentando dessa forma um efeito de inibição potente de acordo com Vinutha et al. (2007). Nos testes antimicrobianos a amostra A24, que corresponde ao extrato proveniente do fruto, foi quem apresentou uma maior inibição à bactéria gram-negativa *Escherichia coli* com 43,15% e um erro de 5,52. Já a amostra A26 foi quem apresentou maior inibição à bactéria gram-negativa *Staphylococcus tiphyrium* com 100% e um erro de 4,74. Os deslocamentos químicos da amostra A24 fornecidos por RMN H^1 de 200,13MHz foram adicionados ao PROTOLEOS, onde sugeriu as seguintes informações: ácido oleico (15,98%), ácido linoleico (0,14%), ácido linolênico (11,32%) e ácidos graxos saturados (72,55%). Suas propriedades físico-químicas foram fornecidas pelo PROTOLEOS: índice de iodo (110,88 mg I_2/g), índice de acidez (3,73 mg KOH/g), índice de saponificação (124,82 mg KOH/g), massa molecular média (1160,3 g/Mol), índice de esterificação (121,09 mg KOH/g) e esterificação (97,09%).

Palavras-chave: Óleo essencial. Componentes químicos. *Psychotria*. *Psychotria viridis*.

ABSTRACT

The use of medicinal plants for human treatment, cure and disease prevention, is performed for humanity long ago. The Rubiaceae family is a large family, of 630 genus and about 13,000 species found worldwide. The work to be approached aimed to study and evaluate the components present in the essential oil and crude extract of parts of *Psychotria viridis* plant such as the stem, leaf and fruit. The samples were collected in the region of Jacamim, city of Cantá, Boa Vista-RR. Extracted the essential oil, of the collected samples, by hydrodistillation process with Clevenger type system for 4 hours in Natural Products Laboratory of the Federal University of Roraima and also the crude extract using the Soxhlet system and solvents such as hexane, ethanol and chloroform for a period of about 2-5 hours. Was calculated yields Essential oil fruit, 0,11%, leaf, 0,02% and from the stem, 0,07%. We used the CG / EM system and were identified 29 constituents in the essential oil extracted from the fruit of the plant and 3 constituents in the essential oil of the sheet. From the constituents identified in the sample those considered majority according to concentration were tetradecanal (20,10%), 1-Hexadecanol (9,25%) and tetradecanal (70,65%) in the leaf, and fruit was acid dodecanoic (5,28%), acid tetradecanoic (11,08%), 2-pentadecanone (3,36%) (Isotiocianatometil) benzene (4,66%) and acid pentadecanoic (58,22%). According to the phytochemical, was detected in parts of *Psychotria viridis* plant, in other words, in the leaf and fruit, some secondary metabolites as, the presence of alkaloids in the essential oil of the two parts studied, while in the extracted extract of the species in question using the solvent hexane was detected on leaf the presence of saponins and in the fruit steroids and triterpenoids, saponins and quaternary bases. Were also used two other solvents in the extraction of crude extract, chloroform and ethanol, and in them were detected a few other secondary metabolites that are specified in this paper. In the test of inhibition of the enzyme acetylcholinesterase the A25 and A26 samples, which correspond respectively to the extracted extract of the stem and leaf of studied plant, showed the highest percentage of inhibit 84,22% and 82,46%, respectively, showing that forms a potent inhibitory effect according Vinutha et al. (2007). In the antimicrobial tests A24 sample, which corresponds to from fruit extract, was the one who showed greater inhibition of gram-negative bacterium *Escherichia coli* with 43,15% and 5,51 error. Already the A26 sample who showed greater inhibition of gram-negative bacterium *Staphylococcus tiphymurium* with 100% and 4,74 error. Chemical shifts of A24 sample supplied by NMR H¹ 200,13MHz were added to PROTOLEOS, which suggested the following: oleic acid (15,98%), linoleic acid (0,14%), linolenic acid (11,32%) and saturated fatty acid (72,55%). Its physicochemical properties are provided by PROTOLEOS: iodine value (110,88 mg I₂/g), acid value (3,73 mg KOH/g), saponification index (124,82 mg KOH/g), average molecular weight (1160,3 g/mol), esterification ratio (121,09 mg KOH/g) and esterification (97,09%).

Keywords: Essential oil. Chemical components. *Psychotria*. *Psychotria viridis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Preparo do chá de ayahuasca pela União do Vegetal.....	27
Figura 2 – Chacrana (<i>Psychotria viridis</i>).....	28
Figura 3 – Face superior e inferior da folha de <i>P. viridis</i>	28
Figura 4 – Estruturas químicas da DMT e da Serotonina.....	29
Figura 5 – Componentes básicos de um espectrômetro de massa.....	37
Figura 6 – Esquema do funcionamento de uma cromatografia gasosa.....	38
Figura 7 – Espectro de RMN H ¹ do óleo de canola com suas integrações.....	40
Figura 8 – Número de publicações indexadas sobre atividade antimicrobiana ao redor do mundo na última década.....	43
Figura 9 – Número de publicações indexadas sobre atividade antimicrobiana por região do mundo na última década. (NA = América do Norte; LA = América Latina (Brasil em branco); AF = África; EU = Europa; AS = Ásia e OC = Oceania).....	44
Figura 10 – Clivagem das moléculas de acetilcolina.....	47
Figura 11 – Inibidores da AChE utilizados para o tratamento da doença de Alzheimer.....	49
Figura 12 – Aparelho tipo Clevenger.....	52
Figura 13 – Aparelho de Soxhlet.....	53
Figura 14 – Divisão Municipal do Estado de Roraima.....	54
Figura 15 – Localização do Município do Cantá-RR.....	54
Figura 16 – Exsicata da espécie <i>Psychotria viridis</i>	55
Figura 17 – Lavagem do material.....	56
Figura 18 – Secagem do material.....	56
Figura 19 – Estufa com Circulação de Ar.....	57
Figura 20 – Material vegetal macerado no triturador.....	57
Figura 21 – Material vegetal em pó acondicionado em sacos plásticos.....	58
Figura 22 – Pesagem das amostras.....	58
Figura 23 – Balão com a amostra macerada juntamente com água destilada.....	59
Figura 24 – Montagem dos cartuchos contendo a amostra a ser extraída.....	60
Figura 25 – Passagem pelo Sulfato de Sódio Anidro PA.....	60
Figura 26 – Remoção dos solventes pelo Rotaevaporador.....	61
Figura 27 – Tubos de ensaio e béqueres numerados.....	62
Figura 28 – Tubos de ensaio em banho-maria.....	62
Figura 29 – Característica geral do programa PROTEUS RMN H ¹	73

Figura 30 – Característica geral do programa PROTÓLEOS.....	73
Figura 31 – Cromatograma completo do óleo essencial da folha.....	78
Figura 32 – Espectro de massa no tempo de retenção de 31.127 minutos.....	79
Figura 33 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM.....	79
Figura 34 – Espectro de massa no tempo de retenção de 33.528 minutos.....	80
Figura 35 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM.....	80
Figura 36 – Espectro de massa no tempo de retenção de 34.868 minutos.....	80
Figura 37 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM.....	81
Figura 38 – Cronograma completo do óleo essencial da amostra do fruto.....	81
Figura 39 – Espectro de massa no tempo de retenção de 29.765 minutos.....	83
Figura 40 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM.....	83
Figura 41 – Espectro de massa no tempo de retenção de 37.032 minutos.....	83
Figura 42 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM.....	84
Figura 43 – Espectro de massa no tempo de retenção de 39.383 minutos.....	84
Figura 44 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM.....	84
Figura 45 – Espectro de massa no tempo de retenção de 40.141 minutos.....	85
Figura 46 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM.....	85
Figura 47 – Espectro de massa no tempo de retenção de 43.983 minutos.....	85
Figura 48 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM.....	86
Figura 49 – Espectro de RMN H ¹ genérico de um óleo vegetal.....	95
Figura 50 – Espectro de RMN H ¹ integrado do extrato bruto de <i>Psychotria viridis</i> por hexano da amostra A24.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação Taxonômica.....	23
Tabela 2 – Partes utilizadas para 15 espécies de <i>Psychotria</i>	25
Tabela 3 – Unidade de isoprenos e número de carbonos de cada classe de terpenos.....	31
Tabela 4 – Os 18 principais óleos essenciais no mercado mundial.....	34
Tabela 5 – Importação de óleos essenciais pela EU, em 2004, de países em desenvolvimento.....	35
Tabela 6 – Lista de constituintes de acordo com o surgimento da cor.....	63
Tabela 7 – Lista de constituintes de acordo com o surgimento da cor.....	64
Tabela 8 – Cronograma de extrações do óleo essencial.....	75
Tabela 9 – Cronograma de extrações do material vegetal.....	75
Tabela 10 – Cronograma das massas dos óleos essenciais e seus rendimentos.....	75
Tabela 11 – Resultados da prospecção fitoquímica do óleo essencial da folha.....	76
Tabela 12 – Resultados da prospecção fitoquímica do óleo essencial do fruto.....	76
Tabela 13 – Resultados da prospecção fitoquímica do extrato da folha.....	77
Tabela 14 – Resultados da prospecção fitoquímica do extrato do fruto.....	77
Tabela 15 – Constituintes químicos identificados no óleo essencial da folha de <i>P. viridis</i>	79
Tabela 16 – Constituintes químicos identificados no óleo essencial do fruto de <i>P. viridis</i>	82
Tabela 17 – Constituintes majoritários e suas concentrações em cada amostra.....	86
Tabela 18 – Inibição e classificação da intensidade de inibição de cada amostra.....	87
Tabela 19 – BIOENSAIO de MIC para Bactéria Gram-negativa <i>E. coli</i>	89
Tabela 20 – BIOENSAIO de MIC para Bactéria Gram-negativa <i>S. typhimurium</i>	91
Tabela 21 – Caracterização físico-química do extrato bruto de <i>Psychotria viridis</i> comparados a outros estudos da literatura.....	92
Tabela 22 – Índice de éster de extratos brutos.....	93
Tabela 23 – Atribuição dos sinais do espectro de RMN dos óleos vegetais.....	96
Tabela 24 – Composição de ácidos graxos majoritários do extrato bruto de <i>Psychotria viridis</i> e de outros óleos vegetais encontrados na literatura por RMN H ¹	97

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CIS	Comissões Interinstitucionais de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
DMT	N, N – dimetiltriptamina
UDV	União do Vegetal
5HT	5 – hidroxitriptamina
OE	Óleo Essencial
CG	Cromatografia Gasosa
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
COMTRADE	United Nations Commodity Trade Statistics Database
UE	União Europeia
IE	Ionização por impacto de elétrons (“electron ionization”)
IQ	Ionização Química (“chemical ionization”)
EM	Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FM	Fase Móvel
FE	Fase Estacionária
EO	Estresse Oxidativo
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
%AA	Porcentagem de Atividade Antioxidante
CE	Concentração Eficiente
CI	Concentração Inibitória
MIC	Concentração Mínima Inibitória
CCIH	Comissões de Controle de Infecção Hospitalar
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
LPS	Lipopolissacarídeo
UAT	Ultra-Alta Temperatura
DTA	Doença Transmitida por Alimento
AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
DA	Doença de Alzheimer

RR	Roraima
UFRR	Universidade Federal de Roraima
GBQF	Grupo de Biotecnologia e Química Fina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
DMSO	Dimetilsulfóxido
ATCI	Iodeto de Acetilcolina
DTNB	5-dithio-bis-2-nitrobenzoate
U/mL	Unidade por mililitro
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
g	Gramma
h	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
mL	Mililitro
µL	Microlitro
Mm	Milimetro
Nm	Nanometro
pH	Potencial Hidrogeniônico
sp.	Espécie
spp.	Sub espécie
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
UFC	Unidade de Formação de Colônias
PA	Para Análise
FeCl ₃	Cloreto Férrico
NaOH	Hidróxido de Sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sódio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
M	Molar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1.2.1 A Família Rubiaceae.....	20
1.2.1.1 Valor Econômico, Ornamental e Medicinal das Rubiaceae.....	21
1.2.2 O Gênero <i>Psychotria</i> e sua distribuição, importância medicinal e seus principais fitoconstituintes.....	22
1.2.2.1 O Gênero <i>Psychotria</i> e sua distribuição.....	22
1.2.2.2 Importância Medicinal e seus Principais Fitoconstituintes de <i>Psychotria</i>	23
1.2.3 A Espécie <i>Psychotria viridis</i>.....	26
1.2.4 Óleo Essencial.....	30
1.2.5 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG/EM).....	36
1.2.6 Ressonância Magnética Nuclear.....	38
1.2.7 Análises Físico-químicas.....	40
1.2.7.1 Índice de Acidez (IA).....	41
1.2.7.2 Índice de Saponificação (IS).....	41
1.2.7.3 Índice de Éster (IE).....	41
1.2.7.4 Índice de Iodo (II).....	42
1.2.8 Atividade Antimicrobiana.....	42
1.2.8.1 Caracterização dos micro-organismos testados.....	45
1.2.9 Acetilcolinesterase.....	47
1.2.9.1 Doença de Alzheimer.....	48
1.2.10 Prospecção Fitoquímica.....	49
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 OBJETIVO GERAL.....	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	53
4.1.1 Caracterização da área de estudo.....	54
4.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	55
4.3 PREPARAÇÃO.....	56
4.4 LAVAGEM.....	56

4.5 REPOUSO DAS AMOSTRAS PARA SECAR A TEMPERATURA AMBIENTE.....	56
4.6 TRITURAÇÃO.....	57
4.7 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	58
4.8 EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	59
4.9 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO DE <i>P. viridis</i>	61
4.10 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	61
4.10.1 Teste para fenóis e taninos.....	62
4.10.2 Teste para ancitocinas, antocianidina e flavonóides.....	63
4.10.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas.....	63
4.10.4 Teste para flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas.....	64
4.10.5 Teste para confirmação de catequinas.....	64
4.10.6 Teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard).....	64
4.10.7 Teste para saponinas.....	65
4.10.8 Teste confirmatório para saponinas.....	65
4.10.9 Teste para alcalóides.....	65
4.10.10 Teste para bases quartenárias.....	66
4.11 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA (CG/EM).....	66
4.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	66
4.12.1 Bioensaio de MIC (Mínima Concentração Inibitória) para bactérias gram-negativas.....	66
4.12.2 Bioensaios de MIC (Mínima Concentração Inibitória) para bactérias gram-positivas e gram-negativas.....	67
4.13 ACETILCOLINESTERASE.....	68
4.14 ESTUDO QUÍMICO DO ÓLEO E DO EXTRATO POR RMN H ¹	69
4.14.1 Análise das propriedades físico-químicas por RMN H¹.....	69
4.15 PERFIL DOS ÉSTERES METÁLICOS DOS ÁCIDOS GRAXOS POR RMN H ¹	71
4.16 RMN H ¹ COM UTILIZAÇÃO DE SOFTWARE PARA ANÁLISE DE ÓLEO VEGETAL E EXTRATO.....	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	75
5.1 RESULTADOS DA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	76
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	78
5.2.1 Análise do Cromatograma da amostra da folha.....	78
5.2.2 Análise do Cromatograma da amostra do fruto.....	81

5.3	TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE.....	87
5.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	88
5.5	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	92
5.5.1	Índice de Iodo (II).....	92
5.5.2	Índice de Saponificação (IS) e Massa Molecular Média (MM).....	93
5.5.3	Índice de Acidez (IA).....	93
5.5.4	Índice de Éster (IE) e Percentagem de Éster (%IE).....	93
5.5.5	Relação Hidrogênio Olefínicos / Alifáticos ($R_{o,a}$).....	94
5.5.6	Composição química dos óleos por RMN H^1	94
6	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Souza et al. (2012), há milhares de anos, o homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Os primeiros registros sobre a utilização de plantas foram escritos em placas de argila, oriundas da Mesopotâmia, e datados por volta de 2600 a.C. Dentre as substâncias que eram utilizadas estão óleos de *Cedrus Trew species* (Cedar) e *Cupressus sempervirens* L. (Cypress), *Glycyrrhiza glabra* Torr. (Licorice), *Commiphora* Jacq. Species (Myrrh) e *Papaver somniferum* L., todos ainda utilizados para o tratamento da indisposição e mal-estar advindos desde tosses e resfriados até infecções parasitárias e inflamações.

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza geralmente o único recurso terapêutico, em muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo, quanto à espécie humana. Atualmente, nas regiões mais pobres do País e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (BERTINI et al., 2005).

No Brasil três fatores foram indispensáveis para a formação da medicina popular, a saber: a colonização portuguesa; a participação indígena, de aspectos místico e terapêutico; e a cultura negra proveniente da África (escravos) (BIESKI, 2005).

Segundo Bieski (2005), o conhecimento e a preservação dos vinte biomas são de fundamental importância, já que constitui uma das maiores riquezas do Brasil, com uma extensão territorial de 8.500.000 quilômetros quadrados, com aproximadamente 40% da sua área coberta por floresta nativa, verdadeiro patrimônio genético, científico, tecnológico, econômico e cultural que precisa ser conhecido, pesquisado, valorizado e explorado racional e criteriosamente.

Nestes vinte biomas brasileiros a existência de uma diversidade de espécies medicinais, constitui-se uma das mais importantes fontes de princípios ativos do planeta, por isso, as perspectivas do conhecimento das plantas medicinais pela comunidade tradicional, indígena, raizeiros, quilombolas são altamente promissoras (BIESKI, 2005).

Baseando-se nas pesquisas de Simões et al. (2003), observa-se que o comércio de fitoterápicos cresce 17% ao ano, enquanto que o de medicamentos alopáticos cresce 10%. Com isso, tem-se verificado no último século um maior interesse em desvendar e validar cientificamente espécies vegetais com potencial terapêutico (BUTLER, 2005).

Dentre os estudos realizados, como o estudo químico e biológico, se destacam a caracterização de plantas e dos constituintes químicos dos óleos essenciais, por pertencerem ao maior e mais diversificado grupo dentro dos produtos naturais, e também por apresentarem grande importância terapêutica e econômica (SILVA et al., 2003).

Baseado nas pesquisas de Figueira et al. (2011), os extratos e óleos essenciais de plantas medicinais têm se mostrado eficientes no controle de uma grande variedade de microrganismos, incluindo fungos, leveduras e bactérias.

De acordo com De La Rosa et al. (2010), os fenilpropanóides e terpenóides são os principais componentes dos óleos essenciais, sendo que estes últimos preponderam. Estas classes de substâncias são frequentemente alvos de interesse de pesquisadores que veem neles uma fonte promissora de princípios ativos diretos ou precursores na síntese de outros compostos de maior importância, como por exemplo, o safrol, eugenol, citral, citronelal, dentre outros.

A composição química de óleos essenciais depende do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e a técnica de destilação (BERTINI et al., 2005).

Dentre os métodos de extração de óleos essenciais, o mais utilizado é o processo de destilação. O termo destilação envolve um conjunto de três técnicas distintas, porém versando sob o mesmo princípio básico: destilação a seco, hidrodestilação e destilação por arraste a vapor (GROSSMAN, 2005).

Tomando como a base que o estado de Roraima é uma região dotada de uma variedade vegetal enorme, é de suma importância e de grande necessidade o estudo fitoquímico, químico e biológico das mesmas, a fim de proporcionar a descoberta de novas espécies e consequentemente suas aplicabilidades, além de contribuir para o resgate e preservação da cultura popular.

Dessa forma, a realização do presente trabalho irá proporcionar um estudo químico e biológico da espécie *Psychotria viridis*, pois representa oportunidade de novas contribuições científicas nesta área.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente, tem-se observado um aumento quanto à utilização de plantas medicinais para o tratamento de diversas enfermidades ao invés da utilização de medicamentos industrializados, aqueles manuseados pelo homem em laboratórios, pelo fato, dos mesmos apresentarem alto custo, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência ao uso de produtos de origem natural (BADKE et al., 2012).

Segundo Souza et al. (2013), a utilização de plantas medicinais e da fitoterapia, encontram-se em ascensão mundial e endossam um mercado promissor, com cerca de 50% de plantas utilizadas na alimentação, 25% na indústria cosmética, 20% na indústria farmacêutica e 5% em outras atividades, estimando-se em 10.000 o número de espécies vegetais medicinais.

De acordo com Tulp e Bohlin (2004), o Brasil apresenta uma flora com a maior diversidade genética vegetal do planeta, apresentando cerca de 120 mil das 250 mil espécies catalogadas em todo o mundo.

Em suas pesquisas, Veiga Junior (2008) afirma que no Brasil, diretrizes do Ministério da Saúde determinaram prioridades na investigação das plantas medicinais e implantando a fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem sua inclusão no Sistema Único de Saúde (SUS). Para que essa inclusão ocorra é essencial que os profissionais da área de saúde conheçam as atividades farmacológicas e a toxicidade das plantas medicinais de cada bioma brasileiro, de acordo com os costumes, tradições e condição socioeconômica da população.

Segundo França et al. (2008), atualmente, procurando visar uma política de assistência em saúde eficaz, abrangente, humanizada e independente da tecnologia farmacêutica, nota-se o interesse governamental em associar o avanço tecnológico ao conhecimento popular e ao desenvolvimento sustentável.

A Amazônia possui uma flora bastante variada. A utilização de ervas medicinais é bastante antiga na região amazônica, herança de tribos indígenas que habitavam na região e repassaram as suas tradições, contribuindo assim para o uso das ervas pela população no tratamento de doenças (DINIZ et al., 2013).

Os óleos essenciais extraídos destas plantas são aplicados em diversos campos como na perfumaria, no farmacêutico, no campo alimentício, entre outros. Essas substâncias odoríferas possuem funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na

proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura, entre outras (LUPE, 2007).

Os óleos essenciais são definidos como sendo, de uma maneira geral, uma mistura complexa de hidrocarbonetos, alcoóis e aromáticos, encontrados em todo tecido vivo de plantas, em geral concentrados na casca, nas flores, nas folhas, nos rizomas e nas sementes (RODRIGUES, 2002).

A composição dos mesmos podem se alterar de acordo com o local da planta onde são encontrados. E também, caso o óleo essencial seja extraído de uma mesma parte da planta de uma mesma espécie vegetal, porém época de coleta, condições climáticas e solos diferentes, pode apresentar composição química diferente. Portanto, é de suma importância estudar e investigar o método de extração e a parte da planta da qual será retirada a mistura de compostos.

Os métodos de extração variam com relação à localização do óleo volátil na planta, e com a proposta de utilização do mesmo. Os mais utilizados são a destilação a vapor, prensagem a frio, hidrodestilação, turbodestilação, enfleurage, solventes e fluídos supercríticos.

Existem vários estudos sobre o chá alucinógeno conhecido como *Ayahuasca*, que utiliza a espécie *Psychotria viridis* Ruiz & Pavón em conjunto com *Banisteriopsis caapi*. No entanto, não existem relatos de estudos a respeito apenas da *Psychotria viridis*. Portanto, neste trabalho pretende-se realizar um estudo químico e biológico a fim de testar a ação do óleo essencial da espécie em questão, tendo em vista que o estado de Roraima apresenta uma região com uma grande variedade de espécies vegetais ainda não estudadas.

1.2.1 A Família Rubiaceae

De acordo com a pesquisa de Karou et al. (2011), a Família Rubiaceae é uma família grande encontrada em todo o mundo. As plantas dessa família não são apenas ornamentais, são também usadas na medicina popular Africana para tratar várias doenças. Com base em dados publicados na literatura, são relatadas informações relacionadas com os seus usos tradicionais em medicina tradicional sub-saariana, a sua composição química e as atividades farmacológicas selecionadas. De fato, mais de 60 espécies são utilizadas há mais de 70 indicações farmacêuticas incluindo a malária, a hepatite, o eczema, o edema, a tosse, a hipertensão, a diabetes e fraqueza sexual.

Tomando como base o trabalho de Souza et al. (2013), a maior família da ordem Gentianales é a Rubiaceae, com cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies que corresponde a 66% do total das Gentianales, sendo encontradas principalmente nas regiões tropicais, em ambos os hemisférios (aquáticos e terrestres). Estudos filogenéticos mais recentes, segundo Robbrecht and Manen (2006), propõem a divisão de Rubiaceae em quatro subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae, Ixoroideae e Psychotrideae.

As principais características presentes na família são: folhas opostas e decussadas, simples, com margem inteira, estípulas interpeciolares, flores isostêmones, corolas gamopétalas (dialipétalas em *Dialypetalanthus* Kuhl.), estames epipétalos e ovário geralmente ínfero (súpero em *Pagamea* Aubl.) (SOUZA et al., 2014).

Segundo Moura et al. (2013), na Amazônia, no lavrado, e Floresta Atlântica, é onde os principais ecossistemas de Rubiaceae no Brasil se encontram, sendo que um grande número de espécies ainda permanecem sem quaisquer estudos químicos e biológicos. A família é conhecida pela produção de alcalóide, iridóide e antraquinonas. Flavonóides também já foram isolados de espécies Rubiaceae.

1.2.1.1 Valor Econômico, Ornamental e Medicinal das Rubiaceae

A família Rubiaceae é conhecida devido à importância econômica, que são exploradas como alimentícias (*Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L.), ornamentais (*Ixora* spp., *Mussaenda* spp., *Gardenia* spp. etc.), e também na indústria farmacêutica, como por exemplo *Cinchona pubescens* Vahl, produtora de quinina, empregada no tratamento da malária (COELHO et al., 2006).

Nas pesquisas de Vergutz et al. (2010) é destacado a *Coffea arabica*, o café que é uma das bebidas mais consumidas no mundo, e com relação a importância terapêutica de suas espécies como a *Uncaria quianensis*, sendo amplamente utilizadas na medicina popular e na fabricação de fitofármacos e fitoterápicos.

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma espécie arbórea, que apresenta grandes possibilidades de exploração econômica, tanto para o consumo do fruto ao natural, como para extração de corantes dos frutos imaturos (VERGUTZ et al., 2010).

