



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

DAYANA LACERDA CUSTÓDIO

**APROVEITAMENTO DOS SUBPRODUTOS DA EXTRAÇÃO
DO ÓLEO DO PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* DUCKE) PARA A
OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS.**

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

**MANAUS
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

DAYANA LACERDA CUSTÓDIO

**APROVEITAMENTO DOS SUBPRODUTOS DA EXTRAÇÃO
DO ÓLEO DO PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* DUCKE) PARA A
OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS.**

“Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Biotecnologias para a Área Agroflorestal”, como parte do requisito para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia”.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

**MANAUS
2013**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

C987a Custódio, Dayana Lacerda
Aproveitamento dos subprodutos da extração do óleo do pau-rosa (Aniba rosaeodora Ducke) para a obtenção de bioprodutos / Dayana Lacerda Custódio. - Manaus: UFAM, 2013.
157 f. : il. color.
Tese (Doutora em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas.
Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior.

1. Laurácea 2. Aniba dukei – Subprodutos 3. Essências e óleos essenciais 4. Alcalóides I. Veiga Júnior, Valdir Florêncio da (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (2007): 665.528.267.72(043.3)

DAYANA LACERDA CUSTÓDIO

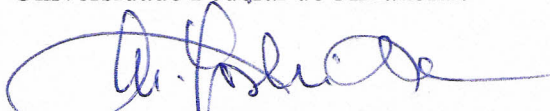
**"APROVEITAMENTO DOS SUBPRODUTOS DA EXTRAÇÃO
DO ÓLEO DO PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* DUCKE) PARA A
OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS."**

“Tese de doutorado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Biotecnologias para a Área Agroflorestal”, como parte do requisito para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia”.

BANCA EXAMINADORA:



Valdir Florêncio da Veiga Junior
Universidade Federal do Amazonas



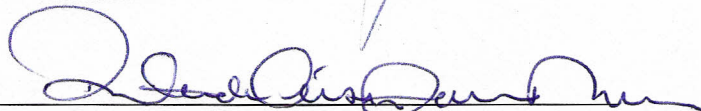
Massayoshi Yoshida
Centro de Biotecnologia da Amazônia



Luiz Antônio de Oliveira
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia



Emerson Silva Lima
Universidade Federal do Amazonas



Rita de Cassia Saraiva Nunomura
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior pela orientação essencial à execução deste trabalho, e, principalmente pelo apoio e amizade.

À Profa. Dra Cláudia Cândida Silva por todo o apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Massayoshi Yoshida, ao Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira, ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima e à Profa. Dra. Rita de Cassia Saraiva Nunomura pela disponibilidade em participar da banca de defesa e contribuições na finalização desta tese.

Ao Sr. Carlos Zanoni Esteves Magaldi, por ter fornecido os subprodutos da extração industrial do óleo essencial de *Aniba rosaeodora* Ducke, que foram os objetos de estudo desta tese.

Ao Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza da Central Analítica Multi Disciplinar da Universidade Federal do Amazonas, pelas análises de espectrometria de massas apresentadas nesta tese.

À Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira e ao pós doutorando Dr. Fábio Alessandro Pieri da Fundação Oswaldo Cruz – Manaus, pelos ensaios de atividade antimicrobiana apresentados nesta tese.

À Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade federal do Ceará pelos ensaios de citotoxicidade apresentados nesta tese.

A todos os professores do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pelos ensinamentos.

À Profa. Dra. Dalva Trevisan Ferreira da Universidade Estadual de Londrina que me apresentou e recomendou ao Prof. Dr. Valdir.

Aos colegas do grupo de pesquisa Química de Moléculas Bioativas da Amazônia que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas que acompanharam essa jornada.

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq, FINEP e FAPEAM pelo financiamento dos projetos do grupo de pesquisa QBiomA.

Aos amigos André Rüdiger, Erika Izumi, Fabiano Vargas e Gisele Torrente, que em muitos momentos foram minha família aqui em Manaus.

Ao Iuri Bezerra de Barros que esteve ao meu lado em todos os momentos desta jornada, sempre com muito apoio, amor e carinho.