Vergutz et al. (2010), ainda, destaca em seu trabalho algumas espécies de Rubiaceae em que se pode explorar a madeira como a *Amaioua guianensis* na construção civil e fabrico de móveis e a *Calycophyllum multiflorum* empregado na construção de peças flexíveis e vergadas.

Além disso, baseado nos estudos de Coelho et al. (2006), várias espécies são referidas popularmente como medicinais e/ou tóxicas, dentre as quais destacam-se: *Coutarea hexandra* (Jacq.) K.Schum. e diversas espécies dos gêneros *Borreria*, *Cinchona*, *Richardia*, como medicinais; *Palicourea* e *Psychotria*, popularmente conhecidas como “mata-ratos”, que são consideradas venenosas.

1.2.2 O Gênero *Psychotria* e sua distribuição, importância medicinal e seus principais fitoconstituintes

*1.2.2.1 O Gênero *Psychotria* e sua distribuição*

Segundo Moura e Maruo (2014), o gênero *Psychotria* é um importante membro da família Rubiaceae. Abrange cerca de 1650 espécies de árvores e arbustos amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Contribui para a diversidade florística e compreende uma significativa proporção da vegetação de sub-bosque em muitas florestas tropicais.

A presença de alcaloides polindolínicos derivados da condensação de várias unidades de N-metilriptamina é responsável pela caracterização química do gênero (BOTH et al., 2002).

De acordo com Nery (2014), *Psychotria* é o maior gênero das Rubiáceas e um dos maiores das Fanerógamas. As espécies de Rubiaceae, e particularmente de *Psychotria*, produzem frutos consumidos por vertebrados, incluindo pássaros.

Psychotria é um grande gênero de arbustos e pequenas árvores, e sua classificação taxonômica, relacionada logo abaixo na Tabela 1, é um pouco complicada. Não surpreendentemente, várias outras espécies tropicais do Novo Mundo são morfologicamente semelhantes à chacrona, e pelo menos alguns destes também podem ser utilizados como aditivos em ayahuasca (SCHULTES; HOFFMANN, 1980).

Tabela 1 – Classificação Taxonômica

CATEGORIA	TÁXON
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Gentianales
Família	Rubiaceae
Gênero	Psychotria
Espécie	Psychotria viridis

FONTE: SCHULTES; HOFFMANN (1980).

1.2.2.2 Importância Medicinal e seus Principais Fitoconstituintes de *Psychotria*

De acordo com o trabalho de Both (2005), o gênero *Psychotria* é conhecido pela presença de alcaloides cujo aminoácido de origem é o triptofano. Estes são, na maior parte, indol não-iridóidicos, com destaque no grupo dos triptamínicos (N,N-dimetiltriptamina, N-metiltriptamina), poli-indólicos (chimonantina, meso-chimonantina, hodgkinsina, psicotridina, iso-psicotridina A, B e C, quadrigemina A, B e C) ou derivados metil-triptamínicos e β -carbolinas (tetraidro- β -carbolina), não havendo relação com monoterpenos. Uma exceção é a espécie *Psychotria correae* que produz alcaloides indol-iridóidicos, derivados da strictosidina. Igualmente, a espécie *P. leiocarpa* Cham. Et Schlecht produz N, β -D-glicopiranosilvincosamida, um alcaloide indol-iridóidico, N-glicosilado.

Ainda segundo Both (2005), os estudos etnofarmacológicos abrangem 10% das espécies de *Psychotria* conhecidas e foram realizados com plantas de diferentes origens geográficas, mostrando que elas são utilizadas na medicina tradicional para uma grande variedade de indicações terapêuticas. Os mais frequentes usos internos referem-se a afecções do aparelho reprodutor feminino, além do emprego como auxiliar no pré e pós-parto, doenças nos brônquios e distúrbios gastrintestinais. Quanto ao uso externo, têm sido relatados usos em afecções cutâneas, “tumores”, úlceras, distúrbios oculares, como cataplasmas e banhos no tratamento de febre e em casos de dores de cabeça e dores de ouvido. Não parecem existir padrões de indicações terapêuticas regionais, exceto quanto a *Psychotria* da América do Sul, usada como aditivo a bebidas alucinógenas.

O gênero *Psychotria* têm despertado um grande interesse devido à presença de alcaloides e outras substâncias bioativas. No Brasil, principalmente, a pesquisa desse gênero foi motivada pelo uso de duas espécies, *P. viridis* e *P. carthagenensis*, junto com o decocto

(cozimento) de *B. caapi*, na preparação do daime, uma bebida alucinógena, utilizada para fins religiosos e medicinal pelos caboclos da Amazônia (BOTH, 2005).

Tabela 2 - Partes utilizadas para 15 espécies de *Psychotria*

Espécie	Parte utilizada	Uso	Indicação	Hábito	Fitoquímica	Farmacologia
<i>Psychotria brachyceras</i> Müll. Arg.					brachycerina	
<i>Psychotria bracteocardia</i> (DC.) mata-rato	Entre casca	Veneno	Matar rato			
<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq. orelha-de-onça	Folhas	Rituais religiosos	Ayahuasca	Arbusto		Antifúngica, antibacteriana
<i>Psychotria coccinea</i> Poit. ex DC roxinha	Toda a planta	a Medicinal	Inchações, dores no fígado e nos rins	Arbusto		
<i>Psychotria colorata</i> (Willd. ex R. & S.) Müll. Arg. maria-da-mata	Folhas	Medicinal	Combate a dor	Arbusto		
<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes ipecacoanha, pepaconha	Raízes e rizomas	e Medicinal	Malária, doença respiratória, gastrite, disenteria, verme, câncer, dentição, vomitivo.	Herbáceo	Emetina, psicotrina.	cefelina, Anti-inflamatório
<i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schltdl.					N-β-d-glucopiranosilavincosamida, iridóidesasperulosídeo e acetilasperulosídeo	
<i>Psychotria microlabrasta</i> L. (Sphalm)						Atividade antimicrobiana
<i>Psychotria myriantha</i> Mull. Arg.					myrianthoisinas A e B, e ácido strictosidínico	
<i>Psychotria nuda</i> (Cham. & Schltdl.) Wawra					strictosamida	
<i>Psychotria prunifolia</i> (Kunth) Steyer					strictosamina, prunifolina, prunifoliona, EPP26.2 e EPP28.1	Atividade citotóxica e antitumoral; razoável atividade antifúngica.
<i>Psychotria rigida</i> H.B.K. erva-de-rato	Toda a planta	a Veneno	Matar rato	Herbáceo		
<i>Psychotria suterella</i> Müll. Arg.					lialosídeo e strictosamida	
<i>Psychotria umbellata</i> Thonn.					umbelatina e psicolatina	Atividade ansiolítica e anticonvulsivante
<i>Psychotria viridis</i> Ruiz et Pavon chacrona	Folha	Rituais religiosos	Cerimônias e ayahuasca	Subarbusto	N,N-dimetiltriptamina	

FONTE: SOUZA et al. (2013).

1.2.3 A Espécie *Psychotria viridis*

Segundo Salgado et al. (2012), a espécie *Psychotria viridis* Ruiz & Pavon, denominada de rainha ou chacrona, ocorre espontaneamente na Floresta Amazônica, além do México e das Antilhas, e da Bolívia até o sudeste do Brasil e a Argentina, sendo que, atualmente, pode ser encontrada em várias regiões do mundo, principalmente por meio de plantações com finalidades religiosas.

A espécie *Psychotria viridis* contém o alcaloide indólico N,N-dimetiltriptamina (DMT), com concentrações de 0,1% a 0,66%, que atua sobre os receptores da serotonina (SALGADO et al., 2012), e ela foi primeiramente descrita por Ruiz & Pavón em 1779 (PIRES et al., 2010).

As folhas do arbusto *Psychotria viridis* Ruíz & Pavón utilizada em conjunto com as folhas do cipó *Banisteriopsis caapi* formam um chá alucinógeno conhecido como *Ayahuasca*, considerada pelas tribos como uma bebida sagrada em sua cultura religiosa, utilizada pelo pajé para aconselhamento, cura material e espiritual e reencontro com seus antepassados, fato este que ocorre até os dias atuais (CÁRDENAS; GÓMEZ, 2004; PEREIRA, 2003).

Baseando-se no trabalho feito por Salgado et al. (2012), a ayahuasca é usada tradicionalmente por etnias brasileiras como Ashaninka, Jaminawá, Katukina, Kaxinawá, Marubo e Yawanawá, e pode ser ingerida sem ingredientes adicionais ou em associação com pelo menos outras 25 espécies, a maior parte delas pertencente aos gêneros *Banisteriopsis* e *Psychotria*, que, por conterem os referidos alcaloides β -carbolinas e os DMT, respectivamente, potencializam a força e prolongam os efeitos da intoxicação.

As religiões cristãs que introduziram a ayahuasca como pilar ritualístico: o Santo Daime, a Barquinha e a União do Vegetal (UDV), apareceram no Brasil na década de 1930 (MOTTA, 2013).

A palavra ayahuasca é originária da língua quéchua e quer dizer: “aya”: “pessoa morta, espírito” e “waska” que significa “corda, liana, cipó”; logo, traduzindo-se para o português ficaria “corda dos mortos” (PIRES et al., 2010). Logo abaixo, podemos observar a preparação do chá de ayahuasca (Figura 1) por uma das religiões cristãs, a União do Vegetal.

Figura 1 – Preparação do chá de ayahuasca pela União do Vegetal



FONTE: MOTTA (2013).

Palidez, sudorese, midríase, salivação, náuseas, vômitos, diarreia, hipertensão, palpitação, taquicardia, tremores, excitação e alteração na temperatura corpórea, também são relatados ansiedade, delírios parecidos com sonhos, sensação de vigilância e estimulação, alterações no processo de pensamento, concentração, atenção, memória e julgamento, alteração da percepção da passagem do tempo, mudanças na percepção corporal, alterações na expressão emocional, mudanças no significado de experiências anteriores (“insights”), sentimentos de rejuvenescimento, sensação da “alma se desprendendo do corpo“, sensação do contato com locais e seres sobrenaturais e alterações perceptuais atingindo vários sentidos, onde alucinações e sinestésias são comuns, em alguns casos perda de memória, confusão mental e desorientação, esses são os efeitos neuroquímicos observados por usuários do chá de ayahuasca (MOTTA, 2013).

Segundo alguns autores e também Salgado et al. (2012), o chá pode causar problemas, como, por exemplo, náusea e desidratação em decorrência do vômito e diarreia e a síndrome serotoninérgica.

Alguns pesquisadores têm sugerido a utilização dessa bebida em aplicações terapêuticas como um complemento ao tratamento para vícios da cocaína, alcoolismo e depressão.

Estudos recentes têm revelado que a ingestão da ayahuasca diminuiu os sintomas do mal de Parkinson em pacientes com esta doença (SERRANO-DUENAS et al., 2001). Em outro estudo, Grob et al. (1996), entrevistou 15 praticantes da União do Vegetal, 11 deles eram usuários do álcool de moderados a severos antes de engajar na nova religião, 5 deles relataram comportamento violento associado ao uso do álcool, 4 tinham envolvimento com outras drogas que incluíam cocaína e anfetamina, 8 eram fumantes compulsivos. Todos eles largaram seus vícios após o início da ingestão da ayahuasca, sem danos na personalidade ou na cognição.

Prova de dependência da Ayahuasca é inexistente, na verdade, alguns têm sugerido a utilização em aplicações terapêuticas como um complemento ao tratamento para vícios (MCKENNA, 2004). Mabit (1996) propôs o uso medicinal da ayahuasca no tratamento do vício da cocaína. Labigalini (1998) descreveu o uso da bebida por ex-alcoólicos em um contexto religioso.

No Brasil, segundo Santos (2007), a ingestão desta bebida em práticas religiosas, como no catolicismo popular, espiritismo kardecista, cultos afro e xamanismo, é juridicamente legitimado desde 1986.

Figura 2 – Chacrana (*Psychotria viridis*)



FONTE: (a) Disponível em: < <http://www.thepsychonaut.org/entheopedia/ayahuasca/> > Acessado em 27 de Fevereiro de 2015. (b) O AUTOR (2014).

Nome Científico: *Psychotria viridis* Ruiz & Pavón

Nomes Populares: Folha-da-Rainha, Chacrona, Chacrana, Kawa

Ocorrência: Em toda floresta amazônica (Brasil, Peru, Colômbia, Equador e Bolívia)

Usos etnofarmacológicos: Depurativa, dores de estomago, antirreumática, tônica e usada contra lumbago.

Figura 3 – Face superior e inferior da folha de *P. viridis*



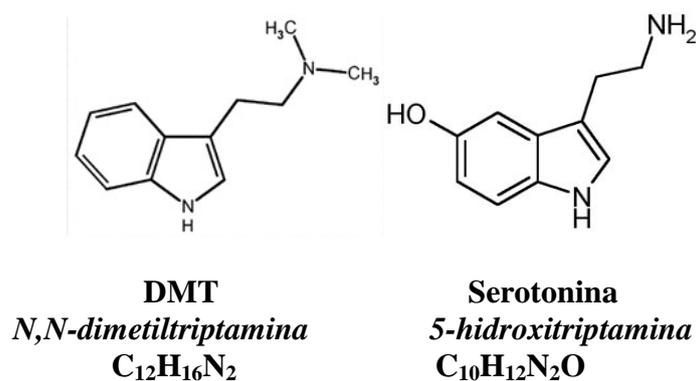
FONTE: SERPICO; CAMURÇA (2006).

Descrição: É um arbusto comum de climas tropicais e úmidos, podendo crescer até se tornar uma pequena árvore. Tendo, em média, 2m a 3m de altura, 12 cm a 15 cm de comprimento por 4 cm a 5 cm de largura, de disposição oposta e cruzada, nervação penínérvea, possui bainha semiamplexicaule e pecíolo curto, limbo simples e inteiro, liso na parte superior e com presença de domácias na parte inferior, e apresenta folhas completas e lanceoladas que variam de tons de verde-claro ao verde-escuro (SOUZA; LORENZI, 2005). As inflorescências são cimosas, com flores pouco vistosas, bissexuadas, diclamídeas, monoclinas, de simetria actinomorfa, cálice pentâmero dialissépalo, gamopétala e com ovário ínfero. O fruto é do tipo drupa com o epicarpo de coloração avermelhada quando maduro e possui duas sementes convexas em sua parte dorsal e aplanadas em sua parte ventral (SOUZA; LORENZI, 2005).

Princípios Ativos: O princípio ativo encontrado nas folhas é um derivado triptamínico a N,N-dimetiltriptamina (DMT), um alcaloide indol muito semelhante a serotonina (5HT) (Figura 4) tanto na estrutura molecular como na atividade (SERPICO; CAMURÇA, 2006).

Serpico; Camurça (2006) citaram em seu trabalho a pesquisa realizada por Callaway que afirmou que os níveis de concentração de DMT nas folhas variavam de acordo com o horário da colheita. Os níveis mais altos foram encontrados em folhas colhidas ao anoitecer (9,52 mg/g de DMT) e na madrugada (8,97 mg/g de DMT), ocorrendo uma depressão por volta das 10h (8,01 mg/g de DMT) e apresentando menor quantidade ao meio dia (5,57 mg/g de DMT).

Figura 4 - Estruturas químicas da DMT e da Serotonina



FONTE: SERPICO; CAMURÇA (2006).

1.2.4 Óleo Essencial

Desde os tempos remotos é conhecido o uso dos óleos essenciais como agentes medicinais. Há registros pictóricos de seis mil anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas à cura de males, às unções da realeza, e à busca de bem-estar físico, através dos aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, folhas, flores, sementes etc. As substâncias aromáticas também já eram populares nas antigas China e Índia, centenas de anos antes da era cristã, quando eram incorporados em incenso, poções e vários tipos de acessórios, usados diretamente sobre o corpo. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação, introduzido pelos cientistas muçulmanos, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos (TYRREL, 1990).

As plantas possuem substâncias odoríferas que por sua vez apresentam funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura, entre outras (LUPE, 2007).

Segundo Rodrigues (2002), a palavra “óleo essencial” é empregada para nomear líquidos oleosos voláteis dotados de aroma forte, quase sempre agradável, extraídos, de plantas por alguns processos específicos.

De acordo com Simões et al. (2003), os óleos essenciais possuem também como características:

- Uma aparência oleosa à temperatura ambiente;
- Aroma agradável e intenso da maioria dos óleos;
- Solubilidade em solventes orgânicos apolares;
- Sabor geralmente acre (ácido) e picante;
- Cor: quando recentemente extraídos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, são poucos os óleos que apresentam cor, como o óleo volátil de camomila de coloração azulada pelo seu alto teor de azuleno;
- Estabilidade: em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais;
- A maioria possui índice de refração e são opticamente ativos;
- Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até compostos com enxofre. Na mistura, tais

compostos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades ou traços.

No entanto, sua principal característica consiste na volatilidade que o difere dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes como óleo de soja, mamona, girassol etc (TRANCOSO, 2013).

Nas últimas décadas, o descobrimento e a elucidação das centenas de componentes químicos dos óleos essenciais, foi possível entender a complexidade e a enorme diversidade que existe neste grupo de produtos naturais, o qual consiste normalmente de mono (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), fenilpropenos e outros componentes voláteis, além de moléculas menores, como alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta (MACHADO; JUNIOR, 2011).

Mono e sesquiterpenos são os principais componentes dos óleos essenciais, enquanto os outros terpenos são componentes de bálsamos, resinas, ceras e borrachas (BERGAMASCHI, J.M. Disponível em: < <http://www.terpenoil.com.br/tecnologia/terpenos.pdf> > Acessado em: 19 de Fevereiro de 2015).

Um dos terpenos mais conhecido é o d-limoneno, de base cítrica, presente no suco e casca da laranja, extraído por destilação do óleo da laranja, sendo Brasil, México e EUA os principais produtores. Mas, de acordo com Bohlmann e colaboradores há mais de 1.000 monoterpenos, mais de 7.000 sesquiterpenos e mais de 3.000 diterpenos (BERGAMASCHI, J.M. Disponível em: < <http://www.terpenoil.com.br/tecnologia/terpenos.pdf> > Acessado em: 19 de Fevereiro de 2015).

Tabela 3 - Unidade de Isoprenos e número de carbonos de cada classe de terpenos

Terpenos	Unidades Isoprenos	Átomos de Carbono
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Sesterpenos	5	25
Triterpenos	6	30
Carotenóides	8	40
Borracha	> 100	> 500

FONTE: BERGAMASCHI, J.M. Disponível em: < <http://www.terpenoil.com.br/tecnologia/terpenos.pdf> > Acessado em: 19 de Fevereiro de 2015.

Oliveira et al. (2006), afirma que os óleos essenciais apresentam composição química complexa e são originados do metabolismo secundário das plantas, e estão localizados em estruturas secretoras especiais, como cavidades, canais, pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas. Eles podem ser armazenados em flores, folhas, casca do tronco, madeira, raízes, frutos e sementes, e pode variar em sua composição de acordo com a localização em uma única espécie (SOUZA et al., 2010).

A extração de óleos essenciais (OE) de plantas ocorre através da técnica de arraste a vapor, na grande maioria das vezes, e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil dominam o mercado de exportação, também ao lado da Índia, China e Indonésia (BIZZO et al., 2009).

De acordo com Santos et al. (2004), diversos métodos podem ser aplicados no processo de extração de óleo essencial, como a hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleuragem, gases supercríticos e microondas. Dentre esses, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação que se divide em duas técnicas – arraste a vapor e coobação, que consiste em uma destilação repetida, a fim de se obter maior concentração dos princípios ativos.

O Soxhlet é utilizado principalmente para extrair substâncias utilizando solventes voláteis, como o hexano, etanol, clorofórmio etc. Em cada ciclo de operação o solvente entra em contato com o material vegetal. Este método possibilita uma extração muito eficiente, empregando quantidade reduzida de solvente (RODRIGUES, 2013).

Pistelli e Silva (2012), afirmaram que no caso das produções de pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger. Utilizando o aparelho Clevenger para extração de óleos vegetais, obtêm-se resultados econômicos mais viáveis e excelente qualidade no produto final.

A hidrodestilação é um procedimento de obtenção de óleos essenciais que consiste em submergir diretamente o material vegetal a tratar (intacto ou ocasionalmente triturado [turbodestilação]) em um alambique cheio de água em que a continuação se submete a ebulição. Os vapores heterogêneos se condensam sobre uma superfície fria e o óleo essencial se separa por diferença de densidade. Em uma variante do processo o material vegetal se tritura *in situ* (turboextrator) (BRUNETON, 2001).

Segundo Rodrigues (2002), duas das técnicas cromatográficas empregadas com a finalidade de analisar os óleos essenciais extraídos para identificar e quantificar os componentes presentes no mesmo são a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

Na CG, a amostra injetada no cromatógrafo volatiliza, permitindo a separação e identificação dos compostos individuais através do tempo de retenção relativo da amostra quando comparados com padrões. Na CG/EM, além da separação dos componentes, obtém-se espectros de massa de cada pico, que também podem ser comparados com espectros de massas de padrões ou com espectros constantes na literatura ou na biblioteca do equipamento (RODRIGUES, 2002).

De acordo com Santos et al. (2004), a importância econômica que as plantas aromáticas representam à Região Amazônica está associada à aplicação de seus óleos essenciais e uso de seus aromas em processos tecnológicos.

Esses óleos possuem grande importância industrial e são utilizados nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentícia e farmacêutica, sendo geralmente os componentes de ação terapêutica de plantas medicinais (TRANCOSO, 2013). São usados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e orais e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO et al., 2009).

Baseado no trabalho de Nogueira e Lourenço (2007) foi estimado que a produção mundial de óleos essenciais fosse superior a 42.000 toneladas, dos quais 35% são provenientes de frutos cítricos, 33% de plantas cultivadas, 1% de plantas espontâneas e 31% de outras fontes.

Perdendo apenas para os EUA e a França, o Brasil é o 3º maior exportador de óleos essenciais do mundo, com aproximadamente US\$ 147 milhões, tendo ultrapassado o Reino Unido em 2007. No entanto, desse volume, 91% consiste em óleo essencial de cítricos, principalmente laranja (80%) (SOUZA et al., 2010).

Os maiores consumidores de óleos essenciais no mundo são os EUA (40%), a União Européia – UE (30%), sendo a França o país líder em importações e o Japão (7%), ao lado do Reino Unido, Alemanha, Suíça, Irlanda, China, Cingapura e Espanha, de acordo com a base de dados americana COMTRADE (United Nations Commodity Trade Statistics Database) (2005), sendo na Tabela 4 listado os principais óleos comercializados no mercado mundial.

Tabela 4 – Os 18 principais óleos essenciais no mercado mundial

Óleo Essencial	Espécie
Laranja (Brasil)	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Menta Japonesa (Índia)	<i>Mentha arvensis</i> L. f. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes
Eucalipto (tipo cineol)	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill., <i>E. polybractea</i> R.T. Baker e <i>Eucalyptus spp.</i>
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt e <i>C. nardus</i> (L.) Rendle
Hortelã-pimenta	<i>Mentha x piperita</i> L.
Limão	<i>Citrus limon</i> (L.) N.L. Burm.
Eucalipto (tipo citronella)	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. e L. M. Perry
Cedro (EUA)	<i>Juniperus virginiana</i> L. e <i>J. ashei</i> Buchholz
Lima destilada (Brasil)	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm. & Panz.) Swingle
Spearmint (nativa)	<i>Mentha spicata</i> L.
Cedro (China)	<i>Chamaecyparis funebris</i> (Endl.) Franco
Lavandim	<i>Lavandula intermedia</i> Emeric ex Loisel
Sassafrás (China)	<i>Cinnamomum micranthum</i> (Hayata) Hayata
Cânfora	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl.
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> L.
Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i> Macfady
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.

FONTE: BIZZO et al. (2009).

De acordo com Bizzo et al. (2009), o mercado mundial gira em torno de US\$ 15 milhões/ano, apresentando crescimento aproximado de 11% por ano (ITC, 2005; COMTRADE, 2005). A partir dos países em desenvolvimento, a importação de óleos essenciais no ano de 2004 pela União Europeia, pode ser vista na Tabela 5. O Brasil aparece entre os principais países fornecedores dos óleos de laranja, limão, lima e outros cítricos, contribuindo no período com 5% do total de óleos importados e encontra-se entre os grandes exportadores internacionais.

Tabela 5 - Importação de óleos essenciais pela UE, em 2004, de países em desenvolvimento

OE	Importação (US\$ milhões)	País
Laranja	62	Brasil (38%), Cuba (2%), África do Sul (1%)
Limão	57	Argentina (50%), México (4%), Brasil (3%)
Hortelã-pimenta	55	Índia (12%), China (3%)
Outras mentas	38	Índia (22%), China (15%), Marrocos (1%)
Outros cítricos	37	Brasil (5%), Cuba (5%)
Lavanda	19	África do Sul (20%)
Lima	18	China (3%), Geórgia (1%)
Bergamota	15	México (33%), Peru (14%), Brasil (4%), Argentina (2%)
Cravo-da-índia, Melaleuca (niauli)	15	Costa do Marfim (4%)
Gerânio	8	Madagascar (26%), Comores (18%), Maiote (9%)
Vetiver	8	Egito (34%), China (24%), África do Sul (2%)
Jasmin	5	Haiti (56%), Indonésia (9%), Índia (2%)
Total	601	Egito (44%), Índia (28%), Madagascar (1%) China (6%), Brasil (5%), Argentina (5%), Índia (5%)

FONTE: BIZZO et al. (2009).