À minha mãe Regina Célia Lacerda Custódio, ao meu pai Joventino Antônio Custódio, ao meu irmão Eduardo Lacerda Custódio e à minha irmã Mariana Lacerda Custódio que sempre me apoiaram e incentivaram na realização de meus sonhos.

“O mais sábio e o mais nobre dos
mestres é a própria natureza.”
Leonardo da Vinci

RESUMO

A família Lauraceae destaca-se por apresentar espécies com grande importância econômica, dentre elas *Aniba rosaeodora* Ducke, utilizada na extração de óleo essencial. Seu óleo essencial é formado majoritariamente por linalol, utilizado como fixador na perfumaria. Os subprodutos da extração do pau-rosa são geralmente empregados como fonte de energia para o aquecimento das caldeiras nas próprias usinas. Estes subprodutos contêm substâncias com grande potencial de aproveitamento como bioprodutos. O presente estudo tem como objetivo estudar os subprodutos da extração do óleo essencial de *Aniba rosaeodora* Ducke a fim de possibilitar um maior conhecimento dos metabólitos encontrados nos subprodutos, assim como um melhor aproveitamento da matéria prima utilizada pela indústria. Galhos e folhas de *Aniba rosaeodora* foram coletados na Reserva Ducke. Os subprodutos sólidos e líquidos da extração industrial do óleo essencial de *A. rosaeodora* foram obtidos em parceria com a Magaldi Agro Industrial Ltda. Os galhos coletados foram submetidos a seis metodologias diferentes de extração de alcaloides. Dentre estas, três foram selecionadas devido aos rendimentos obtidos, a qualidade das frações e a praticidade dos métodos. As três metodologias selecionadas foram aplicadas ao subproduto sólido industrial. As frações alcaloídicas obtidas foram analisadas por espectrometria de massas para a comparação dos perfis alcaloídicos. Os subprodutos líquidos foram centrifugados para a obtenção das frações oleosas, as quais foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acopladas a detectores de ionização de chama e espectrômetro de massas. Uma alíquota do hidrolato foi liofilizada e outra foi submetida a experimentos com resinas XAD-4, visando à obtenção de frações concentradas das substâncias orgânicas presentes no hidrolato. Essas amostras foram analisadas por espectrometria de massas de forma similar às frações alcaloídicas obtidas do subproduto sólido industrial. Os perfis químicos obtidos por espectrometria de massas das frações alcaloídicas mostraram picos compatíveis com os alcaloides anibina, duckeina e reticulina, já relatados nesta espécie. Outros picos detectados foram compatíveis com coclaurina, N-metilcoclaurina, boldina e norboldina, que já são relatados em Lauraceae. Dentre os alcaloides detectados, a anibina, reticulina e N-metilcoclaurina foram observados com maior abundância relativa nos espectros de massa. As frações oleosas obtidas dos hidrolatos mostraram constituintes em comum com o óleo essencial, com diferenças nas concentrações dessas substâncias. As frações oleosas apresentaram o linalol como substância majoritária, além do α -terpineol e geraniol. As frações obtidas do hidrolato liofilizado e do experimento com a resina XAD-4 mostraram-se complexas, sugerindo a presença de diversas substâncias. Algumas das frações alcaloídicas obtidas dos subprodutos industriais mostraram-se promissoras em relação a atividade citotóxica. Foi observada também atividade antimicrobiana das frações alcaloídicas obtidas do subproduto industrial e da anibina frente ao *Bacillus subtilis*. Os resultados obtidos mostraram que os subprodutos apresentam os mesmos alcaloides encontrados na espécie *A. rosaeodora*, indicando que a extração industrial do óleo essencial não causa degradação significativa dessas moléculas. Sendo assim os subprodutos da extração do óleo essencial de *A. rosaeodora* podem ser possíveis fontes de novos produtos, promovendo o melhor uso da matéria prima.

Palavras Chaves: Pau-rosa, subprodutos, alcaloides, Lauraceae.