Diversos patógenos vêm desenvolvendo resistência aos antimicrobianos e esse problema tem crescido a cada dia, tornando-se de suma importância à pesquisa de novos agentes para o combate de infecções. Novas fontes de substâncias obtidas de espécies nativas do Brasil, que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, podem vir a ser uma alternativa viável, de baixo custo e de fácil acesso pelas comunidades carentes, da região onde tais espécies são encontradas. As plantas produzem substâncias para sua própria defesa em resposta a um ataque patogênico, muitas sintetizam e emitem inúmeros compostos voláteis com a finalidade de defesa e atrair seus polinizadores (COSTA et al., 2008).

Devido a isso, os óleos essenciais possuem diferentes propriedades biológicas, como a ação larvicida, (RAJKUMAR et al., 2010), atividade antioxidante (WANNES et al., 2010), responsável por proteger especialmente membranas lipídicas dos danos produzidos pelo estresse oxidativo, considerado uma causa principal do envelhecimento, das doenças degenerativas e do câncer (SOUZA et al., 2010), ação analgésica e anti-inflamatória, (MENDES et al., 2010), fungicida, (CARMO et al., 2008) e atividade antitumoral. (SILVA, 2008).

Ainda, tem sido estabelecido cientificamente, de acordo com Oliveira et al. (2006), que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas.

1.2.5 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG/EM)

Segundo Oliveira (2014), a cromatografia é um método empregado de forma ampla para separar, identificar e quantificar constituintes químicos em misturas complexas, pode ser aplicada aos componentes relativamente voláteis sendo amplamente utilizada para se estabelecer a pureza de compostos orgânicos. Nenhum outro método de separação é tão eficiente e de aplicação tão generalizada como a cromatografia.

Trata-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho e pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA et al., 2008).

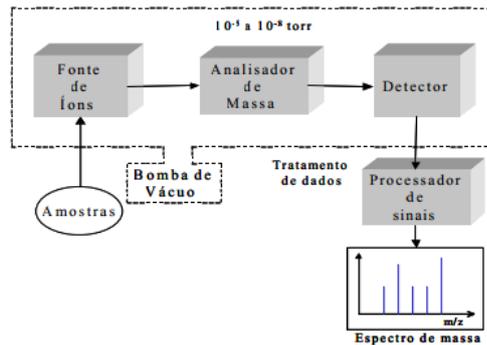
Ionização por impacto de elétrons (“electron ionization”) - IE e a ionização química (“chemical ionization”) – IQ são os métodos de ionização mais empregados em CG-EM (CHIARADIA et al., 2008).

Atualmente, a espectrometria de massa (MS – Mass Spectrometry) é uma técnica microanalítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra, ou seja, é uma poderosa ferramenta física que caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga de seus íons. A espectrometria de massa é uma das mais importantes ferramentas analíticas disponíveis aos cientistas, uma vez que é capaz de fornecer informação sobre: i) a composição elementar de amostras; ii) a estrutura molecular; iii) a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; iv) a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras, e ainda é utilizada em diversos estudos nas áreas de Biologia, de Ciências Médicas e de Ciências Tecnológicas (RODRIGUEZ, 2003).

Como podemos ver na Figura 5, são três os componentes principais: uma fonte de íons, o analisador de massa e o detector. De acordo com Rodriguez (2003), na fonte de íons, os componentes de uma amostra são convertidos em íons, pela ação de um agente ionizante, os íons positivos ou negativos são imediatamente acelerados em direção ao analisador de

massa. A função do analisador de massa é separar tais íons de acordo com a sua relação massa-carga (m/z). Os espectrômetros de massa podem ser classificados em várias categorias dependendo da natureza do analisador de massa. Finalmente um detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados, armazenados na memória de um computador e mostrados em uma tela.

Figura 5 - Componentes básicos de um espectrômetro de massa



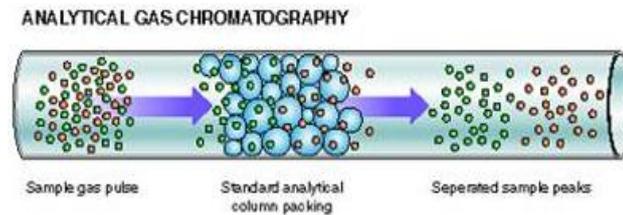
FONTE: RODRIGUEZ (2003).

A cromatografia gasosa (“gas chromatography”) - CG e a cromatografia líquida de alta eficiência (“high performance liquid chromatography”) – CLAE são as técnicas cromatográficas mais comumente acopladas à espectrometria de massas (“mass spectrometry”) – EM. A combinação com outras técnicas de separação, como a eletroforese capilar, a cromatografia em camada delgada e a cromatografia de permeação em gel é possível, mas usada com menor frequência (CHIARADIA et al., 2008).

Segundo Costa e Baptista (2009), a Cromatografia Gasosa (CG) é uma técnica para separação e análise de misturas de substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel (FM) ou gás de arraste – específico para cada detector. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária FE (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura.

As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas no gás de arraste e passam por um detector; dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa (COSTA; BAPTISTA, 2009).

Figura 6 - Esquema do funcionamento de uma cromatografia gasosa



FONTE: COSTA; BAPTISTA (2009).

1.2.6 Ressonância Magnética Nuclear

De acordo com Toma (2009), todas as técnicas de espectroscopia constituem um exemplo de interação da radiação eletromagnética com a matéria. Particularmente, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) está baseada na medida da absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência de cerca de 4 a 900 MHz. Diferentemente das absorções no ultravioleta, visível e infravermelho, núcleos dos átomos, em vez de elétrons externos, estão envolvidos no processo de absorção. Adicionalmente, para fazer com que os núcleos desenvolvam os estados de energia necessários para que a absorção aconteça, é necessário colocar o analito em um campo magnético intenso (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Baseando-se na pesquisa de Guilén e Ruiz (2001), o espectro de RMN H^1 é uma série de sinais agudos cujas frequências podem ser relacionadas à natureza química dos átomos de hidrogênios (grupos metil, metilenos etc.) e cujas intensidades são diretamente relacionadas à população de hidrogênios que gerou o sinal. Hidrogênios em ambientes eletrônicos diversos mostram diferentes deslocamentos químicos e a intensidade do sinal é proporcional à quantidade de hidrogênios. Portanto, o espectro de RMN H^1 dos triacilgliceróis é bem resolvido, observando-se sinais distintos e característicos (REDA, 2004).

De acordo com Silva (2005), as técnicas cromatográficas utilizadas nas análises dos produtos de transesterificações (cromatografia gasosa, CG; cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC) apresentam resultados precisos nas determinações. Mas, como desvantagens: requerem um longo tempo de análise, além de um contínuo controle de fluxo da fase móvel e da temperatura; necessidade de calibração e da utilização de padrões para as análises; e, muitas vezes, de um pré-tratamento das amostras a serem analisadas.

Gelbard et al. (1995) mostraram que, para uma análise quantitativa, os resultados obtidos com a técnica de espectroscopia de RMN- H^1 apresentaram uma boa concordância

com os resultados obtidos através das técnicas cromatográficas desde que as integrais dos sinais nos espectros de RMN- H^1 fossem feitas com precisão.

Do espectro de RMN de H^1 integrado, obtém-se a medida direta do grau de insaturação de modo preciso (SOUZA, 2007).

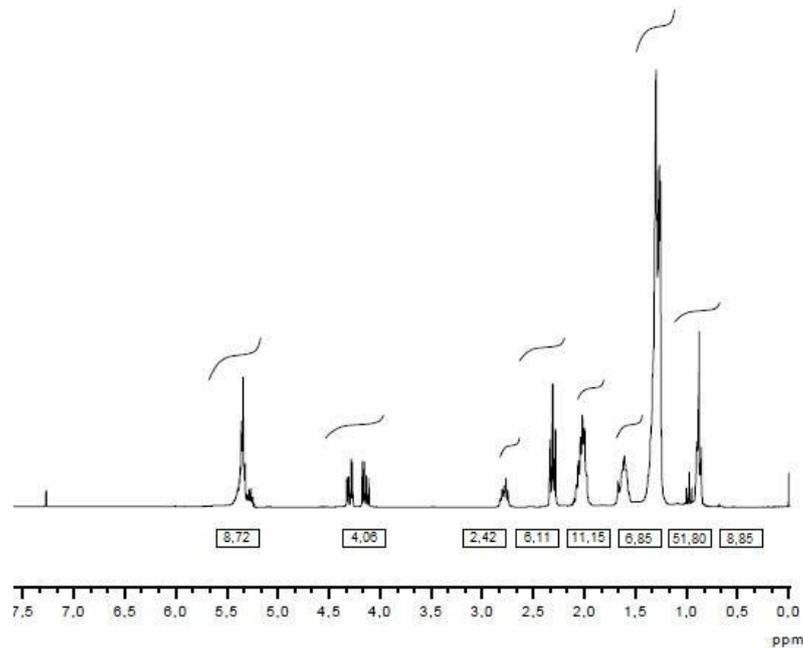
O espectro do triglicerol, usado na transesterificação, assim como os ésteres formados, apresentam boa resolução, pois o espectro integrado de H^1 é quantitativo, permitindo determinar diversos parâmetros indicadores da qualidade do produto, como grau de insaturação, a massa molecular média, índice de iodo e o perfil de ácidos graxos insaturados, de maneira rápida e simples (VOIGT, 2009).

O fenômeno de RMN pode ser observado em qualquer espécie que possua um spin magnético total $I > 0$ (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Em geral, o fenômeno é observado em isótopos com número ímpar de prótons ou nêutrons. O hidrogênio é a espécie mais explorada nas aplicações com RMN devido a sua abundância isotópica e sensibilidade. Então segundo Solomons e Fryhle (2001), quando compostos contendo hidrogênio e carbonos são submetidos a um campo magnético muito forte e, ao mesmo tempo se irradia este campo com energia eletromagnética, os núcleos desses compostos podem absorver a energia através de um processo denominado ressonância magnética. Essa absorção de energia é quantizada e produz um espectro característico para o composto.

Segundo Reda (2004) em geral, os métodos analíticos oficiais disponíveis para a análise de óleos são pouco sensíveis, morosos, de baixa confiabilidade e seletividade, ou seja, os métodos instrumentais apresentam grande vantagem sobre os tradicionais (volumétricos) pela sua capacidade em necessitar apenas de quantidades mínimas de amostra e terem uma extrema sensibilidade e reprodutibilidade nas análises, além de serem mais precisos e exatos.

Outros parâmetros químicos como índice de saponificação (REDA, 2010) e índice de acidez (REDA; CARNEIRO; CARNEIRO, 2005) também podem ser obtidos por meio do espectro integrado de RMN H^1 . A Figura 7 apresenta um espectro de RMN H^1 do óleo de canola.

Figura 7 - Espectro de RMN H^1 do óleo de canola com suas integrações



FONTE: REDA (2004).

De acordo com Souza (2007), os métodos instrumentais apresentam grande vantagem sobre os tradicionais (volumétricos) pela sua capacidade em necessitar apenas de quantidades mínimas de amostra e terem uma extrema sensibilidade e reprodutibilidade nas análises, além de serem mais precisos e exatos. O estudo de óleos, gorduras e lipídios dos alimentos utilizando o método de RMN H^1 tem crescido bastante por causa da grande quantidade de informação que os instrumentos de RMN podem fornecer em um curto espaço de tempo (GUILLEN; RUIZ, 2001).

1.2.7 Análises Físico-químicas

Segundo Correia (2009), as expressões das propriedades físicas ou químicas daquelas substâncias, os índices, são as determinações feitas no estudo de óleos e gorduras. Assim, para avaliação e qualificação de óleos são determinados os índices de iodo, acidez, saponificação, peróxidos e as propriedades físicas.

Para a caracterização do extrato bruto de *Psychotria viridis* por hexano, estudado neste trabalho foi realizado as seguintes determinações: índice de iodo, acidez, saponificação, éster e massa molecular média.

1.2.7.1 Índice de Acidez (IA)

O índice de acidez é definido como o peso de hidróxido de potássio, em mg, necessário para neutralizar um grama de amostra e foi expresso neste estudo em % de ácido oléico (MENDONÇA et al., 2008).

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio. A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. Estes são freqüentemente expressos em termos de índice de acidez, podendo ser também em mL de solução normal, por cento ou em grama do componente ácido principal, geralmente o ácido oléico. Os regulamentos técnicos costumam adotar esta última forma de expressão da acidez (IAL, 2008).

1.2.7.2 Índice de Saponificação (IS)

De acordo com Tofanini (2004), o índice de saponificação indica a quantidade relativa de ácidos graxos de alto e baixo peso molecular, podem ser obtidas com o índice de saponificação que é a quantidade de base necessária para saponificar definida quantidade de óleo e/ou gordura. É expresso em número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para saponificar um grama da amostra.

A reação de saponificação pode estabelecer o grau de deterioração e a estabilidade, além de verificar se as propriedades dos óleos estão de acordo com as especificações e identificar possíveis fraudes e adulterações (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

1.2.7.3 Índice de Éster (IE)

Segundo Vasconcelos (2002), índice de éster é definido como a massa de hidróxido de potássio, em miligramas, gasta na saponificação de um grama de amostra de óleo neutro. Nesta definição não está incluída a massa de hidróxido de potássio gasta na neutralização dos ácidos livres presentes na amostra de óleo.

1.2.7.4 Índice de Iodo (II)

O índice de iodo, também conhecido como número de iodo ou iodine value é um índice de qualidade com o qual se mede o grau de insaturação, ou seja, as quantidades de ligações insaturadas de um óleo ou gordura (LEAL, 2008).

De acordo com Reda (2004), quando o índice de iodo está reduzido o óleo se torna impróprio para o consumo humano.

1.2.8 Atividade Antimicrobiana

Uma das preocupações que despertou o interesse de diversos pesquisadores na procura por novas alternativas terapêuticas foi o grande aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos. As plantas medicinais estão dentre os produtos naturais, de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos, por proporcionarem grandes chances de obterem-se moléculas protótipos devido a sua diversidade de seus constituintes (SILVA et al., 2007).

Segundo Antunes et al. (2006), o conhecimento a respeito da resistência bacteriana, geralmente é fundamentado em microrganismos de importância epidemiológica, tais como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e fungos leveduriformes, responsáveis por diferentes processos etiológicos tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunodeprimidos.

Diversas pesquisas têm demonstrado algumas propriedades terapêuticas dos óleos, destacando as seguintes: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, antisséptica das vias respiratórias, larvicida, vermífuga e anti-inflamatória (NASCIMENTO et al., 2007).

Em muitos órgãos vegetais podem ser encontrados elementos voláteis que são os óleos essenciais. Eles estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos. E ainda, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (LIMA et al., 2006).

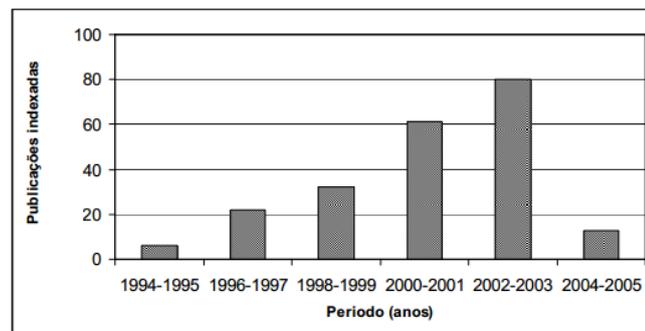
Segundo Bertini et al. (2005), esses óleos essenciais presente nas plantas apresentam uma atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos. A composição química de óleos essenciais depende do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e a técnica de

destilação. Eles podem apresentar ação tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas e ainda leveduras e fungos filamentosos. Ainda que indústrias farmacêuticas venham produzindo um número de novos antibióticos nas últimas três décadas, tem aumentado a resistência de microrganismos para essas drogas. Em geral, bactérias tem uma habilidade genética para transmitir e adquirir resistência para essas drogas, que são utilizadas como agentes terapêuticos.

Substâncias presentes em extratos e óleos essenciais que são produzidos pelas plantas como uma consequência do metabolismo secundário apresentam propriedades antimicrobianas que também são reconhecidas empiricamente há séculos e foram comprovadas cientificamente apenas recentemente em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (DUARTE, 2006).

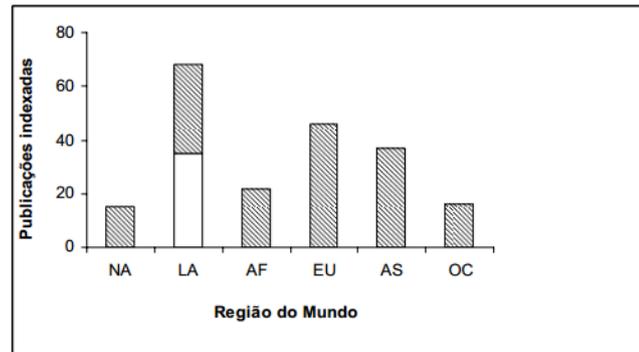
Ainda segundo Duarte (2006), ultimamente tem aumentado bastante o número de pesquisas a respeito da investigação de produtos naturais ativos contra microrganismos, conforme demonstrado na Figura 8,

Figura 8 - Número de publicações indexadas sobre atividade antimicrobiana ao redor do mundo na última década.



FONTE: DUARTE (2006).

Figura 9 - Número de publicações indexadas sobre atividade antimicrobiana por região do mundo na última década. (NA= América do Norte; LA = América Latina (Brasil em branco); AF = África; EU = Europa; AS = Ásia e OC = Oceania).



FONTE: DUARTE (2006).

que exibe o número de publicações indexadas (ISI) na última década. Este aumento foi maior na América Latina, Europa e Ásia (Figura 9). Quanto ao número de estudos, este levantamento não inclui os resultados de divulgações em reuniões científicas locais e teses da Academia, que geralmente não são publicados.

A identificação das substâncias antibióticas nas plantas ocorrem através da observação do crescimento de microrganismos colocados em contato com tecidos ou extratos destas plantas. Para detectar estas substâncias são utilizados vários métodos, que se diferenciam na sensibilidade ou em seus princípios. Os resultados obtidos serão influenciados pelo método escolhido, assim como pelos microrganismos usados nos testes. A parte da planta utilizada também interfere nos resultados bem como a forma de uso: suco, extrato (extração por água ou outros solventes) ou óleo essencial (SOUZA et al., 2000).

Segundo Gonçalves et al. (2005), os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenóides e óleos essenciais; alcalóides; lectinas e polipeptídios e substâncias fenólicas e polifenóis, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides, tanino e cumarinas.

É necessário utilizar como indicador de atividade antimicrobiana pelo menos uma espécie de microrganismos Gram-positivos ou Gram-negativos na avaliação da atividade de antimicrobianos (SOUZA et al., 2000).

De acordo com Ostrosky et al. (2008), hoje em dia, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da Concentração Mínima Inibitória (MIC), que é um parâmetro quantitativo que indica a quantidade mínima da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste. Um aspecto bastante relevante na determinação da MIC de extratos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (OSTROSKY et al., 2008).

A MIC consiste em determinar a concentração mais baixa do agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível do microrganismo testado. As diluições sucessivas cessam ao atingir-se a última concentração em que o óleo se mostra capaz de produzir ação antimicrobiana, ou seja, a formação do halo inibitório (OLIVEIRA, 2014).

1.2.8.1 Caracterização dos microrganismos testados

As infecções hospitalares são de grande importância para a saúde pública mundial, especialmente nos países em desenvolvimento, tanto que no Brasil, esforços tem sido direcionados para implementação de medidas preventivas (SOUZA, Disponível em: < http://www2.ucg.br/cbb/professores/69/Biomedicina/7_periodo/Microbiologia_II/Apostila%20de%20Microbiologia%20II.pdf > Acessado em 25 de Fevereiro de 2015).

Segundo Ferrareze et al. (2007), a ocorrência de pacientes hospitalizados colonizados ou infectados por microrganismos multiresistentes, ultimamente, tem merecido atenção das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e dos serviços de saúde.

Foi revelada no Brasil uma situação preocupante, com incidências de 4,1 a 13,2% com um nível de significância de 356.000 casos anuais, levando 61.000 a óbito. Reconhecendo este fato grave, o governo brasileiro, através da portaria nº 196 de 1982 do Ministério da Saúde, tornou obrigatória a existência de uma Comissão de Vigilância Epidemiológica em hospitais (SOUZA, Disponível em: < http://www2.ucg.br/cbb/professores/69/Biomedicina/7_periodo/Microbiologia_II/Apostila%20de%20Microbiologia%20II.pdf > Acessado em 25 de Fevereiro de 2015).

Vários outros fatores têm contribuído para o aumento da incidência da multiresistência microbiana segundo a Organização Mundial de Saúde como: pobreza, acesso inadequado aos medicamentos, propaganda de novas drogas, falha terapêutica, medicamentos falsificados e preferência pelos de largo espectro, deficiência na formação de profissionais de saúde, alimentos contaminados com microrganismos resistentes, a globalização e, finalmente, deficiência na vigilância da epidemiologia intra e extra hospitalar (FERRAREZE et al., 2007).

Bastonetes gram-negativos, não esporulados, com flagelos peritríquios móveis, exceto os sorotipos *Pullorum* e *Gallinarum*, aeróbicos e anaeróbicos facultativos, são características que definem as bactérias do gênero *Salmonella* sp. As colônias crescem perfeitamente em meios de cultura para enterobactérias, à temperatura de 37°C e pH entre 4,5 e 9,5; mede de 2-4 mm de diâmetro; são arredondadas com bordas lisas, um pouco elevadas e brilhantes. Seu perfil bioquímico é definido pela produção de ácido sulfídrico e gás carbônico a partir da glicose e outros carboidratos, exceto a lactose e a sacarose. Além disso, são oxidase e catalase positivas e capazes de se multiplicarem utilizando o citrato como única fonte de carbono. Produzem uma enfermidade aguda, de distribuição mundial, transmitida por alimentos, de importância tanto em saúde pública como em saúde animal devido ao impacto econômico que ocasiona (MARTINS, 2010).

Altamente disseminado na natureza e de suma importância em saúde pública, a *Salmonella Typhimurium* é um sorotipo ubiqüitário. Os surtos de DTAs, causados pela ingestão de diversos alimentos contaminados são os principais causadores da grande maioria dos casos de infecções humanas por *S. Typhimurium* (MARTINS, 2010).

Segundo Franco (2002), a espécie bacteriana denominada *Escherichia coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae, é um bastonete gram-negativo, não esporulado, oxidase negativa, móvel por flagelos peritríquios ou não móvel, anaeróbia facultativa capaz de fermentar a glicose e a lactose com produção de ácidos e gases. Fontes de carbono como acetato e glicose são usadas para crescimento, porém o citrato não pode ser utilizado. A glicose é fermentada a ácidos: láctico, acético e fórmico, sendo o ácido fórmico hidrolisado a hidrogênio e dióxido de carbono. Acetoína ou acetil metil carbinol não são formados. Conseqüentemente, *E. coli* produz β -galactosidase e indol mas não forma sulfito de hidrogênio ou hidrolisa a ureia.

A *Escherichia coli* apresenta uma temperatura de desenvolvimento entre 10 – 50°C sendo 37°C sua temperatura ótima e seu pH abaixo de 4,4 (FRANCO, 2002). Sendo descrita pela primeira vez por Dr Theodor Escherich em 1885 ao tentar isolar o agente etiológico da cólera, esta espécie pertence ao grupo de coliformes fecais (FRANCO, 2002).

Freire (2008) afirma que o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva com cerca de 1 μ m de diâmetro, a qual ocorre em pares, em pequenas cadeias ou em cachos similares aos de uvas, pertencente à família *Micrococcaceae*. É uma bactéria anaeróbica facultativa, catalase-positiva e oxidase-positiva e é dividida em diversos biótipos, tendo como bases testes bioquímicos e padrões de resistência.

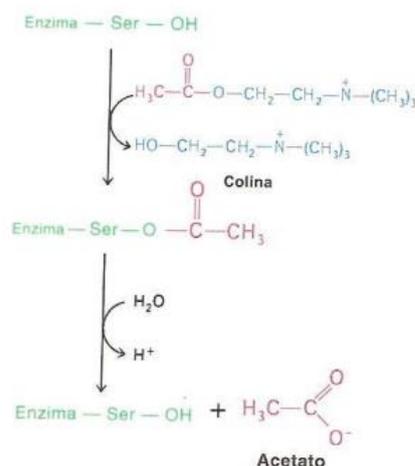
As enterotoxinas, que são proteínas de baixo peso molecular, são as culpadas por causar as intoxicações alimentares. Essas toxinas são termoestáveis e resistentes à cocção ou enzimas proteolíticas (FREIRE, 2008).

O *Staphylococcus aureus* é a espécie mais resistente de todas as bactérias patogênicas não formadoras de esporos. A temperatura de multiplicação está entre 7 e 48°C, sendo 37°C a temperatura ótima para o seu desenvolvimento. Suas enterotoxinas são produzidas quando cultivadas a temperaturas entre 10-48°C; contudo, a faixa de 35-40°C é considerada a ótima para sua produção. A faixa de pH ótima para o seu crescimento é de 6 – 7, sendo 4 e 10 seus limites mínimos e máximos, respectivamente. Para as suas enterotoxinas, o pH é na faixa de 6 (FREIRE, 2008).

1.2.9 Acetilcolinesterase

Segundo Colombi (2009), a Acetilcolinesterase é uma enzima que é responsável pela hidrólise da acetilcolina (um éster neurotransmissor), o mediador das sinapses colinérgicas no sistema nervoso, prevenindo contínuas passagens de impulsos, o que é vital para um normal funcionamento do sistema sensorial e neuromuscular, (Figura 10), tendo como produto o acetato e colina, com liberação de um próton.

Figura 10 - Clivagem das moléculas de acetilcolina



FONTE: COLOMBI (2009).

A dosagem da atividade da AChE, que é sensível a exposição a organofosforados e carbamatos, é frequentemente utilizada como biomarcador de efeito para a verificação dos efeitos primários da contaminação em diversos organismos (COLOMBI, 2009).

1.2.9.1 Doença de Alzheimer

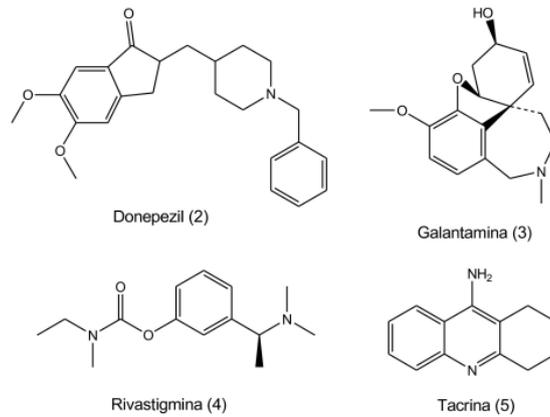
Patologia neurodegenerativa mais frequente associada à idade, a doença de Alzheimer (DA) apresenta manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas que resultam em uma deficiência progressiva e uma eventual incapacitação. Além das dificuldades de atenção e fluência verbal, outras funções cognitivas deterioram a medida que a patologia evolui, entre elas a capacidade de fazer cálculos, as habilidades visuoespaciais e a capacidade de usar objetos comuns e ferramentas (SERENIKI; VITAL, 2008).

Novamente segundo Sereniki e Vital (2008), têm sido realizados grandes esforços para a compreensão e tratamento da doença de Alzheimer; no entanto, a terapia atual está longe de ser satisfatória. De fato, embora o tratamento realizado através da administração de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) tenha consistentemente demonstrado eficácia sintomática e redução na progressão da patologia, esses medicamentos produziram algum tipo de melhora em aproximadamente 30- 40% dos pacientes portadores da doença de Alzheimer leve a moderada.

A doença de Alzheimer é ocasionada pela deficiência de neurotransmissores que são os responsáveis pela transmissão dos estímulos nervosos transmitidos de um neurônio a outro. A ACh (acetilcolina) é o principal neurotransmissor e está envolvida diretamente nos processos motores, cognitivos e de memória. A DA provoca a degradação de neurônios diminuindo a atuação da ACh, a qual é degradada pela ação de enzimas. Apesar da DA não ter cura, existe um tratamento que tem sido bastante eficaz em diminuir os sintomas desta doença que é o uso de fármacos inibidores da AChE (anticolinesterásicos) para evitar a degradação da ACh (PETRONILHO et al., 2011).

Apesar das substâncias atualmente utilizadas para reduzir os sintomas causados pela DA apresentarem efeitos colaterais, ainda assim destaca-se a grande necessidade do desenvolvimento de novos fármacos (PETRONILHO et al., 2011).

Figura 11 – Inibidores da AChE utilizados para o tratamento da doença de Alzheimer



FONTE: PETRONILHO et al. (2011).

No trabalho desenvolvido por Sereniki e Vital (2008), pode ser observado que os inibidores da acetilcolinesterase (tacrina, rivastigmina, donepezil, galantamina) alteram a função colinérgica central ao inibir as enzimas que degradam a acetilcolina (enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase), aumentando, assim, a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais. Desde a introdução desses medicamentos na prática clínica, os inibidores da AChE constituem o tratamento sintomático de escolha para a doença de Alzheimer.

1.2.10 Prospecção Fitoquímica

Segundo Bessa et al. (2013), a pesquisa fitoquímica é uma ferramenta bastante importante principalmente quando ainda não são dispostos todos os estudos químicos com espécies de interesse popular, tendo como objetivo conhecer os compostos químicos das espécies vegetais e avaliar sua presença nos mesmos, identificando grupos de metabólitos secundários relevantes e úteis enquanto marcadores químicos no monitoramento das plantas medicinais em processo de domesticação, na qualidade da matéria prima medicinal e na prospecção da biodiversidade ou bioprospecção.

As plantas são fontes de metabólitos secundários, que por sua vez são formados por vários caminhos biossintéticos que produzem moléculas com diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais, como ácidos graxos (gorduras) e seus ésteres, hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos e cetonas, compostos acetilênicos, alcaloides, compostos fenólicos e cumarinas (MARINS et al., 2011).

A prospecção da fitoquímica consiste em realizar a elucidação do perfil químico qualitativo, a fim de identificar os principais metabólitos secundários, possivelmente responsáveis pelo uso terapêutico da espécie (SCHETINGER, 2012).

Testes são realizados para a extração e identificação de grupos químicos ou metabólitos secundários, como os alcaloides, flavonoides, antraquinonas, cumarinas, saponinas, triterpenos e esteroides, taninos, resinas, entre outros.

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal. Os flavonoides apresentam-se em diversas formas estruturais. A maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três átomos de carbono entre elas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Os alcaloides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos. Diversas são as funções observadas em vegetais que possuem alcaloides. Uma possível função dessas substâncias seria a proteção contra a radiação ultravioleta, devido ao fato de, em sua maior parte, ser compostos com núcleos aromáticos altamente absorventes dessa radiação (HENRIQUES et al., 2000). São encontrados predominantemente nas angiospermas. Na sua grande maioria, possuem caráter alcalino, com exceções tal como colchicina, piperina, oximas e alguns sais quaternários como o cloridrato de larifolina (SIMÕES et al., 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar e avaliar a composição química do óleo essencial e do extrato bruto da folha, do caule e do fruto da planta *Psychotria viridis* e verificar a atividade biológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o óleo essencial e o extrato bruto da espécie vegetal utilizando o aparelho de Clevenger e o aparelho de Soxhlet, respectivamente;
- Separar, identificar e quantificar componentes do óleo essencial, utilizando para isto, a Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio;
- Determinar as propriedades físico-químicas e a concentração de ω -9, ω -6 e ω -3 usando o programa PROTÓLEOS;
- Obter informações sobre as características físico-químicas por RMN H^1 tais como índice de saponificação, acidez, iodo, éster e massa molecular média;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato bruto extraído de *P. viridis*;
- Verificar os testes de inibição da enzima acetilcolinesterase do óleo essencial e do extrato bruto de *Psychotria viridis*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizados os seguintes materiais e aplicados os seguintes métodos.

O método empregado para a extração do óleo essencial das folhas da planta de *Psychotria viridis* foi o de hidrodestilação utilizando o aparelho tipo Clevenger (Figura 12), acoplado a um banho termostaticado com circulação e resfriamento de água. Neste método, a amostra é macerada e colocada no balão de fundo redondo, adiciona-se água destilada numa quantidade adequada para emergir toda a amostra durante a ebulição, e o balão é colocado na manta aquecedora. O sistema Clevenger é montado, adicionando-se água destilada até atingir a parte de baixo do sistema; e o termostato é ligado. Ao entrar em ebulição, a água evapora juntamente com as substâncias voláteis, o calor do vapor faz com que as paredes celulares se abram, dessa forma, o óleo que está entre as células evapora junto com vapores de água e os voláteis são conduzidos em direção ao condensador que vai para o tubo de resfriamento. A água e os voláteis condensam com a água retornando para o balão por um tubo de retorno e o óleo se depositando na superfície da água adicionada no Clevenger. Após quatro horas de extração, o sistema foi desligado e a porção de óleo essencial é retirada e colocada num frasco de vidro. Cada frasco foi etiquetado e armazenado na geladeira até o momento de serem realizadas as análises químicas e biológicas.

Figura 12 – Aparelho tipo Clevenger.



FONTE: O AUTOR (2014).

Já na extração do extrato da folha, do fruto e do caule da planta de *Psychotria viridis* foi utilizado o aparelho de Soxhlet (Figura 13). O extrator de Soxhlet é a melhor forma de extração contínua utilizando um solvente quente. Isso por que, inteligentemente, utiliza uma quantidade relativamente pequena de solvente e apresenta bons resultados. Consiste basicamente de um reservatório de vidro que fica entre um balão na parte inferior e um condensador no topo. Dentro do reservatório é colocado o material vegetal envolto em papel de filtro na forma de um pequeno cartucho. No balão fica o solvente escolhido e no condensador há fluxo de água. O balão é aquecido com uma manta elétrica de modo que o solvente entre em ebulição. O vapor condensa e goteja sobre o cartucho, solubilizando a substância a ser extraída. O aparelho de Soxhlet possui um sifão que permite o refluxo contínuo do solvente. Quando o reservatório enche e atinge a altura do sifão, este transborda levando o solvente (hexano, etanol, clorofórmio) e o extrato para o balão.

Figura 13 – Aparelho de Soxhlet.



FONTE: O AUTOR (2014).

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O material botânico da pesquisa foi coletado na região do Jacamim, localizado no município do Cantá - Boa Vista – RR (Figura 15).

Figura 14 – Divisão Municipal do Estado de Roraima

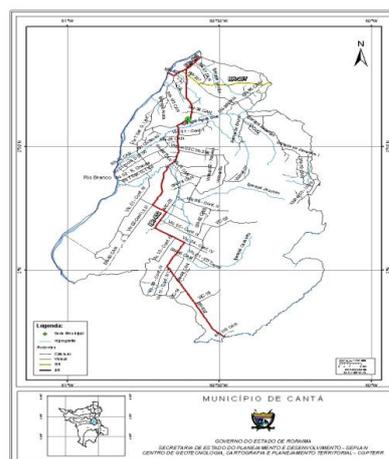


FONTE: CGEES/SEPLAN-RR (2010).

4.1.1 Caracterização da área de estudo

O município do Cantá, segundo dados do IBGE, está localizado no centro leste do estado de Roraima, na mesorregião Norte, microrregião Nordeste, situado nas coordenadas geográficas $60^{\circ} 34' 01''$ de longitude Oeste e $02^{\circ} 36' 18''$ de latitude Norte. Limita-se ao norte com o município de Boa Vista e Bonfim; ao sul com o município de Caracaraí; a leste com o município de Bonfim e a oeste com os municípios de Boa Vista, Mucajaí e Iracema (CGEES/SEPLAN-RR, 2010).

Figura 15 – Localização do Município do Cantá – RR



FONTE: CGEES/SEPLAN-RR (2010).

O clima do município é do tipo quente e semiúmido com 5 a 6 meses secos e duas estações bem distintas: verão (época seca) e inverno (época de chuva), com a primeira de outubro a março e a segunda de abril a setembro. A média da temperatura é de $27,5^{\circ}\text{C}$. Com relação às precipitações pluviométricas, o Município apresenta uma distribuição irregular ao

longo de todo o ano, a precipitação média situa-se entre 1.750 a 2.000 mm (CGEES/SEPLAN-RR, 2010).

O Município do Cantá apresenta basicamente uma composição vegetacional onde a cobertura florestal predominante é do tipo Ombrófila densa e área de contato (formação pioneira/floresta) (CGEES/SEPLAN-RR, 2010).

Quanto aos aspectos geomorfológicos, o município encontra-se em área de relevo plano (70%), com elevações isoladas (10%) e áreas com relevo fortemente ondulado (20%) (CGEES/SEPLAN-RR, 2010).

As Serras do Cantá, da Malacacheta, do Porco, da Lua e a Serra Grande, todas estão inseridas na região do município de Cantá. Apresenta ainda, a Cachoeira do Lodo e do Pente (CGEES/SEPLAN-RR, 2010).

4.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal de identificação botânica de *Psychotria viridis*, foi coletado no dia 17 de Junho de 2014 às 08:00hrs da manhã, na Região do Jacamim, município do Cantá-Roraima. Foi feita exsicata da espécie coletada (Figura 16). A exsicata foi identificada e depositada no herbário da Universidade Federal de Roraima sob número de tombamento 7550.

Figura 16 – Exsicata da espécie *Psychotria viridis*



FONTE: O AUTOR (2014).

Após a identificação da planta, foram coletados aproximadamente 900g da folha, 240g do fruto e 2,2Kg do caule da *Psychotria viridis* para posterior extração do óleo essencial e de seu extrato. Evitando o processo de oxidação, esse material foi transportado em recipientes adequados devidamente cobertos com papel alumínio e acondicionado em isopor com gelo. O material botânico foi coletado no período chuvoso.

4.3 PREPARAÇÃO

No laboratório de Produtos Naturais do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima, o material coletado, ou seja, as folhas, os caules e os frutos da planta *Psychotria viridis*, foi retirado dos galhos e separado manualmente.

4.4 LAVAGEM

Após o processo de separação do material vegetal, o mesmo foi lavado para a retirada de quaisquer impurezas e resíduos que pudessem influenciar nos procedimentos seguintes (figura 17).

Figura 17 – Lavagem do material



FONTE: O AUTOR (2014).

4.5 REPOUSO DAS AMOSTRAS PARA SECAR A TEMPERATURA AMBIENTE

Após a lavagem das amostras, as mesmas foram colocadas sobre a bancada para que o excesso de água fosse evaporado, utilizou-se jornal para uma maior absorção (figura 18). A secagem foi feita a temperatura ambiente por um período de mais ou menos de uma semana.

Figura 18 – Secagem do material



FONTE: O AUTOR (2014).

Em seguida, as amostras foram levadas ao PRONAT, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, e colocadas para secagem na estufa com circulação de ar (figura 19), que é um equipamento aplicável em secagem de produtos vegetais que necessitam de ação moderada de temperatura reduzindo os riscos de danificar princípios ativos durante secagem melhorando a eficiência através de processo com circulação e renovação de ar. A temperatura utilizada foi de 55°C e permaneceu por um período de 18 horas, tempo suficiente para total retirada da água ainda presente no interior das folhas, dos frutos e dos caules.

Figura 19 – Estufa com Circulação de Ar.



FONTE: O AUTOR (2014).

4.6 TRITURAÇÃO

Cada amostra foi triturada individualmente em um triturador localizado em um dos laboratórios do PRONAT (Figura 20). Para aumentar a superfície de contato e facilitar a saída dos componentes voláteis das folhas.

Figura 20 – Material vegetal triturado no triturador.



FONTE: O AUTOR (2014).

Em seguida, o pó das partes da planta foi recolhido em sacos plásticos como mostra a figura 20 logo abaixo, e posteriormente pesado em balança analítica (figura 21).

Figura 21 – Material vegetal em pó acondicionado em sacos plásticos.



FONTE: O AUTOR (2014).

Figura 22 – Pesagem das amostras



FONTE: O AUTOR (2014).

4.7 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

No Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Roraima, o material macerado foi depositado em um balão volumétrico de capacidade de 3000 mL. Foi acrescentada água destilada suficiente para encobrir a amostra na vidraria que foi acoplada a uma manta aquecedora (Figura 23). Durante

o período de quatro horas o material foi exposto ao processo de extração do óleo essencial sob o método de hidrodestilação com arraste de vapor d'água com a utilização do aparelho tipo Clevenger acoplado a um banho termostático. Após 30 minutos do sistema ligado, iniciou-se a extração.

Figura 23 – Balão com a amostra triturada juntamente com água destilada



FONTE: O AUTOR (2014).

O óleo essencial obtido foi retirado do recipiente contendo hidrolato e óleo com auxílio de micropipetador. O óleo essencial foi acondicionado em frasco de vidro de cor âmbar esterilizado, em seguida foi devidamente etiquetado com o nome da parte da planta que foi utilizada na extração e a massa do frasco vazio e do frasco contendo já o óleo essencial extraído, para o posterior cálculo do rendimento do mesmo. O frasco foi mantido sobre refrigeração.

4.8 EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

No laboratório de Produtos Naturais do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima, parte do material triturado foi pesado e colocado em papéis de filtro formando um pequeno cartucho (figura 24). Em seguida, os cartuchos foram inseridos no equipamento de Soxhlet e logo abaixo em um balão de fundo chato foi colocado o solvente utilizado. Cada parte da planta foi extraída com os seguintes solventes: hexano, clorofórmio e etanol. O tempo de extração variou para cada tipo de solvente, uma vez que o processo finaliza assim que a cor do solvente muda para transparente ao passar pela amostra contida no cartucho. A variação compreendeu entre 2-5 horas de extração.

Figura 24 – Montagem dos cartuchos contendo a amostra a ser extraída.



FONTE: O AUTOR (2014).

Em seguida, a solução contida no balão, que consiste em solvente mais extrato bruto, é passada no Sulfato de Sódio anidro PA para remover quaisquer impurezas e resquícios de água, como mostra a Figura 25 logo abaixo.

Figura 25 – Passagem pelo Sulfato de Sódio Anidro PA.



FONTE: O AUTOR (2014).

Depois o extrato bruto é separado do solvente utilizando para isto um rotaevaporador, que é um equipamento para laboratório imprescindível quando o assunto é remoção de solventes. Por meio dos processos de evaporação e condensação, ele remove solventes diferentes, presentes em amostras (Figura 26).

Figura 26 – Remoção dos solventes pelo Rotaevaporador.



FONTE: O AUTOR (2014).

Posterior a este processo, o extrato bruto que ficou no balão foi removido com o auxílio de um micropipetador e transferido para um frasco de cor âmbar e depois devidamente etiquetado com o nome da parte da planta e o solvente utilizado, e as massas do frasco vazio e do frasco contendo já o extrato extraído, para o posterior cálculo do rendimento do mesmo.

4.9 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO DE *P. viridis*

Para o cálculo de rendimento de óleo essencial e de extrato bruto de cada parte da planta coletada, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Massa de óleo essencial obtido (g)} \times 100}{\text{Massa do material vegetal (g)}} \quad (1)$$

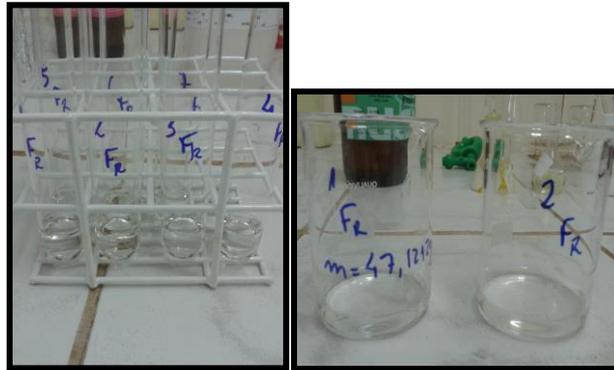
4.10 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Cada extrato bruto e óleo essencial foram submetidos a uma prospecção fitoquímica a fim de verificar as possíveis presenças de alguns metabólitos secundários.

Primeiramente foi pesada uma determinada massa entre 0,008-0,121 g para cada extrato bruto e óleo essencial da folha e do fruto da planta *Psychotria viridis*, e dissolveu-se em uma solução hidroalcoólica de etanol e água (7:3). Separaram-se sete porções de 3,5 mL em tubos de ensaio numerados e duas porções de 10 mL em béqueres rotulados, um deles tarado com pesos entre 47,121-49,593 g (figura 27). Deixou-se o béquer 1 em banho-maria até sua secura e manteve-se em dessecador até a ocasião de serem usados. Levou-se o béquer 2 e os tubos de ensaio em banho-maria até obter a metade do volume (figura 28), levou-os a

pH 4, adicionando-se 1 gota de HCl 0,1 M, e filtrou-se o acidulado. Submeteu-se o conteúdo dos tubos de ensaio aos testes descritos abaixo (MATOS, 1997).

Figura 27 – Tubos de ensaio e béqueres numerados



FONTE: O AUTOR (2014).

Figura 28 – Tubos de ensaio em banho-maria.



FONTE: O AUTOR (2014).

4.10.1 Teste para fenóis e taninos

Neste teste, tomou-se o tubo número 1 e adicionou três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 , agitou bem e foi observado qualquer variação de sua cor ou formação de precipitado abundante, escuro. Comparou-se com um teste em branco, isto é, usando apenas água e o cloreto férrico.

- Coloração variável entre o azul e o vermelho é indicativo da presença de Fenóis, quando o teste “branco” for negativo.

- Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos flobafênicos (taninos condensados ou catéquicos) (MATOS, 1997).

4.10.2 Teste para ancitocinas, antocianidinas e flavonoides

Tomou-se os tubos de números 2, 3 e 4, acidulou a pH 3, alcalinizou a pH 8,5 e o terceiro a pH 11. Observou-se qualquer mudança da coloração do material. Aparecimento de cores diversas indica a presença de vários constituintes, de acordo com a tabela 6 seguinte (MATOS, 1997).

Tabela 6 – Lista de constituintes de acordo com o surgimento da cor

Constituintes	Cor em Meio		
	Ácido (3)	Alcalino (8,5)	Alcalino (11)
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-Púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Verm. Púrpura
Flavanonóis	-	-	Verm. Laranja

FONTE: MATOS (1997).

4.10.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Neste teste tomou-se os tubos numerados 5 e 6, acidulou o primeiro por adição de HCl até pH 1-3 e alcalinizou o outro com NaOH até pH 11. Aqueceu-os com auxílio de uma lâmpada de álcool durante 2-3 minutos, cuidadosamente. Observou-se qualquer modificação na cor, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior.

- Aparecimento ou intensificação de cor indica a presença de constituintes especificados na tabela 7 logo abaixo (MATOS, 1997).

Tabela 7 – Lista de constituintes de acordo com o surgimento da cor

Constituintes	Cor em Meio	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (Taninos Catéquicos)	Pardo-Amarelada	-
Flavanonas	-	Verm. Laranja

FONTE: MATOS (1997).

4.10.4 Teste para flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas

Adicionou-se ao tubo 7 alguns centigramas de magnésio-granulado ou em fita e 0,5 mL de HCl concentrado. Aguardou o término da reação indicada pelo fim da efervescência e observou por comparação mudança na cor da mistura da reação nos tubos 5 e 7 (acidificados).

- Aparecimento ou intensificação de cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavononóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos (MATOS, 1997).

4.10.5 Teste para confirmação de catequinas

Umedeceu bem a madeira de um palito de fósforo no extrato hidroalcoólico. Fez evaporar o solvente e reumedeceu uma face do palito com HCl concentrado, com auxílio de um bastão de vidro. Aqueceu o palito por 2-3 minutos ao calor de uma chama de álcool, evitando que ele fique tostado. Observou se houve aparecimento de coloração no lado acidulado do palito.

- Cor vermelha ou pardo-avermelhada confirma a presença de catequinas indicada no teste em questão (MATOS, 1997).

4.10.6 Teste para esteroides e triterpenóides (Lieberman-Burchard)

Neste teste, extraiu-se o resíduo seco do béquer 1 três vezes com 1,5 mL de clorofórmio triturando bem o resíduo, filtrou-se a solução clorofórmica gota a gota em um funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta por algumas centigramas de Na₂SO₄ anidro em um tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de anidrido acético, agitou suavemente e cuidadosamente juntou-se três gotas de H₂SO₄ concentrado, tornou a agitar suavemente e observou se há rápido desenvolvimento de cores.

- Coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteroides livres.
- Coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres (MATOS, 1997).

4.10.7 Teste para saponinas

Tomou-se o resíduo insolúvel em clorofórmio, separado na operação anterior (4.10.6), redissolveu com 7,5 mL de água destilada e filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou o tubo com a solução, fortemente, por 3 minutos e observou a formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponina (heterósides saponínicos) (MATOS, 1997).

4.10.8 Teste confirmatório para saponinas

Adicionou-se 2 mL de HCl concentrado ao conteúdo do tubo preparado no teste anterior (4.10.7) e deixou-o durante pelo menos uma hora imerso em banho-maria. Deixou-o esfriar, neutralizou-o e agitou novamente por 3 minutos.

- A presença de precipitado e a não formação de espuma confirma a presença de saponinas (MATOS, 1997).

4.10.9 Teste para alcaloides

Tomou-se 1/3 da solução aquosa do béquer 2 e adicionou-se NH_4OH até pH 11 e extraiu as bases orgânicas com três porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL da mistura de éter-clorofórmio (3+1) (75:25), em um funil de separação, reservou-se a fase aquosa para outro teste (4.10.10). Retirou-se a solução éter-clorofórmio, tratou com Na_2SO_4 anidro para eliminar o excesso de água. Separou o filtrado em duas porções. Deixou secar uma delas para testes em cromatoplaça e reextraiu as bases orgânicas da outra, com três pequenas porções sucessivas de 5, 3 e 1 mL de HCl diluído (0,1 M). Rejeitou-se a solução éter-clorofórmica e repartiu a solução aquosa ácida obtida, em três tubos de ensaio. Adicionou-se a cada tubo, respectivamente, três gotas dos reagentes de precipitação de alcaloides, “Hager”, “Mayer” e “Dragendorff”. Observou-se a formação de precipitado característico.

- Precipitado floculoso, pesado em pelo menos dois tubos é indicativo de alcaloides (MATOS, 1997).

4.10.10 Teste para bases quartenárias

Acidulou novamente a solução aquosa (4.10.9), filtrou três amostras de 5 mL para três tubos de ensaio e repetiu a reação para prospecção de alcaloides.

- Precipitado floculoso indica a presença de bases quartenárias (MATOS, 1997).

4.11 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA (CG/EM)

A identificação da composição química do óleo essencial de *Psychotria viridis* foi realizada no Grupo de Biotecnologia e Química Fina – GBQF, na Universidade Federal de Roraima (UFRR), na cidade de Boa Vista - RR. Foi empregada a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa. As análises foram realizadas em equipamento CG-EM modelo QP 2010 Plus da Shimadzu Scientific Instruments com detector para espectrometria em massa. Foi utilizado o hélio (He) como gás de arraste.

O fluxo da coluna foi de 1,02 mL por minuto, a injeção modo Split foi realizada com injetor a 220^oC e a pressão da coluna foi de 58,8 KPa. As amostras foram injetadas no sistema CG-EM na concentração de 1mg/mL em hexano grau HPLC. A coluna utilizada foi RTX (30m x 0.25 mm x 0.25mm).