ABSTRACT

The Lauraceae family stands out for its species with great economic importance, among them *Aniba rosaeodora* Ducke, used in the essential oil extraction. Its essential oil is made up mainly of linalool, used as a fixative in perfumery. The byproducts of the rosewood extraction are generally employed as an energy source for heating boilers in their own plants. These byproducts contain substances with high potential for use as biobased. The present work aims to study the byproducts of extraction of *Aniba rosaeodora* Ducke essential oil to enable a better understanding of the metabolites found in the byproducts, as well as better use of raw material by industry. Branches and leaves of *Aniba rosaeodora* were collected in the Reserva Ducke. The solid and liquid byproducts of industrial oil extraction of *A. rosaeodora* were obtained in partnership with Magaldi Agro Industrial Ltda. The collected branches were submitted to six different methods of alkaloids extraction. Among them, three were selected due to the yield obtained, the quality and the practicality of the methods. These three selected methodologies were applied to the industrial solid byproducts. The alkaloidal fractions obtained were analysed by mass spectrometry to compare the alkaloidal profiles. The liquid byproducts were centrifuged to obtain the oily fractions, which were analysed by gas chromatography coupled to flame ionization detector and a mass spectrometer. An aliquote of hydrolate was lyophilized and another aliquote was subjected to experiments with XAD-4 resin, in order to obtain concentrated fractions of organic substances present in hydrolate. These samples were analysed by mass spectrometry in a similar way to alkaloidal fractions obtained from solid byproducts. The chemical alkaloidal profiles obtained by mass spectrometry of alkaloid fractions showed peaks consistent with the alkaloids anibine, duckein and reticuline. Other peaks detected were consistent with coclaurine, N-methylcoclaurine, boldine and norboldine, already reported in Lauraceae. Among the alkaloids detected, the anibine, reticuline and N-methylcoclaurine were observed with higher relative abundance in the mass spectra. The oily fractions obtained from hydrolates showed constituents in common with the essential oil, with differences in the concentrations of these substances. The oily fractions showed linalool as the major substance, besides the α -terpineol and geraniol. The fractions obtained from lyophilized hydrolates and XAD-4 resin experiments showed a complex composition, suggesting the presence of several substances. Some of the alkaloidal fractions obtained from industrial byproducts have shown promise in relation to cytotoxic activity. There was also observed antimicrobial activity of alkaloidal fractions obtained from industrial byproducts and anibine against *Bacillus subtilis*. The results showed that the byproducts present the same alkaloids found in *A. rosaeodora*, indicating that the industrial extraction of the essential oil did not cause significant degradation of these molecules. Thus, the byproducts of extraction of *A. rosaeodora* essential oil can be potential sources of new products, promoting the best use of raw material.

Keywords: Rosewood, by-products, alkaloids, Lauraceae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de um sistema de extração de óleo essencial por arraste a vapor. Fonte: www.oleosessenciais.org/metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais/	22
Figura 2: Classes de alcaloides.....	24
Figura 3: Esqueletos isoquinolínicos básicos de alcaloides presentes na família Lauraceae...25	
Figura 4: Alcaloides isoquinolínicos presentes no gênero <i>Aniba</i>	27
Figura 5: Alcaloides indólicos presentes no gênero <i>Aniba</i>	28
Figura 6: Alcaloides piridínicos presentes no gênero <i>Aniba</i>	28
Figura 7: N-benzoiltiraminas presentes em <i>Aniba riparia</i>	29
Figura 8: Esquema da metodologia 1 utilizada na obtenção de alcaloides.....	37
Figura 9: Esquema da metodologia 2 utilizada na obtenção de alcaloides.....	38
Figura 10: Esquema da metodologia 3 utilizada na obtenção de alcaloides.....	39
Figura 11: Esquema da metodologia 4 utilizada na obtenção de alcaloides.....	40
Figura 12: Esquema da metodologia 5 utilizada na obtenção de alcaloides.....	41
Figura 13: Esquema da metodologia 6 utilizada na obtenção de alcaloides.....	43
Figura 14: Análise em CCD das frações alcaloídicas obtidas do material coletado, empregando as metodologias 1 a 6.....	55
Figura 15: Rendimentos das frações alcaloídicas obtidas nas metodologias 3, 5 e 6 a partir dos galhos grossos coletados (Gg col.), do caule do subproduto industrial (sub. caule) e das folhas do subproduto industrial (sub. folha) respectivamente.....	57
Figura 16: Frações obtidas respectivamente dos galhos grossos coletados (A), do caule do subproduto (B) e da folha do subproduto (C) pela metodologia 3, respectivamente.....	58
Figura 17: Frações obtidas respectivamente dos galhos grossos coletados (A), do caule do subproduto (B) e da folha do subproduto (C) pela metodologia 5, respectivamente.....	59
Figura 18: Frações obtidas respectivamente dos galhos grossos coletados (A), do caule do subproduto (B) e da folha do subproduto (C) pela metodologia 6, respectivamente.....	60
Figura 19: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon em m/z 204 ($[M+H]^+$), relativo à molécula da anibina.....	61
Figura 20: Espectro de RMN de 1H da anibina.....	61
Figura 21: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon m/z 286 ($[M+H]^+$), relativo à molécula da coclaurina.....	63
Figura 22: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon m/z 300 ($[M+H]^+$) 300, relativo à molécula da N-metilcoclaurina.....	64
Figura 23: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon em m/z 314 ($[M+H]^+$), relativo à molécula da norboldina.....	65
Figura 24: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon m/z 328 ($[M+H]^+$), relativo à molécula da boldina.....	66
Figura 25: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon m/z 330 ($[M+H]^+$), relativo à molécula da reticulina.....	67
Figura 26: Espectro de massas obtido do hidrolato liofilizado.....	70