4.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As avaliações das atividades antimicrobianas do óleo essencial e do extrato bruto de *Psychotria viridis* foram realizadas no laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.12.1 Bioensaio de MIC (Mínima Concentração Inibitória) para bactérias gram-negativas

As bactérias gram-negativas utilizadas no teste foram *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. As amostras foram pesadas e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução com concentração de 50 mg/mL (extratos) e 12,5 mg/mL

(substâncias puras). Pipetaram-se 40 µL desta solução para um frasco contendo 960 µL de meio de cultura BHI (solução de trabalho). Foi preparado um pré-inóculo no qual as bactérias (leveduras) estocadas em tubos de ensaio foram transferidas com alça de platina e inoculadas em tubos de ensaios contendo 3,0 mL de meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*, Infuso de cérebro e coração). Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 18 h. Com o auxílio de uma micropipeta, 500 µL do pré-inóculo foram transferidos para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de água destilada estéril. Os tubos foram homogeneizados e a concentração ajustada comparando-se com o tubo 0,5 da escala de McFarland de turbidez padrão (10^8 UFC/mL), obtendo-se assim, os inóculos utilizados no teste.

Os testes foram realizados em placas de 96 micropoços, em duplicata. Em cada poço foram adicionados 100 µL do meio de cultura BHI. No poço 1 foram adicionados também 100 µL da solução de trabalho. Homogeneizou-se a solução e 100 µL foram transferidos para o próximo poço e assim sucessivamente. Desprezaram-se os 100 µL finais. Foram testadas 8 concentrações de cada amostra. A seguir, 100 µL do inóculo do micro-organismo a ser testado foram adicionados a cada poço. Foram realizados dois controles, um para controle de crescimento do micro-organismo, no qual não houve adição da solução de trabalho (para verificar a viabilidade celular) e o branco, em que não se adicionou o inóculo (para se eliminar o efeito da coloração da solução de trabalho). Uma placa controle contendo 100 µL de meio de cultura BHI e 100 µL de água destilada estéril foi adicionada ao experimento como de controle de esterilidade do meio de cultura BHI.

As microplacas foram submetidas a primeira leitura em leitor de placa de Elisa (492 nm) imediatamente após a execução do experimento (leitura a 0h). Posteriormente, foram incubadas em estufa a 37 °C e após 24 h foi realizada nova leitura das mesmas, encerrando o teste.

4.12.2 Bioensaios de MIC (Mínima Concentração Inibitória) para bactérias gram-positivas e gram-negativas

Os micro-organismos testes utilizados foram *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -); *Citrobacter freundii* (Gram -); *Bacillus cereus* (Gram +); *Listeria monocytogenes* (Gram +).

Dados do procedimento

Solvente utilizado para o preparo das amostras: Dimetilsulfóxido

Concentração das amostras no teste: 250 µg/mL

Meio utilizado para o crescimento dos micro-organismos: BHI

Tempo de incubação das amostras: 48 h

Dados da leitura

Realizada em leitor de placas de microtitulação

Comprimento de onda utilizado na leitura: 490 nm

Tratamento dos dados

Teste de outlier: Teste de Grubbs, com nível de significância de 95%

Cálculo da porcentagem de inibição: Realizado através da fórmula

$$\% \text{inibição} = 100 - \frac{EC - CC}{CH - CM} \times 100 \quad (2)$$

sendo EC a absorbância do teste, CC a absorbância do controle da amostra, CH a absorbância do controle do fungo e CM a absorbância do controle do meio de cultura.

4.13 ACETILCOLINESTERASE

Os testes de inibição da enzima acetilcolinesterase do óleo essencial e do extrato bruto de *Psychotria viridis* foram realizadas no laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A avaliação quantitativa da inibição da acetilcolinesterase foi realizada pelo método de Ellman. Este método é baseado na hidrólise de acetilcolina pela acetilcolinesterase, produzindo tiocolina que reage com o DTNB, originando o composto 5-tio-2-nitro-benzoato, que apresenta coloração amarela.

Foram adicionados 25 µL da solução de trabalho (amostra em DMSO 10 mg/mL) aos poços da placa de Elisa do teste e dos controles negativo e positivo. Nos cinco primeiros poços da coluna do controle positivo, adicionaram-se 25 µL da solução de eserina (10 mg/mL em tampão Tris/HCl pH 8,0). Adicionaram-se, a cada poço, 25 µL de solução de Iodeto de Acetilcolina (Acetylthiocholine iodide, ATCI), 125 µL da solução de DTNB (5', 5-dithio-bis-2-nitrobenzoate, Sigma) e 50 µL de Tris/HCl (50 mM) com albumina sérica bovina. A

absorbância foi medida a 405 nm a cada 1 minuto por 8 vezes (8 minutos no total). Adicionaram-se 25 µL da solução de AChE (0,226 U/mL) em Tris/HCl ao poço. Mediu-se a absorbância a 405 nm por 10 vezes (10 minutos no total).

4.14 ESTUDO QUÍMICO DO ÓLEO E DO EXTRATO POR RMN H^1

Os espectros de RMN- H^1 foram registrados em um espectrômetro modelo Bruker Avance 200 DPX, operando a 4,7 Tesla, correspondendo a uma frequência de ressonância de 200,13 MHz para núcleos de H^1 , equipado com uma detecção direta quatro núcleos de cabeça de sonda e gradientes de campo no eixo z. As amostras foram analisadas em tubos de RMN de 5 mm (Wilmad 507). As amostras do RMN foram preparadas por dissolução de 0,5 mL do óleo em 0,5 mL de $CDCl_3$. Os desvios químicos são apresentados em ppm, utilizando o TMS como padrão interno. Parâmetros típicos para espectros RMN- H^1 foram: 30° pulso, tempo de aquisição 8s, 6,4 KHz janela espectral, 16 varrimentos, 52 K pontos de dados.

4.14.1 Análise das propriedades físico-químicas por RMN H^1

As propriedades físico-químicas foram avaliadas por meio da Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H^1), realizada no Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

O índice de iodo, índice de acidez, índice de saponificação e a massa molecular média podem ser medidos, quantitativamente, através da RMN H^1 , através das equações, previamente estudadas por Reda (2004) e Reda e Carneiro (2006), apresentadas nas equações 3 – 10, enquanto o índice de éster e porcentagem de éster, de acordo com Silva (2005), é apresentado nas equações 11 e 12, respectivamente.

Área de um próton (A_p):

$$A_p = (I + H) / 4 \quad (3)$$

Em que:

I + H = são os prótons dos dois grupos metílenos do glicerol.

Prótons olefínicos (V):

$$V = [(J + K) - A_p] / A_p \quad (4)$$

Em que:

J + K = é a área correspondente aos prótons vinílicos;

A_p = Área de um próton.

Total de prótons (T):

$$T = (K + J + I + H + G + F + E + D + C + B + A) / A_p \quad (5)$$

Em que:

A_p = Área de um próton.

Massa molecular média (MM):

$$MM = 119,7 + 7,036 \cdot T + 5,983 \cdot V \quad (6)$$

Em que:

T= total de prótons.

Índice de iodo (II):

$$II = (126,91 \cdot 100 \cdot V) / MM \quad (7)$$

Em que:

V = Número de prótons vinílicos (olefínicos);

MM = Massa molecular média.

Índice de saponificação (IS):

$$IS = [MM \cdot (-0,2358)] + 398,42 \quad (8)$$

Índice de acidez (IA):

$$IA = 3,0597 \cdot (R_{o,a})^2 - 6,3181 \cdot (R_{o,a}) + 3,3381 \quad (9)$$

Em que:

$R_{o,a}$ = Relação hidrogênios olefínicos / alifáticos.

Relação de hidrogênios olefínicos / alifáticos ($R_{o,a}$):

$$R_{o,a} = V / (A + B) \quad (10)$$

Em que:

V = Hidrogênios olefínicos;

A + B = Soma dos hidrogênios alifáticos da molécula do triacilglicerol.

Índice de éster (IE):

$$IE = IS - IA \quad (11)$$

Porcentagem de éster (%IE):

$$\%IE = (IS \cdot 100) / (IS + IA) \quad (12)$$

4.15 PERFIL DOS ÉSTERES METÁLICOS DOS ÁCIDOS GRAXOS POR RMN 1H

Para a quantificação dos ácidos graxos insaturados do extrato bruto de *Psychotria viridis* por hexano, foram utilizadas as seguintes equações previamente estudadas por Knothe e Kenar (2004) e desenvolvidas por Kirby, Fofana e McCallum (2011), devidamente adaptadas para este estudo, nas equações 13 – 16.

$$\text{Ácido Linolênico} - \text{G}\text{D}3 (\%) = 100 \cdot [B / (A + B)] \quad (13)$$

$$\text{Ácido Linoléico} - \text{G}\text{D}6 (\%) = 100 \cdot [((G / 3) - 4 \cdot \text{G}\text{D}3) / 2] \quad (14)$$

$$\text{Ácido Oléico} - \text{G}\text{D}9 (\%) = 100 \cdot [((K / 3) - 4 \cdot \text{G}\text{D}6 - 6 \cdot \text{G}\text{D}3) / 2] \quad (15)$$

$$\text{Ácidos Saturados (\%)} = 100 \cdot (1 - \text{G3} - \text{G6} - \text{G9}) \quad (16)$$

Em que:

A = prótons metílicos;

B = prótons metílicos do ácido linolênico;

G = prótons alilícos internos;

K = prótons H-2 metilênicos do glicerol.

4.16 RMN ^1H COM UTILIZAÇÃO DE SOFTWARE PARA ANÁLISE DE ÓLEO VEGETAL E EXTRATO

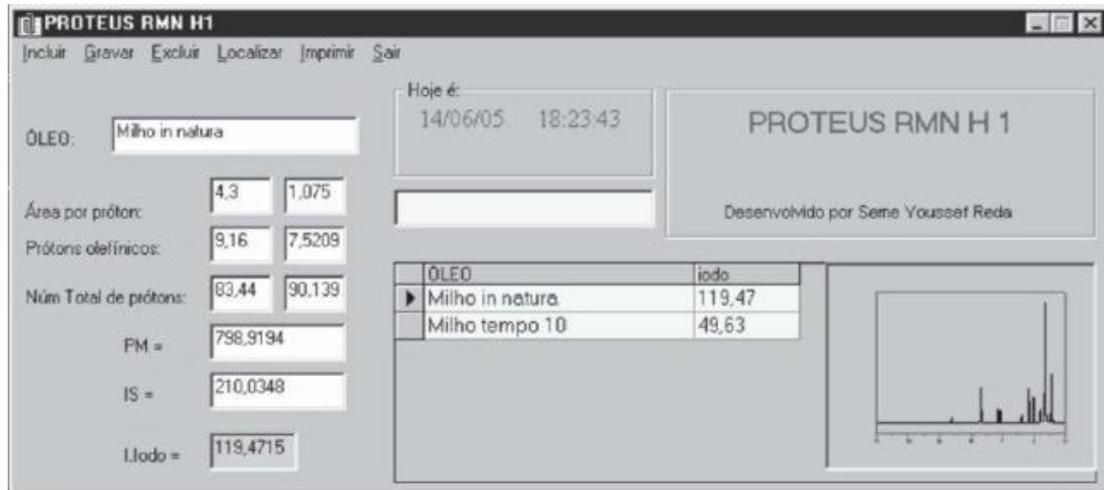
No trabalho de Carvalho et al. (2006), a identificação de substâncias em pequenas quantidades, atualmente, tem sido possível devido ao avanço das técnicas analíticas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massas (EM), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia a Gás (CG).

A RMN apresenta grandes vantagens em relação às análises volumétricas, pois tem a capacidade de reprodutibilidade, sensibilidade e rapidez nas análises, auxiliam nos estudos de óleos vegetais ou combustíveis fornecendo resultados em curto espaço de tempo (FARIAS, 2013).

Baseando-se nas pesquisas de Farias (2013), para os estudos de óleos vegetais, o aparelho de RMN detecta em seu espectro sinais característicos e proporcionais ao número de prótons presentes em cada grupo funcional, ou seja, conhecendo a localização e a intensidade do sinal dentro do deslocamento é possível determinar o grupo funcional do ácido graxo e sua porcentagem presente na amostra.

Através das integrais dos sinais obtidos no espectro de RMN, diversos autores desenvolveram fórmulas para a realização das determinações da massa molecular média (MM), índice de iodo (II), índice de saponificação (IS), índice de acidez (IA) e ainda a determinação quantitativa dos ácidos graxos insaturados (G-3, G-6 e G-9) e saturados, e para agilizar os cálculos de estudo deste trabalho aproveitou-se a ideia de Reda (2006) que apresenta um software para auxiliar nos cálculos de seus estudos escrito em Visual Basic 5.0 para a determinação do índice de iodo (II) mostrado na Figura 29.

Figura 29 – Característica geral do programa PROTEUS RMN H¹



FONTE: REDA (2006).

No entanto, o software desenvolvido neste estudo, apresentado na Figura 30, reúne as fórmulas desenvolvidas e calcula as determinações físico-químicas, AGI majoritários (G-3, G-6 e G-9) e para a diferença dos determinados ácidos têm-se os AGS acrescidos de AGI em menores concentrações, mediante aos valores das integrações do RMN H¹ do óleo vegetal estudado (FARIAS, 2013).

Figura 30 – Característica geral do programa PROTÓLEOS.



FONTE: FARIAS (2013).

Ainda com base na pesquisa de Farias (2013), o programa denominado PROTÓLEOS RMN H¹ desenvolvido no Python que se processa no Windows serve como ferramenta de apoio para os alunos do PPGQ que fazem pesquisas nesta linha de concentração de óleos

vegetais, calcula as propriedades físico-químicas, tais como: índice de iodo (II), índice de acidez (IA), índice de saponificação (IS), massa molecular média (MM), índice de éster (IE), porcentagem de éster (%IE), calculando ainda as porcentagens dos ácidos: oleico (GD-9), linoléico (GD-6), linolênico (GD-3) e saturados (SAT), além de calcular a área de próton (Ap), prótons olefínicos (V), total de prótons (T), relação de hidrogênios olefínicos / alifáticos.

O programa foi escrito em PYQT (software livre), onde os campos de entrada dos dados são os sinais: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K correspondentes as integrais obtidas dos espectros de RMN H^1 do óleo a ser estudado. Todas as informações são calculadas de forma direta e automaticamente pela entrada de dados (FARIAS, 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As extrações dos óleos essenciais das amostras ocorreram com o aparelho tipo Clevenger acoplado a um banho termostaticado. Na Tabela 8 está exposto o cronograma das extrações.

Tabela 8 - Cronograma de extrações do óleo essencial

Amostras	Horário Da Coleta	Massa Das Amostras	Início Da Extração	Término Da Extração
Folha	8 horas	383 gramas	16 horas	20 horas
Fruto	8 horas	90 gramas	14 horas	18 horas
Caule	8 horas	194 gramas	14 horas	18 horas

Já as extrações dos extratos bruto das amostras coletadas da espécie *Psychotria viridis* ocorreram com o aparelho de Soxhlet. Na Tabela 9 encontra-se listado o cronograma das extrações.

Tabela 9 – Cronograma de extrações do material vegetal

Amostras	Horário Da Coleta	Massa Das Amostras	Início Da Extração	Término Da Extração
Folha	8 horas	70 gramas	16 horas	20 horas
Fruto	8 horas	55 gramas	18 horas	23 horas
Caule	8 horas	186 gramas	14 horas	18 horas

Na tabela 10 está exposto a massa das amostras e o rendimento dos óleos essenciais.

Tabela 10 - Cronograma das massas dos óleos e seus rendimentos

Folhas	Massa Das Amostras (g)	Massa Do Óleo Essencial (g)	Porcentagem De Óleo Essencial (%)
Folha	383	0,0896	0,0233
Fruto	90	0,1019	0,1132
Caule	194	0,1489	0,0767

Observou-se que o óleo essencial extraído do fruto teve maior rendimento (0,1132%) mesmo a amostra apresentando menor massa (90 g).

Analisando o trabalho de Benevides (1996), o mesmo obteve como rendimento do óleo essencial extraído da espécie *Psychotria spectabilis* um valor igual a 0,45% para uma massa de 34 g de folhas secas. Ou seja, apresentou um rendimento satisfatório para uma massa não muito grande comparado com o presente trabalho.

5.1 RESULTADOS DA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

No que diz respeito à análise do perfil químico das folhas e do fruto de *Psychotria viridis* identificou-se a presença de metabólitos secundários.

Nas Tabelas 11 a 14, estão relatados os resultados para o óleo essencial da folha e do fruto da espécie em questão extraído através do aparelho tipo Clevenger, e para o extrato bruto da folha e do fruto extraído através do aparelho de Soxhlet utilizando como solventes hexano, clorofórmio e etanol.

Tabela 11 – Resultados da prospecção fitoquímica do óleo essencial da folha.

Metabólito Secundário	Resultado
Fenóis e taninos	Negativo (-)
Ancitocinas, antocianidinas e flavonoides	Negativo (-)
Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	Negativo (-)
Flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas	Negativo (-)
Confirmação de catequinas	Negativo (-)
Esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard)	Negativo (-)
Saponinas	Negativo (-)
Confirmatório para saponinas	Negativo (-)
Alcaloides	Positivo (+)
Bases Quartenárias	Negativo (-)

Tabela 12 – Resultados da prospecção fitoquímica do óleo essencial do fruto.

Metabólito Secundário	Resultado
Fenóis e taninos	Negativo (-)
Ancitocinas, antocianidinas e flavonoides	Negativo (-)
Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	Negativo (-)
Flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas	Negativo (-)
Confirmação de catequinas	Negativo (-)
Esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard)	Negativo (-)
Saponinas	Negativo (-)
Confirmatório para saponinas	Negativo (-)
Alcaloides	Positivo (+)
Bases Quartenárias	Negativo (-)

Analisando as Tabelas 11 e 12 logo acima, podemos concluir que no óleo essencial extraído da folha e do fruto da planta *Psychotria viridis* indicam a presença de alcaloides, que são compostos orgânicos encontrados em produtos naturais que podem produzir efeitos

fisiológicos no organismo humano e constituem a principal classe de constituintes químicos encontrados em *Psychotria* (SALDANA, 2002). Dependendo da dose utilizada, tais efeitos podem ser tóxicos ou terapêuticos. Para Pires et al. (2010), a espécie analisada possui o alcaloide *N,N*- dimetiltriptamina (DMT) em suas folhas. Nos Estados Unidos, concentrações apreciáveis de DMT são encontradas em extratos de *Phalaris* (*Phalaris arundinacea*, *Phalaris tuberosa* e *Phalaris aquatica*, esta última encontrada também no Canadá). *Desmanthus illinoensis* também possui DMT em suas raízes.

Pires et al. (2010), ainda, destaca muitas outras fontes botânicas de DMT na região da América do Sul. Essa substância pode ser extraída de sementes de *Anadenanthera peregrina* ou de cascas de caules de *Virola* spp., *Piptadenia*, *Mimosa hostilis*, *Diplopterys cabrerana* (syn. *Banisteriopsis rusbyana*) e *Lespedeza bicolor*.

Tabela 13 – Resultados da prospecção fitoquímica do extrato da folha.

Metabólito Secundário	Resultado (Hexano)	Resultado (Clorofórmio)	Resultado (Etanol)
Fenóis e taninos	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
Ancitocinas, antocianidinas e flavonoides	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
Flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Confirmação de catequinas	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard)	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)
Saponinas	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
Confirmatório para saponinas	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)
Alcaloides	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
Bases Quartenárias	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)

Tabela 14 – Resultados da prospecção fitoquímica do extrato do fruto.

Metabólito Secundário	Resultado (Hexano)	Resultado (Clorofórmio)	Resultado (Etanol)
Fenóis e taninos	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Ancitocinas, antocianidinas e flavonoides	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Confirmação de catequinas	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard)	Positivo (+)	Positivo (+)	Negativo (-)
Saponinas	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
Confirmatório para saponinas	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
Alcaloides	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
Bases Quartenárias	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)

Já analisando as Tabelas 13 e 14, que são respectivamente a prospecção fitoquímica do extrato da folha e do fruto, podemos concluir que o extrato da folha de *Psychotria viridis* extraído com o solvente hexano apresentou apenas saponinas; já o extrato extraído com o solvente clorofórmio apresentou ancitocinas, antocianidinas e flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas, esteróides e triterpenóides, e também saponinas; e por fim, o extrato extraído com o solvente etanol apresentou como resultados positivos para fenóis e taninos, ancitocinas, antocianidinas e flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas, saponinas e por último alcaloides.

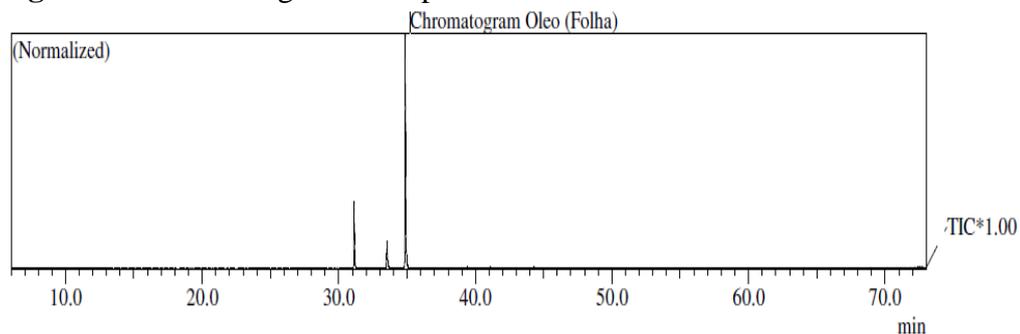
Já o extrato do fruto de *P. viridis* extraído com o solvente hexano apresentou esteroides e triterpenóides, saponinas e bases quartenárias; o extrato extraído com o solvente clorofórmio apresentou esteroides e triterpenóides, e bases quartenárias; e o extrato extraído com o solvente etanol apresentou como resultados positivos para saponinas, alcaloides e também para bases quartenárias.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

5.2.1 Análise do Cromatograma da amostra da folha

Os constituintes químicos do óleo essencial da amostra da folha foram identificados e comparados aos diferentes padrões de fragmentação na biblioteca de espectros. Para a caracterização da composição total do óleo, utilizou-se a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O cromatograma do óleo essencial está apresentado na Figura 31.

Figura 31 – Cromatograma completo do óleo essencial da folha



De acordo com o cromatograma, os tempos de retenção variaram entre 31 a 35 minutos após a injeção do óleo no equipamento. A Tabela 15 está relacionada todos os 3 constituintes encontrados no óleo essencial extraído da folha da espécie em questão, *Psychotria viridis*.

Tabelas 15 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial da folha de *P. viridis*

Pico	Tempo de Retenção (minutos)	Número de Carbonos	Constituinte Químico	Área %
1	31.127	13-18	Tetradecanal	20.10
2	33.528	14-20	1-Hexadecanol	9.25
3	34.868	12-18	Tetradecanal	70.65

Pode ser observado na Tabela 15 que o pico 3, onde foi detectado o componente químico Tetradecanal, foi quem apresentou maior quantidade percentual no óleo essencial em comparação com os demais picos observados.

Cada componente foi analisado e caracterizado individualmente, sendo os principais mostrados nos espectros de massa, Figura 32 a 37.

Figura 32 – Espectro de massa no tempo de retenção de 31.127 minutos

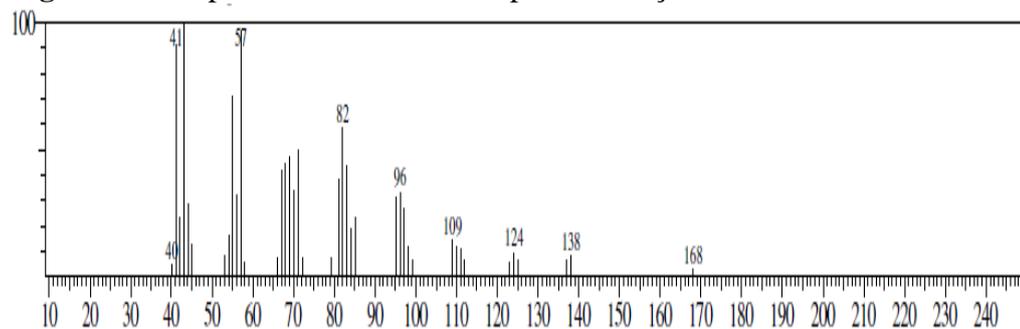


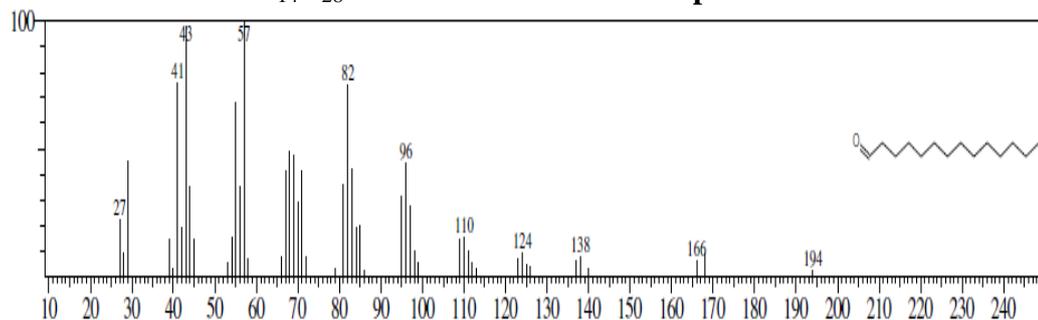
Figura 33 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM

Biblioteca: WILEY8.LIB

CAS: 124-25-4

Fórmula: C₁₄H₂₈O

Nome do Composto: Tetradecanal



De acordo com dados da biblioteca do CG-EM e com dados de Baharum et al. (2010), a estrutura mais provável no tempo de retenção de 31,127 minutos, corresponde ao composto, Tetradecanal, na porcentagem de 20,10%. No trabalho publicado por Baharum et al. (2010), o composto em questão foi identificado em um tempo de retenção de 31,739 minutos e

apresentou uma porcentagem no óleo essencial extraído da espécie *Polygonum minus* de 44,3%.