Figura 27: Frações etanólica (A) e em acetona e metanol (B) respectivamente, obtidas da coluna de XAD-4 feita com o hidrolato. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimentos dos extratos etanólicos obtidos do material vegetal coletado na Reserva Ducke.	53
Tabela 2: Rendimentos das frações alcaloídicas obtidas dos galhos grossos coletados a partir das diferentes metodologias de extração testadas.	54
Tabela 3: Fragmentações observadas nas frações alcaloídicas.	56
Tabela 4: Rendimentos obtidos dos caules coletados e dos subprodutos do caule e folhas pelas metodologias 3, 5 e 6 (%).	56
Tabela 5: Deslocamentos (δ) observados para a anibina e comparação com literatura.	62
Tabela 6: Massas exatas obtidas para os possíveis alcaloides detectados nas análises por espectrometria de massas de alta resolução, nas frações obtidas dos galhos grossos pelas metodologias 3 (3), 5 (5) e 6 (6) e pelo subproduto caule pelas metodologias 3 (3c), 5 (5c) e 6 (6c).	67
Tabela 7: Componentes encontrados nas frações oleosas obtidas por centrifugação dos resíduos industriais líquidos (hidrolatos) 1, 2 e 3.	69
Tabela 8: Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais. Valores são média \pm DPM (Desvio Padrão da Média).	73
Tabela 9: Valores de CI_{50} e intervalo de 95% de confiança (IC95%) em $\mu\text{g/mL}$ das substâncias selecionadas em diferentes linhagens celulares no teste do MTT.	74
Tabela 10: Diâmetro dos halos de inibição observados para as amostras avaliadas (1=extrato etanólico dos galhos grossos coletados, 2=extrato etanólico das folhas coletadas, 3=extrato etanólico do subproduto industrial- caule, 4=extrato etanólico do subproduto industrial - folha, 5=5c, 6=5f, 7=3c, 8=6c, 9=6f, 10=fração oleosa do hidrolato 1, 11=fração oleosa do hidrolato 2, 12=fração oleosa do hidrolato 3 e 13= imipenem (10 $\mu\text{g/mL}$)) frente às cepas bacterianas.	76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. ORGANIZAÇÃO METODOLÓGICA DO ESTUDO.....	16
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
4.1. A exploração de subprodutos.....	18
4.2. O gênero <i>Aniba</i>	20
4.3. Alcaloides.....	23
4.3.1. Alcaloides presentes no gênero <i>Aniba</i>	25
4.4. XAD.....	29
4.5. Atividade Cytotóxica.....	31
4.6. Atividade antimicrobiana.....	32
4.7. Espectrometria de massas.....	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1. Obtenção do material vegetal.....	35
5.2. Obtenção do subproduto industrial.....	35
5.3. Preparo de extratos etanólicos.....	35
5.4 Testes de diferentes metodologias para a extração de alcalóides.....	36
5.4.1 Metodologia 1 (MET1).....	36
5.4.2 Metodologia 2 (MET2).....	37
5.4.3 Metodologia 3 (MET3).....	38
5.4.4 Metodologia 4 (MET4).....	39
5.4.5 Metodologia 5 (MET5).....	41
5.4.5.1. Isolamento da anibina.....	42
5.4.6. Metodologia 6 (MET6):.....	42
5.5. Experimentos realizados com o subproduto líquido industrial (hidrolato).....	43
5.5.1 Extração da fração oleosa do subproduto líquido industrial (hidrolatos).....	43
5.5.2. Liofilização do subproduto líquido industrial (hidrolatos).....	44
5.5.3. Coluna de XAD-4 do subproduto líquido industrial (hidrolatos).....	44
5.6. Análises das frações obtidas.....	45
5.6.1. Análise das frações alcaloídicas obtidas.....	45
5.6.2. Análise das frações oleosas obtidas dos hidrolatos.....	46
5.7. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> – varredura inicial e determinação da CI_{50}	47

5.7.1. Células	47
5.7.2. Amostras	47
5.7.3. Método	48
5.7.4. Determinação da CI_{50}	49
5.7.5. Análise dos resultados	49
5.8 Ensaio de atividade antimicrobiana	49
5.8.1. Soluções testadas	49
5.8.2. Micro-organismos teste	50
5.8.3. Procedimento experimental	50
5.8.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	51
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6.1 Extratos etanólicos obtidos do material vegetal coletado e do subproduto industrial....	53
6.2 Frações alcalóidicas obtidas do material vegetal coletado e do subproduto industrial ..	54
6.3. Extrações com o subproduto líquido industrial (hidrolato):.....	68
6.3.1. Frações oleosas obtidas do subproduto líquido industrial (hidrolato).....	68
6.3.2. Subproduto líquido industrial (hidrolato) liofilizado.....	70
6.3.3. Coluna de XAD-4 do subproduto líquido industrial (hidrolato)	70
6.4 Ensaio de atividade biológica	72
6.4.1 Ensaio de citotoxicidade:	72
6.4.2 Atividade antimicrobiana	74
7. Conclusões.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXO 1	90
ANEXO 2	92
ANEXO 3	144

1. INTRODUÇÃO

Aniba rosaeodora Ducke (Lauraceae) é uma espécie arbórea de grande importância econômica por apresentar um óleo essencial rico em linalol, utilizado na perfumaria fina como fixador em perfumes como o Channel No. 5. A extração desse óleo essencial teve início em 1927, no Pará, onde a espécie chegou à beira da extinção, sendo comercializados cerca de 300t/ ano, na década de 1960. Na década de 1970, o consumo caiu para 18 toneladas por ano, com a entrada no mercado do linalol sintético. No entanto, devido à dificuldade de se encontrar árvores de pau-rosa, a exportação tem diminuído, sendo 13 toneladas de óleo essencial exportados em 2007 com valor de US\$ 108,00/Kg e atualmente o valor encontra-se em torno de US\$150,00/ Kg. Esta exploração, despreocupada com a preservação da espécie, tem se mostrado uma atividade não sustentável, devido ao abatimento das árvores inteiras para a extração do óleo (Santos, 2011). Com a elaboração da Instrução Normativa IBAMA, 2011, foram estabelecidos novos procedimentos e regras buscando disciplinar a exploração de pau-rosa, seu manejo sustentável, o plantio e os parâmetros técnicos de reposição da matéria prima, além de incentivar a aplicação de técnicas que possibilitem a rebrota de árvores adultas, como o corte de galhos e folhas (Ibama, 2011). Estudos químicos das folhas e galhos finos de *A. rosaeodora* mostraram que essas partes da planta também apresentam linalol, mostrando-se uma alternativa de extração que possibilita a preservação da árvore (D'acampora Zellner *et al.*, 2006).

O Estado do Amazonas é o principal exportador e produtor mundial deste óleo essencial, sendo que atualmente, a principal usina extratora está localizada em Maués. As empresas produtoras devem possuir atestados e certificados de produção “verde”, “sustentável”, “orgânica” e “ecologicamente correta”. Para isto, devem cumprir itens da legislação como a obrigatoriedade de definir a destinação dos resíduos dos processos, necessários desde a entrada da espécie na lista da CITES.