Figura 34 – Espectro de massa no tempo de retenção de 33.528 minutos

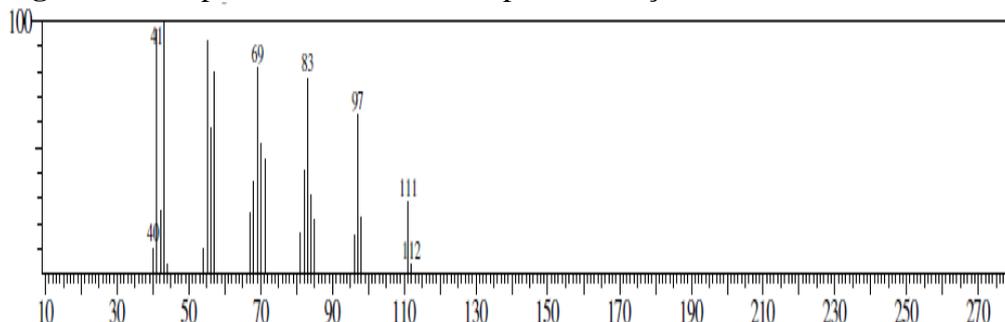
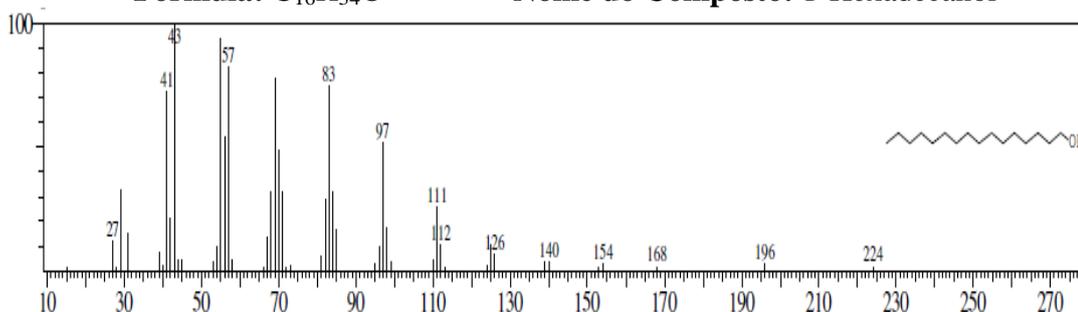


Figura 35 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM

Biblioteca: WILEY8.LIB **CAS:** 36653-82-4
Fórmula: C₁₆H₃₄O **Nome do Composto:** 1-Hexadecanol



De acordo com dados da biblioteca do CG-EM, a estrutura mais provável no tempo de retenção de 33,528 minutos, corresponde ao composto 1-Hexadecanol, também conhecido comercialmente como Álcool Cetílico, na porcentagem de 9,25%. O Álcool Cetílico pertence a uma classe de compostos químicos chamados álcoois graxos.

Figura 36 – Espectro de massa no tempo de retenção de 34.868 minutos

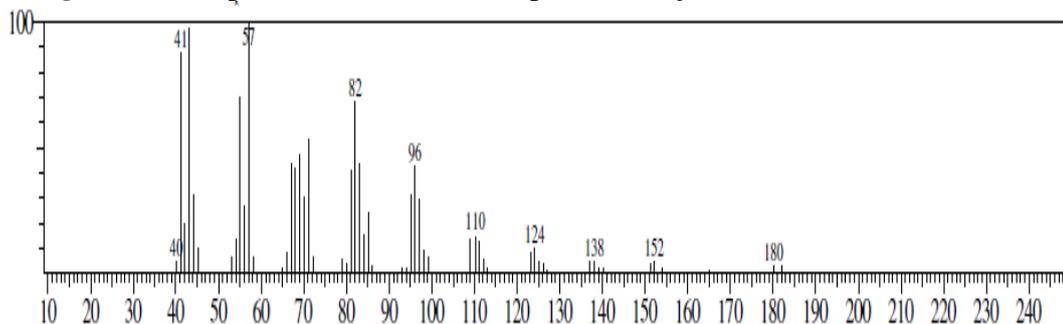
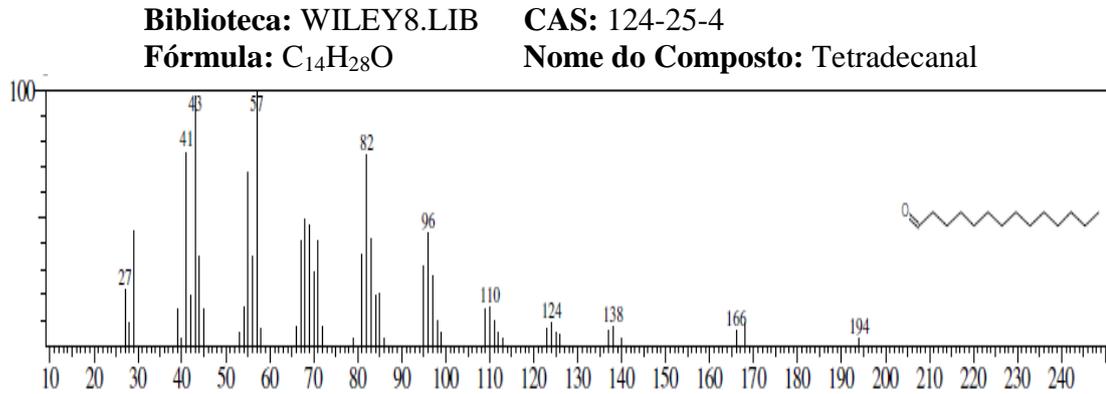


Figura 37 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM

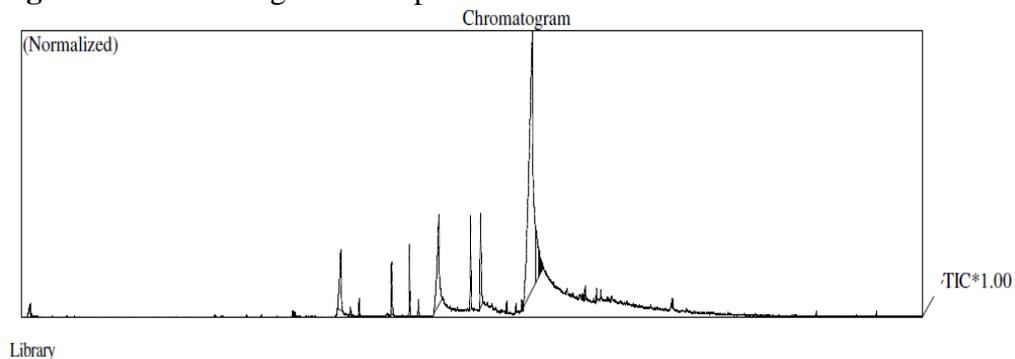


De acordo com dados da biblioteca do CG-EM e com dados de Baharum et al. (2010), a estrutura mais provável no tempo de retenção de 34,868 minutos, corresponde ao composto, Tetradecanal, na porcentagem de 70,65%. No trabalho publicado por Baharum et al. (2010) o composto em questão foi identificado em um tempo de retenção de 31,739 minutos e apresentou uma porcentagem no óleo essencial extraído da espécie *Polygonum minus* de 44,3%.

5.2.2 Análise do Cromatograma da amostra do fruto

Os constituintes do óleo essencial da amostra do fruto foram identificados e comparados aos diferentes padrões de fragmentação na biblioteca de espectros. Para a caracterização da composição total do óleo, utilizou-se a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Abaixo está o cromatograma do óleo essencial.

Figura 38 - Cromatograma completo do óleo essencial da amostra do fruto

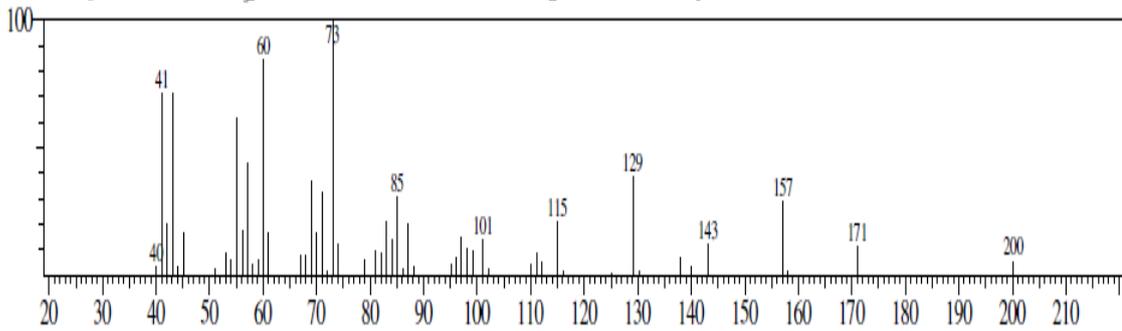


De acordo com o cromatograma, os tempos de retenção variaram entre 6 a 70 minutos após a injeção do óleo no equipamento. A Tabela 16 está relacionada todos os 29 constituintes encontrados no óleo essencial extraído do fruto da espécie em questão, *Psychotria viridis*.

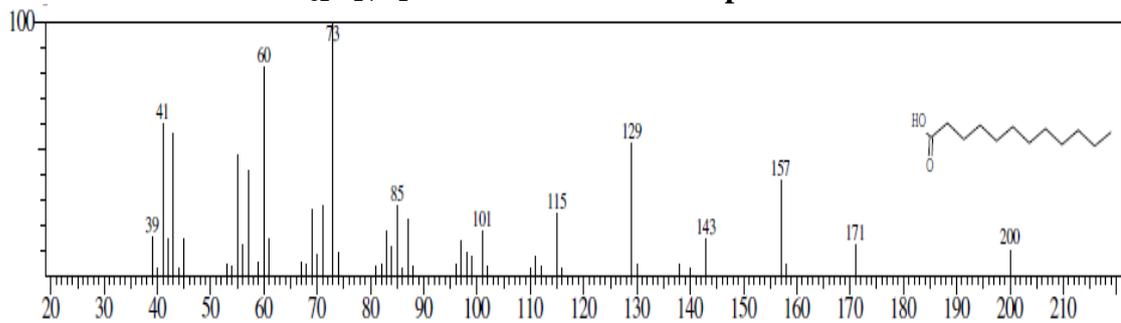
Tabela 16 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial do fruto de *P. viridis*.

Pico	Tempo de Retenção (minutos)	Número de Carbonos	Constituinte Químico	Área %
1	6.664	4-7	Ácido Hexanóico	0.27
2	26.184	13	3-buten-2-ona, 4-(2,2,6-trimetil-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-il)	0.16
3	29.765	12-16	Ácido Dodecanóico	5.28
4	30.453	12-16	Ácido Benzenodicarboxílico, Dietil ester	0.29
5	31.111	11-18	Tetradecanal	0.61
6	33.517	12-14	1-Tetradecanol	2.15
7	34.849	12-18	Tetradecanal	2.49
8	35.527	12-16	1-Tetradecanol	0.54
9	37.032	13-18	Ácido Tetradecanóico	11.08
10	38.410	-	-	0.05
11	39.383	13-26	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	3.36
12	40.141	8	(Isotiocianatometil)benzeno	4.66
13	42.089	13-21	Ácido Hexadecanóico, Metil Ester	0.45
14	42.761	10-20	3,7,11,15-Tetrametilhexadec-2-en-1-ol	0.28
15	43.201	14-20	Ácido Benzenodicarboxílico, Bis(2-metoxietil) Ester	0.39
16	43.983	13-20	Ácido Hexadecanóico	58.22
17	44.300	-	-	4.75
18	44.492	-	-	1.29
19	44.608	-	-	0.82
20	44.650	-	-	0.37
21	44.742	-	-	0.20
22	47.731	-	-	0.13
23	47.912	10-20	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	0.56
24	48.508	-	-	0.12
25	48.761	22	1,1-Diprop-2-enoxihexadecano	0.47
26	49.082	15-20	2-[(9Z)-9-octadeceniloxi] etanol	0.25
27	54.292	-	-	0.10
28	54.398	-	-	0.52
29	69.547	16-36	1-Nonadeceno	0.14

Cada componente foi analisado e caracterizado individualmente, sendo os principais mostrados nos espectros de massa sequencialmente abaixo.

Figura 39 - Espectro de massa no tempo de retenção de 29.765 minutos**Figura 40** - Comparação com dados da biblioteca do CG-EM

Biblioteca: WILEY8.LIB **CAS:** 143-07-7
Fórmula: C₁₂H₂₄O₂ **Nome do Composto:** Ácido Dodecanóico



De acordo com dados da biblioteca do CG-EM, a estrutura mais provável no tempo de retenção de 29,765 minutos corresponde ao composto, Ácido Dodecanóico ou ácido láurico, na porcentagem de 5,28%, que é um ácido gordo saturado (br: ácido graxo) com fórmula estrutural CH₃(CH₂)₁₀COOH. É o ácido principal do óleo de coco e do óleo de palma, e crê-se que possua propriedades antimicrobianas. É também encontrado no leite humano (5,8% da gordura total), no leite de vaca (2,2%) e leite de cabra (4,5%). Trata-se de um sólido, branco, pulverulento, com odor ligeiro a sabão.

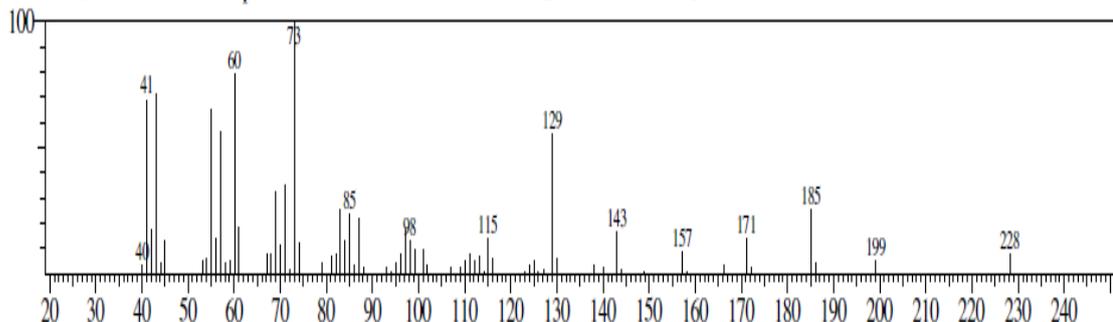
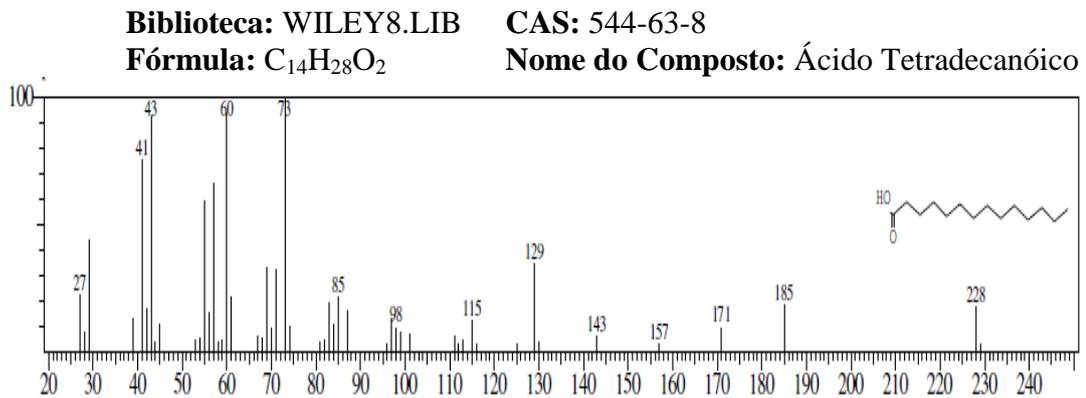
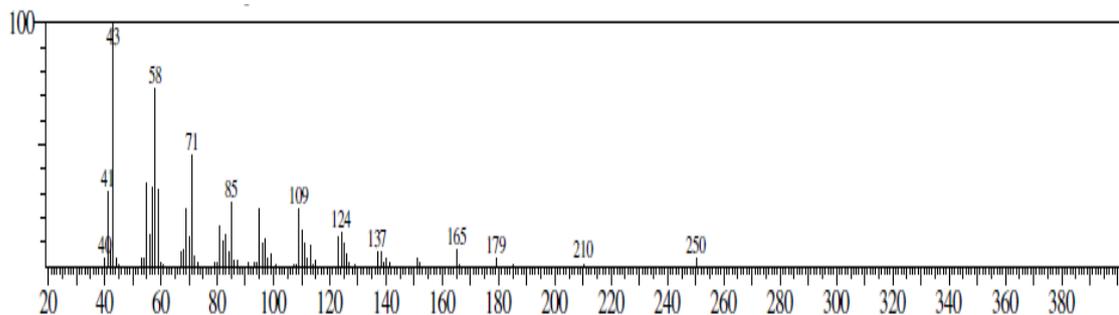
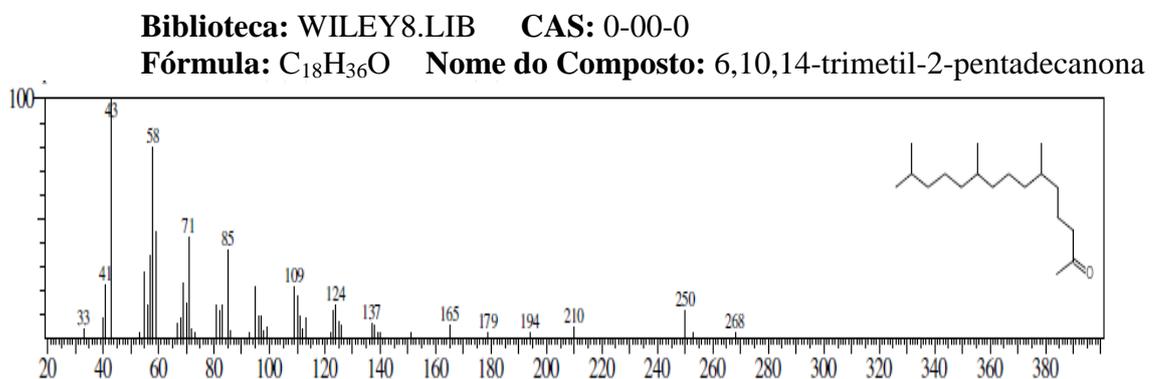
Figura 41 - Espectro de massa no tempo de retenção de 37.032 minutos

Figura 42 - Comparação com dados da biblioteca do CG-EM

De acordo com dados da biblioteca do CG-EM, a estrutura mais provável no tempo de retenção de 37,032 minutos, corresponde ao composto, Ácido Tetradecanóico, na porcentagem de 11,08%. Devido a nenhum estudo químico feito com essa espécie de planta e também os poucos estudos químicos realizados com este tipo de gênero *Psychotria*, não há como fazer um comparativo entre os resultados obtidos.

Figura 43 – Espectro de massa no tempo de retenção de 39.383 minutos**Figura 44** – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM

De acordo com dados da biblioteca do CG-EM, a estrutura mais provável no tempo de retenção de 39,383 minutos, corresponde ao composto 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, na porcentagem de 3,36%.

Figura 45 – Espectro de massa no tempo de retenção de 40.141 minutos

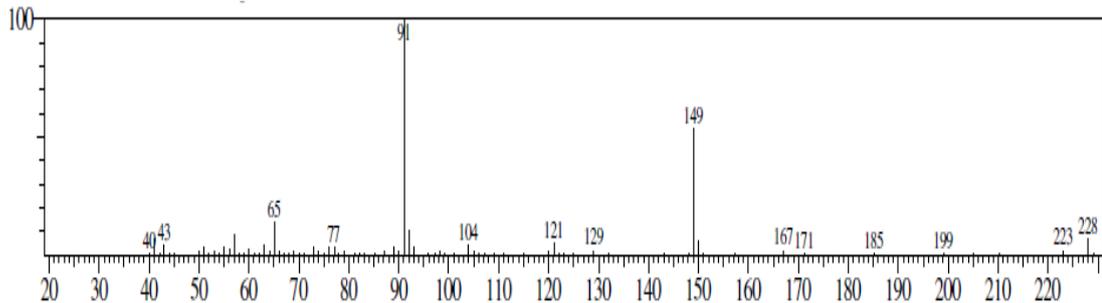
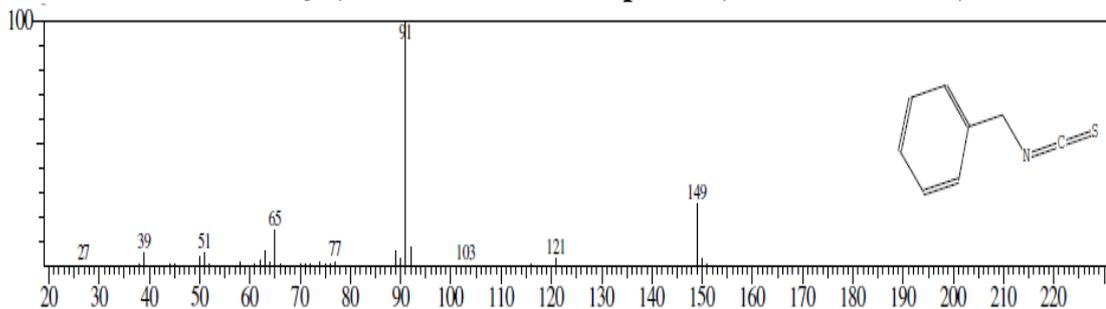


Figura 46 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM

Biblioteca: WILEY8.LIB **CAS:** 622-78-6

Fórmula: C₈H₇NS **Nome do Composto:** (Isotiocianatometil)benzeno



De acordo com dados da biblioteca do CG-EM, a estrutura mais provável no tempo de retenção de 40,141 minutos, corresponde ao composto (Isotiocianatometil)benzeno, na porcentagem de 4,66%.

Figura 47 – Espectro de massa no tempo de retenção de 43.983 minutos

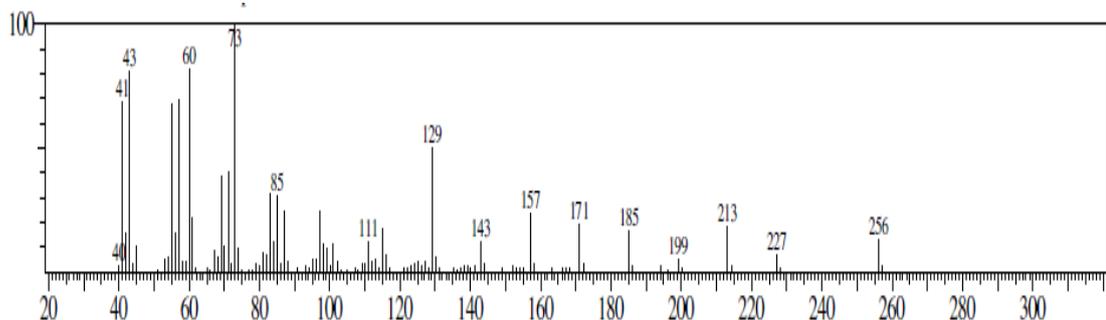
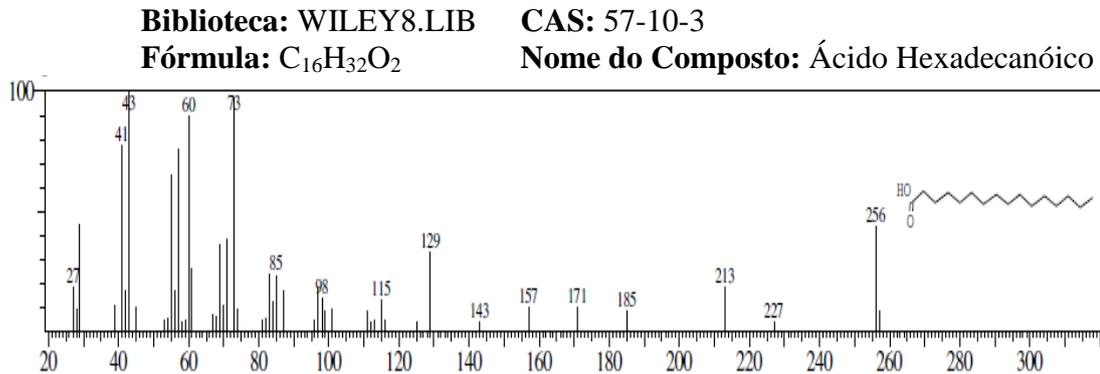


Figura 48 – Comparação com dados da biblioteca do CG-EM

De acordo com dados da biblioteca do CG-EM, a estrutura mais provável no tempo de retenção de 43,983 minutos, corresponde ao composto Ácido Hexadecanóico, na porcentagem de 58,22%.

Com bases nos resultados obtidos pode-se fazer uma tabela contendo os componentes majoritários e a concentração em cada amostra. Como descrito na Tabela 17.

Tabela 17 - Constituintes majoritários e suas concentrações em cada amostra

Amostra Folha	Concentração (%)	Amostra Fruto	Concentração (%)
Tetradecanal	20.10	Ácido Dodecanóico	5.28
1-Hexadecanol	9.25	Ácido Tetradecanóico	11.08
Tetradecanal	70.65	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	3.36
		(Isotiocianatometil)benzeno	4.66
		Ácido Hexadecanóico	58.22

Com base na Tabela 17 pode-se observar que na amostra da folha foi detectada uma grande porcentagem de Tetradecanal, que é um aldeído alifático que pode ser muito útil como aditivos alimentares e na indústria de perfumes (BAHARUM et al., 2010). Já na amostra do fruto o Ácido Hexadecanóico, também chamado de ácido palmítico, apresentou-se com maior porcentagem, o qual é sintetizado pelos mamíferos ou obtidos na própria dieta. Ele é um ácido graxo saturado, de cadeia longa e muito abundante na circulação sanguínea. Em relação aos ácidos graxos totais, a porcentagem dessa substância no plasma é de 26,7% em homens e 27,8% em mulheres na faixa etária de 20 a 25 anos de idade (NACHBAR, 2012).

Na literatura consultada, não foram encontrados registros para estudo químico do óleo essencial da espécie *Psychotria viridis* e também do gênero *Psychotria*. Tornando, estes resultados inéditos.

5.3 TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Quatro amostras foram testadas na atividade de inibição da acetilcolinesterase, dentre elas estão três extratos bruto provenientes do fruto inteiro, do caule e da folha da planta estudada, e foram designadas por A24, A25 e A26, respectivamente, extraído através do aparelho de Soxhlet utilizando como solvente o hexano. A outra amostra corresponde ao óleo essencial extraído do caule da espécie em questão, e foi designado por A23.

Os dados mostraram que a maioria das amostras foi capaz de influenciar na atividade enzimática da acetilcolinesterase de forma bastante relevante, como podemos observar na Tabela 18.

Extratos vegetais que apresentam atividades de inibição maiores do que 50% são descritos como potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase, e extratos com atividades de inibição entre 30 e 50% são descritos como de atividade baixa a moderada. Entretanto, atividades com inibição de até 30% são consideradas como resultados fracos (VINUTHA et al., 2007).

Eserina (ou fisostigmina) é um inibidor reversível de curta-duração da atividade da acetilcolinesterase, utilizado como controle positivo nos ensaios de inibição da enzima. A eserina é um alcaloide indólico obtido da planta *Physostigma venenosum* (SOUZA, 2011).

Tabela 18 – Inibição e classificação da intensidade de inibição de cada amostra

Amostras	% Inibição	Desvio Padrão	Intensidade da Inibição
Eserina	91,77	2,7	Potente
A23	20,4	3,60	Fraca
A24	38,98	4,75	Moderada
A25	84,22	4,79	Potente
A26	82,46	4,4	Potente

A mais alta taxa de inibição da AChE, entre os extratos e o óleo essencial avaliados, foi obtida com os extratos bruto do caule e da folha, que inibiram, respectivamente, cerca de 84,22 e 82,46% da atividade dessa enzima. Apresentou efeito moderado na ação de inibição da Ache (30 - 50%) o extrato extraído do fruto da planta *Psychotria viridis* (com percentual de inibição de 38,98%). Já o óleo essencial extraído do caule da planta (com percentual de inibição 20,4%) apresentou fraca inibição da enzima.

Extratos cuja inibição enzimática apresente inibição maior ou igual a 50%, são candidatos a fracionamentos e isolamento dos princípios ativos capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase (TREVISAN; MACEDO, 2003). Os extratos do caule e da folha de *Psychotria viridis* quando usados nos testes de inibição no presente estudo apresentou melhor

resultado em termos de percentual de inibição. Trevisan; Macedo (2003), em testes de inibição com extratos de plantas, obtiveram inibição de 3% com o extrato hidroalcoólico de folhas de *Bauhinia cheilantha*. Já os testes com os extratos metanólico das folhas e etanólico do fruto da *Vitex agnus-castus* inibiram a atividade da enzima com percentuais de 12 e 18%, respectivamente.

Andersen et al. (2006), avaliando a atividade inibitória de AChE por 11 extratos metanólicos e aquosos de plantas medicinais da Escandinávia e de três espécies *Corydalis*, plantas essas utilizadas para melhorar a memória e a cognição, demonstraram significativa atividade inibitória com os extratos de *Corydalis cava*, *Corydalis intermedia*, *Corydalis solida ssp. laxa* and *Corydalis solida ssp. Slivenensis* enquanto os extratos de *Ruta graveolens*, *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Petroselinum crispum* and *Mentha spicata* exibiram baixa inibição.

Os resultados dos estudos de inibição da acetilcolinesterase permitem concluir que os extratos do caule e da folha de *Psychotria viridis*, mostraram-se o melhor quanto à inibição da AChE.

5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

De acordo com a Tabela 19, pode-se observar que a amostra A24, que corresponde ao extrato proveniente do fruto inteiro da espécie *Psychotria viridis*, foi quem apresentou maior inibição a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, 43,152% para uma concentração da bactéria de 500µg. Porém o resultado não foi tão satisfatório comparado ao resultado obtido com o antibiótico utilizado, 100% com um erro de 1,273.

A amostra A23, que corresponde ao óleo essencial extraído do caule da planta em questão, apresentou uma inibição de 36,885% em uma concentração da bactéria de 500µg.

Já a amostra A25 e A26, extrato proveniente do caule e da folha respectivamente, apresentaram uma inibição de 21,020% em uma concentração de 3,90625µg e 42,754% na concentração de 500µg, respectivamente.

Tabela 19 – BIOENSAIO de MIC para Bactéria Gram-negativa *E. coli*.

Bactéria: <i>Escherichia coli</i>	A23		A24		A25		A26		ANTIBIÓTICO	
	Resultado	Erro(±)	Resultado	Erro(±)	Resultado	Erro(±)	Resultado	Erro(±)	Resultado	Erro(±)
% de Inibição 01 (500µg)	36,885	13,364	43,152	5,515	14,753	0,354	42,754	4,525	100	1,273
% de Inibição 02 (250µg)	31,713	3,041	27,883	5,586	6,198	3,677	27,286	3,323	100	2,051
% de Inibição 03 (125µg)	26,391	1,626	15,151	0,778	8,834	3,606	15,350	1,626	100	1,626
% de Inibição 04 (62,5µg)	24,103	0,424	13,112	1,485	9,083	0,919	16,941	4,879	100	1,485
% de Inibição 05 (31,25µg)	21,517	2,333	13,609	0,495	12,913	1,838	16,394	0,990	96,270	2,051
% de Inibição 06 (15,625µg)	20,124	0,283	17,090	1,626	13,360	2,970	20,622	0,566	95,375	0,707
% de Inibição 07 (9,375µg)	22,014	0,707	19,975	2,616	18,234	0,071	16,941	2,899	94,529	1,131
% de Inibição 08 (3,90625µg)	18,085	2,970	20,274	2,546	21,020	1,697	26,640	5,869	79,559	3,960

De acordo com a Tabela 20, pode-se observar que a amostra A26 foi quem apresentou maior inibição a bactéria gram-negativa *S. typhimurium*, 100% para uma concentração da bactéria de 500µg e um erro de 4,738. Porém o resultado não foi tão satisfatório, foi moderado, comparado ao resultado obtido com a ampicilina utilizada, 100% com um erro de 2,828.

A amostra A23, que corresponde ao óleo essencial extraído do caule da planta em questão, apresentou uma inibição de 35,913% com um erro de 12,728 em uma concentração da bactéria de 9,375µg.

Já a amostra A24 e A25, extrato proveniente do fruto inteiro e do caule respectivamente, apresentaram uma inibição de 74,531% com um erro de 13,223 em uma concentração de 500µg e 42,754% com um erro de 4,525 na concentração de 500µg, respectivamente.

Portanto, no presente estudo as amostras A23, A24, A25 e A26 apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas. Atividades antimicrobianas também foram observadas em outras espécies da família Rubiaceae (FIGUEIREDO et al., 2009). Khan et al. (2001) verificaram que os extratos metanólicos das folhas e das raízes de *Psychotria microlabrasta* L. (Sphalm) apresentaram amplo espectro de atividade antimicrobiana. Rajakaruma et al. (2002) detectaram atividade antimicrobiana de *Canthium* sp. Lam. contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *Mycobacter phlei*; de *Catunaregam spinosa* (Thumb.) D.D. Tirvengadam contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* e *M. phlei*; de *Morinda tinctoria* Roxb. contra *B. subtilis*; e de *Tarenna asiatica* (L.) Alston contra *M. phlei*. Linhagens isoladas de *Palicourea longiflora* (Aubl.) A. Rich., apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SOUZA et al., 2004). Extratos diclorometano e metanol das folhas de *Gonzalagunia rosea* Standl apresentaram atividade moderada contra *C. albicans* (CIM de 1,25 mg/mL a 2,5 mg/mL) e forte contra *Fusarium solani* (CIM de 0,31 mg/mL a 1,25 mg/mL) (NIÑO et al., 2006).

Tabela 20 – BIOENSAIO de MIC para Bactéria Gram-negativa *S. tiphymurium*.

Bactéria: <i>Salmonella</i> <i>tiphymurium</i> Concentração	A23		A24		A25		A26		AMPICILINA	
	Resultado	Erro(±)	Resultado	Erro(±)	Resultado	Erro(±)	Resultado	Erro(±)	Resultado	Erro(±)
% de Inibição 01 (500µg)	1,437	1,131	74,531	13,223	0	6,647	100	4,738	100	2,828
% de Inibição 02 (250µg)	4,335	6,223	32,082	0,354	6,096	0,354	87,887	1,838	100	0,778
% de Inibição 03 (125µg)	18,312	1,838	0,194	14,849	20,487	3,606	78,465	2,192	100	1,626
% de Inibição 04 (62,5µg)	31,254	2,546	59,622	2,616	42,332	1,061	65,627	2,758	100	1,061
% de Inibição 05 (31,25µg)	27,320	3,253	55,584	2,192	50,925	2,616	58,483	0,354	100	1,697
% de Inibição 06 (15,625µg)	20,280	8,344	43,885	6,859	33,428	4,950	43,885	0,778	100	2,970
% de Inibição 07 (9,375µg)	35,913	12,728	60,761	3,677	66,455	2,192	69,975	0,141	100	2,546
% de Inibição 08 (3,90625µg)	29,598	0,283	58,794	0,778	58,173	1,556	60,554	0,990	100	0,990

5.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Através das integrações dos sinais do espectro de RMN H^1 do extrato bruto de *Psychotria viridis* por hexano proveniente do fruto inteiro, designado por A24 (Figura 50, p.96), foi possível calcular pelo programa PROTÓLEOS (Figura 30, p.73) as propriedades físico-químicas tais como: o índice de iodo (II), índice de acidez (IA), índice de saponificação (IS), a massa molecular média (MM) e o índice de éster das amostras, ainda no mesmo programa foram possíveis calcular as porcentagens dos ácidos ω -9, ω -6, ω -3 e ácidos graxos saturados (AGS), enquanto que pelo programa SpinWorks 4.2.0, que é um Software livre, foi realizado as integrações. A Tabela 21 mostra os resultados obtidos para as propriedades físico-químicas do extrato bruto de *Psychotria viridis* por hexano da amostra A24 comparado com os óleos vegetais de outros estudos.

Devido à inexistência de trabalhos publicados referente ao gênero da espécie estudada, *Psychotria viridis*, os resultados obtidos foram comparados com resultados de trabalhos que utilizaram do mesmo programa para a determinação das propriedades físico-químicas.

Tabela 21 – Caracterização físico-química do extrato bruto do fruto inteiro de *Psychotria viridis* comparados a outros estudos da literatura

Extrato Bruto	II (mg I ₂ / g)	IS (mg KOH / g)	IA (mg KOH / g)	MM (g / Mol)
<i>Psychotria viridis</i> Hexano A24	90,42	101,34	4,44	1259,87
Andiroba Farias, 2013 (Óleo vegetal)	48,41	161,67	1,84	1004,02
Milho e Canola Andrade, 2011 (Óleo vegetal)	109,00 (Milho)	-	-	935,00 (Canola)

5.5.1 Índice de Iodo (II)

O índice de iodo é um número empírico que é útil na definição do grau de insaturação, não é uma medida quantitativa, (REDA, 2004). Farias (2013) afirma em seu trabalho que quanto maior a insaturação de um ácido graxo, maior será a sua capacidade de absorver o iodo, e conseqüentemente, maior será seu índice. Baseando-se na tabela 21, o valor referente ao extrato bruto do fruto inteiro de *Psychotria viridis* por hexano para a amostra A24 é de

90,42 mg I₂/g, um resultado de índice de iodo próximo aquele encontrado no óleo vegetal do Milho por Andrade (2011) que foi de 109,00 mg I₂/g e um índice um pouco distante do de Farias (2013) que foi de 48,41 mg I₂/g.

5.5.2 Índice de Saponificação (IS) e Massa Molecular Média (MM)

O extrato bruto de *Psychotria viridis* por hexano apresentou para a amostra A24 um índice de saponificação de 101,34 mg KOH/g, apresentando, portanto, um valor um pouco próximo daquele encontrado por Farias (2013) que foi de 161,67 mg KOH/g para o óleo vegetal de andiroba hexano. Andrade (2011) não realizou esta determinação em seus estudos. Já a massa molecular média do extrato bruto de *Psychotria viridis* por hexano para a amostra A24 apresentou um valor de 1259,87 g/mol, resultado mais próximo de Farias (2013) com 1004,02 g/mol e um pouco distante do valor encontrado por Andrade (2011) que foi de 935 g/mol para o óleo vegetal da Canola.

5.5.3 Índice de Acidez (IA)

De acordo com a Tabela 21, o extrato bruto de *Psychotria viridis* por hexano apresentou para a amostra A24 um índice de acidez de 4,44 mg KOH/g, enquanto que Farias (2013) achou um índice de 1,84 mg KOH/g para o óleo vegetal de andiroba hexano. Já Andrade (2011) não realizou esta determinação em seus estudos.

5.5.4 Índice de Éster (IE) e Percentagem de Éster (%IE)

Na Tabela 22 logo abaixo podemos observar os valores referentes ao índice de éster e de sua percentagem para as amostras de extratos brutos.

Tabela 22 – Índice de éster de extratos brutos

Extrato Bruto	Índice de éster (mg KOH/g)	% Éster
<i>Psychotria viridis</i> Hexano A24	96,91	95,81
Andiroba Farias, 2013 (Óleo vegetal)	159,83	98,87
Andiroba	191,97	99,04

Silva, 2005
(Óleo vegetal)

O índice de éster do extrato bruto de *Psychotria viridis* por hexano apresentou para a amostra A24 um valor de 96,91 mg KOH/g, mais ou menos próximo ao valor encontrado para o óleo vegetal de andiroba hexano de Farias (2013) e Silva (2005) que foi de 159,83 e 191,97 mg KOH/g, respectivamente. No entanto, os resultados mostraram que os óleos e o extrato bruto tem uma boa qualidade, com um teor em triglicerídeos maior que 95%.

5.5.5 Relação Hidrogênio Olefínicos / Alifáticos ($R_{o,a}$)

Antes de ser calculado o índice de acidez, foi necessário calcular primeiramente a relação hidrogênios olefínicos e alifáticos. Com relação a Farias (2013), a $R_{o,a}$ é um parâmetro que nos proporciona o grau de insaturação e o estado de oxidação dos óleos, sendo mais preciso que o índice de peróxido.

A relação hidrogênio olefínicos/alifáticos $R_{o,a}$, (equação 10, p. 71) encontrada para o extrato bruto de *Psychotria viridis* por hexano para a amostra A24 foi de 2,23, e este valor é bem superior ao obtido para o óleo de limão siciliano com 0,69 em trabalho de Reda; Carneiro; Carneiro (2005).

De acordo com a pesquisa de Reda, Carneiro e Carneiro (2005), uma relação hidrogênio olefínicos/alifáticos com o valor $\geq 0,66$ significa que o óleo vegetal pode ser considerado apropriado para o consumo humano, portanto, a amostra analisada proveniente da espécie *Psychotria viridis* é própria para tal consumo.

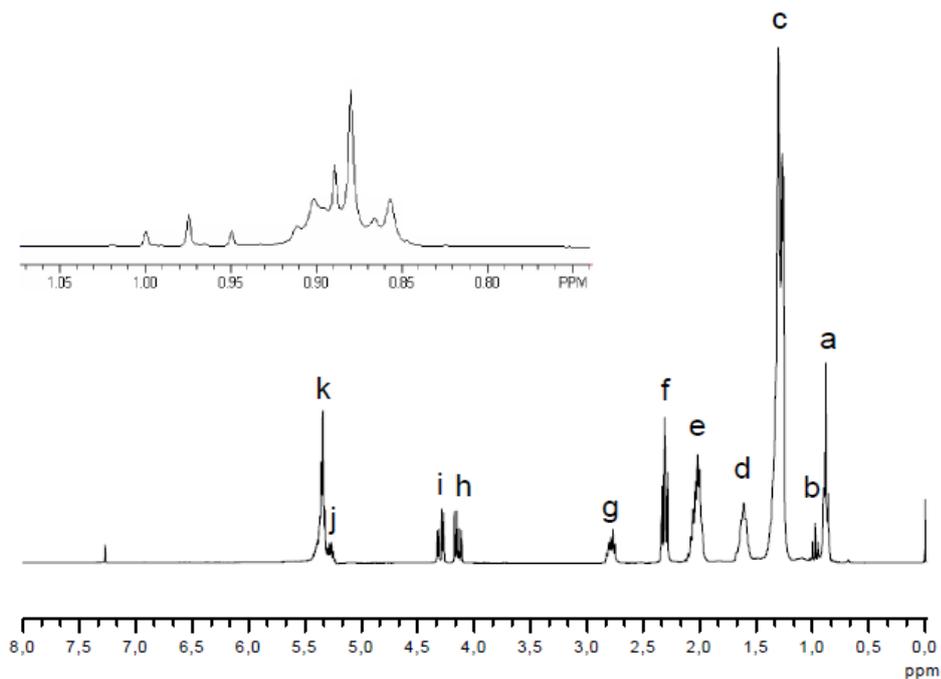
5.5.6 Composição química dos óleos por RMN H^1

De acordo com Reda (2010), 11 sinais (de A - K) com intensidades significantes são apresentados pelo espectro de RMN H^1 , estando estes sinais de acordo com os prótons dos principais componentes dos óleos, os triglicerídeos. Segundo Farias (2013), a atribuição geral dos sinais no espectro já foram previamente estudadas por alguns pesquisadores tais como Johnson e Schoolery (1962); Sachi et al. (1996), Miyake et al. (1998), Vigli et al. (2003), Knothe e Kenar (2004) e Kirby et al. (2011).

O espectro integrado do extrato bruto de *Psychotria viridis* por hexano é similar ao de outros óleos vegetais e o cálculo da composição de ácidos graxos insaturados e saturados ocorre através dos sinais apresentados no espectro.

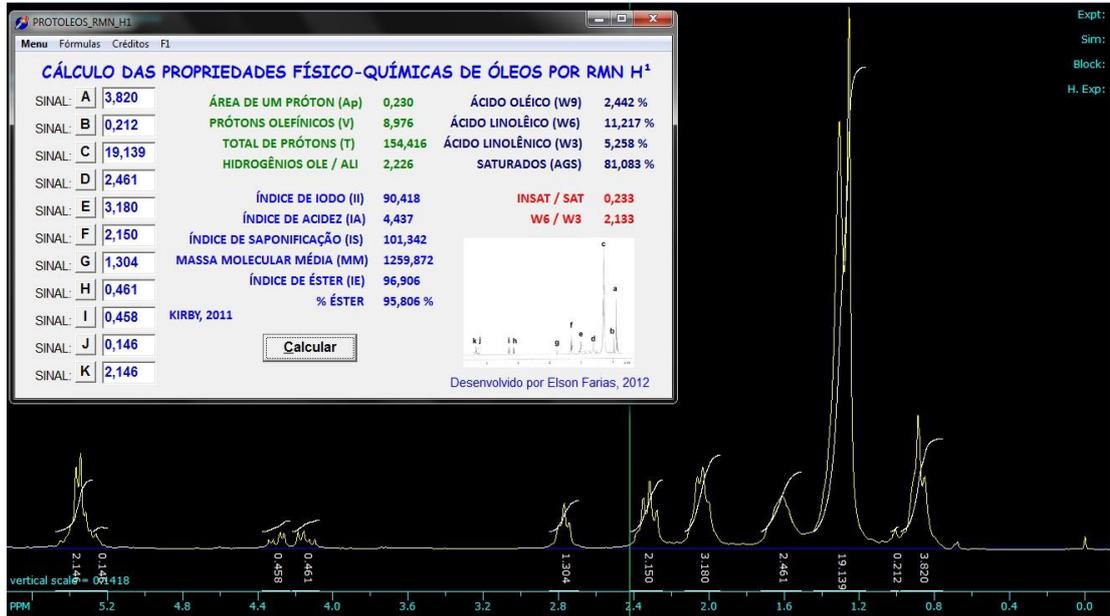
A Figura 49 apresenta o espectro de RMN H^1 de óleo vegetal genérico. Na figura 50 podem ser observados os principais sinais apresentados no espectro do extrato bruto de *Psychotria viridis* por hexano. Os respectivos deslocamentos são apresentados na Tabela 23.

Figura 49 – Espectro de RMN H^1 genérico de um óleo vegetal.



FONTE: REDA, 2004.

Figura 50 – Espectro de RMN H¹ integrado do extrato bruto do fruto inteiro de *Psychotria viridis* por hexano da amostra A24



Percebe-se, portanto, que segundo Mannina e Segre (2002) o número de prótons presentes em cada grupo funcional é estritamente proporcional à integral dos sinais dos espectros. Na Tabela 23 podemos observar os sinais característicos dos óleos vegetais com seu respectivo próton. O espectro integrado apresentado logo acima na figura 50 refere-se ao óleo de *Psychotria viridis* não refinado, ou seja, ao extrato bruto da espécie em questão. As letras dos sinais estão de acordo com a Figura 49, p. 95 (KNOTHE; KENAR, 2004, REDA; CARNEIRO, 2006).

Tabela 23 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN dos óleos vegetais

Sinal	Deslocamento (δ) ppm	Próton (H)	Grupo Funcional
A	0,83 – 0,93	-CH ₃	Prótons metílicos
B	0,93 – 1,03	-CH ₃	Prótons metílicos do ácido linolênico
C	1,22 – 1,42	-(CH ₂) _n -	Prótons metilênicos dos ácidos graxos do Triacilglicerol
D	1,52 – 1,70	-OCO-CH ₂ -CH ₂ -	Prótons beta-carboxílicos
E	1,94 – 2,14	-CH ₂ -CH=CH-	Prótons alílicos externos
F	2,23 – 2,36	-OCO-CH ₂ -	Prótons alfa-carboxílicos
G	2,70 – 2,84	=HC-CH ₂ -CH=	Prótons alílicos internos
H	4,10 – 4,25	-CH ₂ OCOR	Prótons metilênicos do glicerol
I	4,25 – 4,32	-CH ₂ OCOR	Prótons metilênicos do glicerol
J	5,20 – 5,26	>CHOCOR	Próton H-2 metilênico do glicerol
K	5,26 – 5,40	-CH=CH-	Prótons olefínicos

FONTE: REDA, 2004.

Como pode ser observado na Figura 49 (p. 95), os prótons metílicos dos ácidos saturados, oléico, linoléico e linolênico aparecem no sinal “a” entre 0,83 a 0,93 ppm.

Farias (2013) afirma em seu trabalho que os óleos vegetais apresentam diferentes porcentagens de ácidos graxos Saturados (AGS), ácido oléico (G-9), ácido linoléico (G-6) e ácido linolênico (G-3), de forma que os sinais resultantes, os quais são consequência da sobreposição dos prótons metílicos dos tripletos, formam diferentes deslocamentos químicos e apresentam tamanhos distintos dependendo da proporção dos ácidos graxos.

De acordo com Kirby (2011), através do método de RMN H^1 podemos determinar proporções de diferentes de ácidos graxos. Os resultados obtidos para o extrato bruto de *Psychotria viridis* e sua comparação aos dados da literatura são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Composição de ácidos graxos majoritários do extrato bruto do fruto inteiro de *Psychotria viridis* e de outros óleos vegetais encontrados na literatura por RMN H^1

Ácidos graxos (%)	Extrato bruto <i>Psychotria viridis</i> (Hexano)	Andiroba Farias, 2013 (Óleo vegetal)	Andiroba Silva, 2005 (Óleo vegetal)
Linolênico (G-3)	5,26	9,99	0,24
Linoléico (G-6)	11,22	13,14	8,30
Oléico (G-9)	2,44	47,32	51,80
Insaturação	18,92	70,45	60,35
Saturados	81,08	29,55	36,45

Ao analisar a Tabela 24, o valor encontrado para o ácido linolênico no extrato bruto do fruto inteiro de *Psychotria viridis* foi de 5,26%, resultado próximo ao óleo vegetal de andiroba que apresentou 9,99% (FARIAS, 2013). Já Silva (2005) achou um valor bastante baixo para o ácido linolênico no óleo vegetal de andiroba, que foi de 0,24%.

Em seguida, foi verificado que para o ácido linoléico o extrato bruto do fruto inteiro de *Psychotria viridis* apresentou 11,22%, um valor próximo à concentração obtida para os outros óleos retirados da literatura, 13,14% (FARIAS, 2013) e 8,30% (SILVA, 2005).

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Em humanos, os ácidos linoléico (18:2n-6, AL) e alfa-linolênico (18:3n-3, AAL) são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sangüíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominados essenciais por não serem

sintetizados pelo organismo a partir dos ácidos graxos provenientes da síntese de novo (MARTIN et al., 2006).

A concentração de ácido oléico do extrato bruto do fruto inteiro de *Psychotria viridis* por hexano foi de 2,44%, estando abaixo dos valores encontrados para os óleos de andiroba, 47,32% (FARIAS, 2013) e 51,80% (SILVA, 2005) apresentados na Tabela 24.

O grau de insaturação encontrado para o extrato bruto do fruto inteiro de *Psychotria viridis* foi de 18,92%, um valor inferior àqueles encontrados para os óleos vegetais de andiroba de Farias (2013) e Silva (2005) que foram, respectivamente, 70,45% e 60,35%. A presença de ácidos graxos insaturados é responsável pela digestibilidade e qualidade de óleos vegetais comestíveis (SANTOS, 2011).

6 CONCLUSÃO

Os constituintes majoritários identificados no óleo essencial da folha de *Psychotria viridis* foram 1-Hexadecanol e Tetradecanal, sendo o primeiro um excelente emoliente, agente estabilizante e doador de consistência para as emulsões cosméticas e farmacêuticas. Já no fruto foram identificados o ácido dodecanóico, ácido Tetradecanóico, 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, (Isotiocianatometil)benzeno e Ácido Hexadecanóico, no qual o primeiro atua como antiinflamatório e crê-se que possua propriedades antimicrobianas e estimule o sistema imunológico.

Todas as amostras testadas apresentaram atividade antimicrobiana para *E. coli* e *S. typhimurium*, mas as amostras A24 e A26 foram quem obtiveram maior inibição em relação as essas bactérias gram-negativas.

Os dados mostraram que a maioria das amostras foram capazes de influenciar na atividade enzimática da acetilcolinesterase de forma bastante relevante, porém a maior taxa de inibição da AChE, entre os extratos e o óleo essencial avaliados, foi obtida com os extratos bruto do caule e da folha, que inibiram, respectivamente, cerca de 84,22 e 82,46% da atividade dessa enzima, o que reforça a necessidade da continuidade do estudo de forma a realizar a partição do extrato e a purificação das frações para isolar a molécula responsável pela inibição observada.

A técnica de RMN H^1 demonstrou ser uma metodologia analítica importante usada na análise de amostras de óleo vegetal por não ser destrutiva, pela sua rapidez em comparação com técnicas convencionais e na determinação das propriedades físico-químicas dos óleos.

O programa PROTÓLEOS desenvolvido em software livre mostrou-se eficaz na execução das fórmulas aplicadas para as determinações físico-químicas propostas para este estudo.

Portanto, o presente estudo revelou que a espécie *Psychotria viridis* mostrou-se ser um potencial para futuras minuciosas análises, já que ainda não se tem publicados trabalhos a respeito dessa planta, o que poderá levar a possíveis descobertas quanto a sua utilidade dentro da medicina popular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D.F. **Caracterização de Biodiesel através da Separação dos Constituintes por Cromatografia Líquida.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2011.

ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; BARBOSA, T.P.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; SILVA, T.M.S. **Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 16(4): 517-524, Out./Dez. 2006.

BADKE MR, BUDÓ MLD, ALVIM NAT, ZANETTI GD, HEISLER EV. **Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais.** Texto Contexto Enferm, Florianópolis, 2012 Abr-Jun; 21(2): 363-70.

BAHARUM, S.N.; BUNAWAN, H.; GHANI, M.A.; MUSTAPHA, W.A.W.; NOOR, N.M. **Analysis of the Chemical Composition of the Essential Oil of Polygonum minus Huds. Using Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC-TOF MS).** Molecules 2010, 15, 7006-7015; doi: 10.3390/molecules15107006.

BENEVIDES, P.J.C.; YOUNG, M.C.M.; BOLZANI, V.S. **Composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Psychotria spectabilis* L. (Rubiaceae).** Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 1996.

BERGAMASCHI, J.M. Terpenos. Terpenoil Tecnologia Orgânica. Disponível em: <<http://www.terpenoil.com.br/tecnologia/terpenos.pdf>> Acessado em: 19 de Fevereiro de 2015.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. **Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil.** Infarma, v.17, nº ¾, 2005.

BESSA, N.G.F.; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U.; QUIRINO, M.S.; CHAGAS JUNIOR, A.F.; ALVES, A. **Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins.** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v. 15, n. 4, supl. I, p. 692-707, 2013.

BIESKI, I.G.C. **Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá-MT.** Monografia apresentada ao Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2005.)

BUTLER, M.S. **Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials.** Nat. Prod. Rep, n. 22, p. 162-95, 2005.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. **Óleos Essenciais no Brasil: Aspectos Gerais, Desenvolvimento e Perspectivas.** Quim. Nova, Vol. 32, No. 3, 588-594, 2009.

BOTH, F.L. **Avaliação do perfil psicofarmacológico de psicolatina isolada de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae).** Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre, 2005.

BOTH, F.L.; FARIAS, F.M.; NICOLÁO, L.L.; MISTURINI, J.; HENRIQUES, A.T.; ELISABETSKY, E.E. **Avaliação da atividade analgésica de extratos alcaloídicos de espécies de *Psychotria*.** REV. BRA. PL. MED., Botucatu, v. 5, n. 1, p. 41-45, 2002.

BRUNETON, J. **Farmacognosia.** Fitoquímica. Plantas medicinales, 2ª. Edición. Technique et documentation-Lavoisier. De La edición en lengua española. Editorial Acribia, S.A., Apartado 46650080, Zaragoza, España, 2001.

CÁRDENAS, ANDREA V. & GÓMEZ, AUGUSTO P. Consumo urbano de yajé (ayahuasca) en Colombia. Adicciones – Revista de Socidrogalcohol, v. 16, n. 4, p. 323-334, Palma de Mallorca, 2004. Disponível em: <<http://www.documentacion.edex.es/docs/1101VELcon.pdf>>. Acesso em: 23 de setembro de 2013.

CARMO, E. S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E. L. The potential of *origanum vulgare* l. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology, v. 39, n.2, p. 362-367, June 2008. Disponível em: <[HTTP://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151783822008000200030&Ing=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151783822008000200030&Ing=en&nrm=iso)> Acessado em 28 de Fevereiro de 2015.

CARVALHO, M.G.; JUNIOR, J.G.R.; CAVATTI, L.C.; SUZART, L.R.; CORNELIUS, M.T.F.; SILVA, V.C.; CARDOSO, M.A.R. **Determinação estrutural de flavonoides com análise de espectros de RMN H^1 1D e reação com diazometano.** Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Exatas e da Terra. Seropédica, RJ, EDUR, v. 25, n. 1-2., p. 46-59, 2006.

CGEES/SEPLAN – RR. **Informações Socioeconômicas do Município de Cantá – RR.** Secretaria de Estado do Planejamento e Desenvolvimento de Roraima. [Elaboração: Divisão de Estudos e Pesquisas] 1ª edição. Boa Vista, 2010. 62p.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. **O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos.** Quim. Nova, Vol. 31, No. 3, 623-636, 2008.

COELHO, V.P.M.; AGRA, M.F.; BARBOSA, M.R.V. **Estudo Farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schldl.) K.Schum. (Rubiaceae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 16 (2): 170-177, Abr./Jun. 2006.

COLOMBI, J.S. **Avaliação da Acetilcolinesterase como biomarcador em experimentos de contaminação in vitro com MeHg e HgCl₂ em *Hoplias malabaricus***. Monografia (Bacharel em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UEN. Campos dos Goytacazes/RJ. Julho, 2009.

COMTRADE, 2005. Disponível em: <http://data.un.org/Data.aspx?d=ComTrade&f=_11Code%3a34>. Acessado em: 20 de Fevereiro de 2015.

CORREIA, I.M.S. **Extração e Pirólise do óleo de Girassol (*Helianthus annus* L.) Visando a Produção de Biocombustíveis**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

COSTA, E.L.A.; BAPTISTA, J.A. **Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massa**. Centro de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET MG. Timóteo, MG. Novembro de 2009. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAa_8AI/cromatografia-gasosa-acoplada-a-espectrometria-massa#> Acessado em 21 de Fevereiro de 2015.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G; ANGÉLICO, E.C.; PEREIRA, C.K.B.; SOUZA, E.O.; CALDAS, G.F.R.; SILVA, M.R.; SANTOS, N.K.A.; MOTA, M.L.; SANTOS, P.F. **Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol)**. Revista Brasileira de Farmacognosia. 18(4): 583-586, Out./Dez. 2008.

DE LA ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. **Fruit and vegetable phytochemicals : chemistry, nutritional value and stability**. 1^oed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA, v.1, p. 382, 2010.

DINIZ et al. **Classificação multivariada de ervas medicinais da região amazônica e suas infusões de acordo com sua composição mineral**. Química Nova, Vol. 36, No. 2, 257-261, 2013.

DUARTE, M.C.T. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil**. Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais #7, Outubro 2006.

FARIAS, E.S. **Propriedades Físico-químicas e perfil dos ácidos graxos do óleo da semente de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) de Roraima**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Química. Universidade Federal de Roraima (UFRR). Boa Vista, RR. 2013.

FERRAREZE, M.V.G.; LEOPOLDO, V.C.; ANDRADE, D.; SILVA, M.F.I.; HAAS, V.J. **Pseudomonas aeruginosa multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem?** Acta Paul Enferm. 20(1): 7-11, 2007.

FIGUEIRA, G. M. et al. **Atividade antimicrobiana do extrato e do óleo essencial de *Piper spp* cultivadas na coleção de germoplasmas do CPQBA-Unicamp.** Rev. Bras. Farm, v. 14, n. 1, p. 51-53, 2011.

FIGUEIREDO, A.D.L.; BUSTAMANTE, K.G.L.; SOARES, M.L.; PIMENTA, F.C.; BARA, M.T.F.; FIUZA, T.S.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R. **Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomez (Rubiaceae).** Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., 2009; 30(2): 193-196. ISSN 1808-4532.

FRANCO, R.M. **Escherichia coli: Ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em linguça frescal tipo toscana.** Tese (Doutorado). Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro, 2002.

FRANÇA, I.S.X. et al. **Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais.** Revista Brasileira de Enfermagem, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

FREIRE, J.M. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade bilógica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2008.

GELBARD, G.; BRÉS, O.; VARGAS, R.M; VIELFAURE, F.; SCHUCHARDT, U.; J. **Am. Chem. Soc.** 1995, 72(10), 1239-1241.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. **Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Algumas Árvores Nativas.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, Jul./Set., 2005.

GROB, C. S.; MCKENNA, D. J.; CALLAWAY, J. C.; BRITO, G. S.; NEVES, E. S.; OBERLAENDER, G. 1996. **Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil.** J Nerv Ment Dis, 184: 86–94.

GROSSMAN, L. **Óleos Essenciais na culinária, cosmética e saúde.** Editora Optionline, São Paulo, 301 p. 2005.

GUILLÉN, M.D.; RUIZ, A. **High resolution ¹H Nuclear Resonance in Study of Edible Oils and Fats.** Trends in Food Science & Technology, n.12, p.328–338, 2001.

HENRIQUES A.T.; KERBER V.A. Moreno PRH 2000. **Alcalóides: generalidades e aspetos básicos.** In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, p. 641-642.

IBGE. **Uso da Terra e a Gestão do Território no Estado de Roraima**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Rio de Janeiro, 2009.

Instituto Adolfo Lutz (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª edição, São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, versão eletrônica, p.595, 2008.

ITC, 2005. Disponível em: <<http://www.intracen.org/tradstat/sitc3-3d/ip551.html> >. Acessado em 20 de Fevereiro de 2015.

KAROU SD, TCHACONDO T, ILBOUDO DP, SIMPORE J. **Sub-Saharan Rubiaceae: a review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities**. Centre de Formation et de Recherche sur les Plantes Médicinales (CERFOPLAM), Université de Lomé, Togo. Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS [2011, 14(3):149-169].

KHAN, M.R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A.D. **Antimicrobial activity of *Bidens pilosa*, *Bischofia javanica*, *Elmerillia papuana* and *Sigesbekia orientalis***. Fitoterapia 2001; 72: 662-5.

KIRBY, C.W.; FOFANA, B.; MCCALLUM, J.L. **A ^1H NMR study of the fatty acid distribution in developing flax bolls before and after a cooking treatment**. Canadian Journal of Chemistry, 2011, 89(9): 1138-1142, v11-057.

KNOTHE, G.; KENAR, J. A. **Determination of the fatty acid profile by ^1H -NMR Spectroscopy**. Eur. J. Lipid Sci. Technol, n. 106 p.88–96, 2004.

LABIGALINI, E. J. **O uso de ayhuasca em um contexto religioso por ex-dependentes de álcool - um estudo qualitativo**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo; 1998. p. 1 – 67.

LEAL, R.V.P. **Avaliação metrológica de métodos para determinação do índice de iodo em biodiesel B100**. Dissertação de Mestrado. Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Rio de Janeiro, 2008.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida***. Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 16(2): 197-201, Abr./Jun. 2006.

LUPE, F.A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2007.

MABIT, M. 1996. **Takiwasi: ayahuasca and shamanism in addiction therapy**. MAPS Newslett. 6, 24–27.

MACHADO, B.F.M.T.; JUNIOR, A.F. **Óleos Essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais.** Cad. Acad., Tubarão, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MANNINA, L.; SEGRE, A. **High Resolution Nuclear Magnetic Resonance: From Chemical Structure to Food Authenticity.** Grasas y Aceites, n. 22, v. 53. Fasc.1, p. 22-33, 2002.

MARINS, A.K.; VIEIRA, D.F.; QUADROS, I.P.S.; PINHEIRO, P.F.; QUEIROZ, V.T.; COSTA, A.V. **Prospecção Fitoquímica das partes aéreas da erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides* L.).** XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2011.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. **Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos.** Rev. Nutr., Campinas, 19(6):761-770, nov./dez., 2006.

MARTINS, L.M. **Estudo de Salmonella Typhimurium de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão.** Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

MATOS, F.J.A., **Introdução à fitoquímica experimental.** UFC Edições. p. 44-46, 1997.

MCKENNA, D. J. 2004. **Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: Rationale and regulatory challenges.** Pharmacology & Therapeutics, 102: 111–129.

MENDES, S. S. et al. **Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves.** Journal of Ethnopharmacology, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010. ISSN 0378-8741. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110002369>> Acessado em 25 de Fevereiro de 2015.

MENDONÇA, M.A.; BORGIO, L.A.; ARAÚJO, W.M.C.; NOVAES, M.R.C.G. **Alterações físico-químicas em óleos de soja submetidos ao processo de fritura em unidades de produção de refeição no Distrito Federal.** Com. Ciências Saúde. 2008; 19(2): 115-122.

MOTTA, L.S.G. **Toxicidade aguda, Neurotoxicidade, Toxicidade reprodutiva e Embriotoxicidade do chá Ayahuasca (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*) em Ratas Wistar.** Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre. Universidade de Brasília, DF, 2013.

MOURA, A.K.S.; SOUZA, B.K.M.; OLIVEIRA, C.; KOTINSK, E.; ALVES, E.; SAMPAIO, J.S.; SANTOS, W.S.; CASTILHO, A.S.; MAHLKE, J.D. **Uso de *Palicourea rígida* kunth**

(Rubiaceae) utilizada pela comunidade indígena Macuxi. Faculdade Cathedral, Boa Vista, Roraima, 2013.

MOURA, L.T.S.; MARUO, V.M. **Aspectos Farmacológicos e Toxicológicos de *Psychotria colorata*.** Revista Científica de Medicina Veterinária – ISSN: 1679-7353. Ano XII-Número 23 – Julho de 2014 – Periódico Semestral. Universidade Federal do Tocantins – UFT, Araguaína, Tocantins, Brasil.

NACHBAR, R.T. **Efeito dos ácidos palmítico e palmitoléico sobre o metabolismo de glicose no músculo óleo de ratos.** Doutorado (Tese). Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; BARBOSA JÚNIOR, A.M.; TRINDADE, R.C. **Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 17(1): 108-113, Jan./Mar. 2007.

NERY, F.S.G.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; KOEHLER, H.S. **Enraizamento de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra (RUBIACEAE) nas quatro estações do ano.** Ciência Florestal, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 243-250, jan.-mar., 2014.

NIÑO J.; NARVÁEZ, D.M.; MOSQUERA, O.M.; CORREA, Y.M. **Atividades antibacteriana, antifúngica e citotóxica de oito plantas Asteraceae e duas Rubiaceae da biodiversidade colombiana.** Braz J Microbiol. 2006; 37(4): 566-70.

NOGUEIRA, M.T.D.; LOURENÇO, J.A.A. **Óleos Essenciais: A Normalização e a sua importância no âmbito do Regulamento Reach.** Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-prático, pp. 72-79, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal, 2007.

OLIVEIRA, G.G. **Identificação dos Constituintes Químicos e Atividade Biológica do Óleo Essencial de *Trattinnickia burserifolia* Mart. (Burseraceae) da Serra do Tepequém, Amajari – Roraima.** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Roraima. Mestrado em Recursos Naturais. Boa Vista – RR. 2014.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SOUZA, E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R.N. **Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica.** Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn. 16(1): jan./mar. 2006.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais.** Revista

Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 18(2): 301-307, Abr./Jun. 2008.

PEREIRA, EDMUNDO. **Ayahuasca: expansão de usos rituais e de formas de apreensão científica.** Revista Brasileira de Ciências Sociais, v. 18, n. 52, p. 203-207, São Paulo, junho, 2003.

PETRONILHO, E.C.; PINTO, A.C.; VILLAR, J.D.F. **Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química.** 2011. Disponível em: <http://rmct.ime.eb.br/arquivos/RMCT_3_tri_2011/RMCT_067_E5A_11.pdf> Acessado em 27 de Fevereiro de 2015.

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

PISTELLI, E.C., SILVA, A.B. **Descrição da metodologia do uso do Clevenger na extração de óleos vegetais.** VII Simpósio de Pesquisa, 2012, XI Seminário de Iniciação Científica (SEMIC), 2012, Alfenas. Alfenas: Unifenas, 2012. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/semic>>. Acessado em: 24 de Setembro de 2013.

RAJAKARUNA, N.; HARRIS, C.S.; TOWERS, G.H.N. **Antimicrobial Activity of Plants Collected from Serpentine Outcrops in Sri Lanka.** Pharm Biol. 2002; 40(3): 235-44.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. **Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae).** Journal of Asia-Pacific Entomology, v. 13, p. 107-109, 2010. Disponível em: <http://resolver.scholarsportal.info/resolve/12268615/v13i0002/107_ccalaocvaalc> Acessado em 25 de Fevereiro de 2015.

REDA, S.Y. **Estudo comparativo de óleos vegetais submetidos a estresse térmico.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2004.

REDA, S.Y. **Biodiesel Quality Control for Advanced Analytical Techniques.** Tese de Doutorado. UFPA, Curitiba- PA, 2010.

REDA, S.Y.; CARNEIRO, P.I.B. **Parâmetros físico-químicos do óleo de milho in natura e sob aquecimento calculado pelo programa PROTEUS RMN H1.** UEPG Exact Earth Sci., Agr. Sci. Eng., Ponta Grossa: p. 31-36, 2006.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I.B.; CARNEIRO, E. B. B. **¹H NMR Characterization of Seed Oils from Rangpur Lime (*Citrus limonia*) and “Sicilian” Lemon (*Citrus limon*).** Ann. Magn. Reson. v. 4, n. 3, p.64- 68, 2005.

RIBEIRO, E. P., SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, Instituto Mauá de Tecnologia, 2004.

ROBBRECHT, E., AND MANEN, J.F. **The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on *rbc L*, *rps 16*, *trn L-trn F*, and *atp B-rbc L* data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubiaceae**. Systematics and Geography of Plants. 76:85 – 146, 2006.

RODRIGUES, M.R.A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em Manjerona e Orégano**. Tese para doutorado em química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2002.

RODRIGUES, R.A. **Introdução à farmacognosia**. Curso de farmácia. UNIPAC, 2013. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABhi8AJ/introducao-a-farmacognosia>>. Acessado em: 09 de outubro de 2013.

RODRIGUEZ, R.M. **Estudo da Emissão de Íons Estáveis e Metaestáveis (LiF)nLi⁺ Induzida por Fragmentos de Fissão do ²⁵²Cf**. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro – PUC-Rio. Rio de Janeiro, agosto de 2003.

RUBIACEAE. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Rubiaceae>> Acessado em 22 de Fevereiro de 2015.

SALDANA, M.D.A. **Extração de alcaloides de produtos naturais com fluidos supercríticos**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. Campinas, SP. 2002.

SALGADO, M.P.G.; FURLAN, M.R.; AOYAMA, E.M.; RODRIGUES, E.; CRUZ, L.P. **Propagação Assexuada de chacrona (*Psychotria viridis* Ruiz & Pavon) Via Estaquia Foliar**. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, v.5, n.2, p. 383-396, maio/ago. 2012.

SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; NETO, O.G.R. **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicado Técnico, p. 99. Novembro, 2004. Belém, PA.

SANTOS, C. X. **Caracterização físico-química e análise da composição química da semente de goiaba oriunda de resíduos agroindustriais**. Dissertação de Mestrado, UESB, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 2011.

SANTOS, R.G. Ayahuasca: neuroquímica e farmacologia. **SMAD – Revista Eletrônica Saúde Mental Álcool e Drogas**, v. 3, n. 1, Ribeirão Preto, fevereiro, 2007. Disponível em:

<http://pepsic.bvs-psi.org.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-69762007000100007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 23 de setembro de 2013.

SCHETINGER, W. L. **Identificação botânica e prospecção fitoquímica da planta *Siparuna aff. Cujabana* (Monimiaceae).** Pirenópolis Natural Clínica e Spa, Fevereiro/2012. Disponível em: <<http://pirenopolisnaturalclnicaspa.blogspot.com.br/2012/02/identificacaobotanica-e-prospeccao.html>>. Acesso em: 23 de Setembro de 2013.

SCHULTES RE, HOFFMANN A. **The Botany and Chemistry of Hallucinogens.** 2nd ed. Charles C. Thomas, Springfield, IL, 1980.

SERENIKI, A.; VITAL, M.A.B.F. **A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos.** Rev. Psiquiatr. RS. 30 (1 Supl); 2008.

SÉRPICO, R.L.; CAMURÇA, D.M. **Ayahuasca: Revisão teórica e considerações botânicas sobre as espécies *Banisteriopsis caapi* (Griseb. in Mart.) C. V. Morton e *Psychotria viridis* Ruiz & Pavón.** Monografia apresentada à disciplina de Metodologia do Trabalho Científico. Universidade Guarulhos. Guarulhos, 2006.

SERRANO-DUENAS, M.; CARDOZO-PELAEZ, F.; SANCHEZ-RAMOS, J. R. 2001. Scientific Review of Alternative Medicine, 5: 127– 132.

SILVA, C.L.M. **Obtenção de ésteres etílicos a partir de transesterificação do óleo de andiroba com etanol.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 2005. p. 78.

SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. **Atividade Antimicrobiana do Extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 17(4): 572-577, Out./Dez. 2007.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. **Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes.** Acta Amazônica. Manaus. v. 38, n. 1, 2008. Disponível em: <[HTTP://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S004459672008000100012&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S004459672008000100012&lng=en&nrm=iso)> Acessado em 25 de Fevereiro de 2015.

SILVA, S.R.S. et al. **Análise de constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.6, n.1, p.63-70, 2003.

SILVA, C.L.M. **Obtenção de ésteres etílicos a partir de transesterificação do óleo de andiroba com etanol.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 2005. p. 78.

SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª edição. Editora da UFSC, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. 4ª. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRS/ UFSC, 2004.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. Trad. Ignez Caracelli [et al.]- 5.ed.- Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham**. Acta Amaz. 2004; 34(2): 185-95.

SOUZA, C.A.S.; AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. **Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. – Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 37, n. 6, p. 429-433, 2000.

SOUZA, C.M.D. **Curso de Biomedicina Microbiologia II**. Universidade Católica de Goiás. Disponível em: <http://www2.ucg.br/cbb/professores/69/Biomedicina/7_periodo/Microbiologia_II/Apostila%20de%20Microbiologia%20II.pdf> Acessado em 25 de Fevereiro de 2015.

SOUZA, E.B.; ANDRADE, I.M.; MELO, L.M.B. & SILVA, M.F.S. **Rubiaceae do Município de Ilha Grande, Piauí, Brasil**. IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 69, n. 1, p. 155-165, julho 2014.

SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P. **Farmacognosia: coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2012.

SOUZA, P.M.; **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma Cerrado**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Brasília, 2011.

SOUZA, R.K.D.; MENDONÇA, A.C.A.M.; SILVA, M.A.P. **Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil**. Universidade Regional

do Cariri. Crato, CE, Brasil. Revista Cubana de Plantas Medicinales, vol. 18, no. 1, Ciudad de La Habana ene.- mar. 2013.

SOUZA, S.A.M.; MEIRA, M.R.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R. **Óleos Essenciais: Aspectos Econômicos e sustentáveis.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, vol. 6, N.10, 2010.

SOUZA, VINICIUS C. & LORENZI, HARRI. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseada em AGP II.** Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2005. p. 355, 468-469.

TOFANINI, A.J. **Controle de Qualidade de Óleos Comestíveis.** Monografia (Graduação em Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

TOMA, D. **Análise da qualidade de óleos vegetais em sementes intactas por RMN de baixa resolução.** Dissertação de Mestrado. Universidade de Federal de São Carlos. São Carlos, 2009.

TRANCOSO, M.D. **Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano.** Revista Práxis. Ano V. nº 9. Junho de 2013.

TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v.26, n.3, p.301-4, 2003.

TULP, M; BOHLIN, L. **Unconventional natural sources for future drug discovery.** Drug Discovery Today, v. 9, n. 10, p.450-58, 2004.

TYRREL, M. H., 1990. **Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies.** Fd Tech. January, 68-72.

VASCONCELOS, A.F.F.; GODINHO, O.E.S. **Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba.** Quim. Nova, Vol. 25, No. 6B, 1057-1060, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F. **Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população.** Revista Brasileira Farmacogn. Braz J. Pharmacogn. 18(2): Abr/Jun, 2008.

VERGUTZ, E.; ISEWAKI, H.M.; SOARES, W.W. **Família Botânica Rubiaceae.** Faculdade de Engenharias e Ciências Agrárias do Centro Universitário de Patos de Minas, Minas Gerais, 2010.

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

VOIGT, C.L. **Síntese e caracterização espectroscópica de biocombustível de óleo de fritura.** Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2009.

WANNES, W. A. et al. **Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle(*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower.** Food and Chemical Toxicology, v. 48, n.5, p. 1362-1370, 2010. ISSN 0278-6915. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510001511>> Acessado em 25 de Fevereiro de 2015.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In SIMÓES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2007. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 577-607.