O processo de extração do óleo essencial de pau-rosa ocorre por arraste a vapor, em um sistema com dois compartimentos interligados. Em um dos compartimentos é colocada água, que é aquecida por caldeiras. No segundo compartimento é colocado o material vegetal, neste caso, madeira de pau-rosa triturada em cavacos. Esses dois compartimentos são interligados e então ocorre a passagem de vapor de água através do material vegetal, arrastando gotículas de óleo essencial. Em seguida, a mistura de vapor de água e óleo

essencial resfriada é coletada em um decantador e então, óleo essencial e água separam-se por diferença de densidade, sendo o óleo essencial coletado e armazenado para comercialização. Ao final do processo de extração são gerados subprodutos sólidos (cavacos extraídos) e líquidos (hidrolatos). Segundo o diretor atual da principal usina extratora do estado do Amazonas, o Sr. Carlos Magaldi, em média, a partir de uma tonelada de cavacos, são gerados 18 a 20 quilos de óleo essencial, uma tonelada de subproduto sólido e 1800 a 2000 litros de hidrolatos.

Atualmente, os subprodutos sólidos são utilizados na alimentação das caldeiras das usinas de extração. Para os subprodutos líquidos, conhecidos como hidrolatos, que ainda são muito aromáticos, o destino não é conhecido, nem revelado. Acredita-se que sejam despejados nos igarapés, onde provocariam a morte dos peixes e grande impacto ao meio ambiente. Estes resíduos possuem propriedades antimicrobianas e substâncias já isoladas desta espécie, estruturas com diversos similares bioativos, como lignanas, flavonoides e alcaloides. Sua extração seletiva dos resíduos poderá levar não somente a uma destinação ecologicamente correta dos rejeitos desta indústria, mas à obtenção de um bioproduto de alto valor agregado.

Diante disso, o presente trabalho se justifica não somente pela necessidade de estudos de utilização destes subprodutos, para valorá-los e dar a eles uma destinação adequada, mas principalmente para incentivar o empreendedorismo para a produção de novos bioprodutos, assim como para possibilitar a certificação “verde” para um importante segmento das indústrias do Amazonas. No presente trabalho foi realizado um estudo sobre a composição química dos subprodutos industriais líquidos e sólidos em comparação com o material vegetal coletado da mesma espécie na Reserva Ducke, desenvolvendo metodologias fitoquímicas para gerar frações bioativas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Descrever a composição química e as atividades biológicas de subprodutos líquidos (hidrolatos) e sólidos da extração de óleo essencial de *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae) visando a geração de bioprodutos de maior valor agregado.

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção de frações ricas em alcaloides nos subprodutos industriais sólidos e sua detecção sem isolamento;
- Estudo da composição química do hidrolato oriundo da extração industrial do óleo essencial;
- Realização de bioensaios de citotoxicidade frente a microrganismos e linhagens de células tumorais.

3. ORGANIZAÇÃO METODOLÓGICA DO ESTUDO

A grande evolução das técnicas analíticas nos últimos anos permitiu o desenvolvimento de metodologias para a descrição da composição de misturas complexas que dispensam o imenso trabalho de fracionamento e purificação realizado até a década de 90 do século passado, sendo esse atualmente restrito a casos específicos como o isolamento de padrões e substâncias inéditas, cada vez menos comuns. Para tanto, é necessário dispor de amplos bancos de dados e excelentes levantamentos bibliográficos, a partir dos quais se detecta os constituintes por comparação de seus espectros. Sem querer reinventar a roda, utilizamos inicialmente uma abordagem descritiva do objeto de estudo que permitisse a organização da imensa quantidade de literatura disponível sobre a extração de alcaloides, os alcaloides presentes na família Lauraceae e a diferenciação entre óleos, resinas e bálsamos. O presente trabalho apoia-se em três pontos:

- A obtenção de frações ricas em alcaloides nos subprodutos sólidos e sua detecção sem isolamento;
- O estudo do aproveitamento dos óleos essenciais nos hidrolatos;
- Bioensaios de citotoxicidade a microrganismos e a linhagens de células tumorais.

Assim, a revisão bibliográfica foi dividida em cinco partes:

1. As diferenças conceituais entre óleos, bálsamos e resinas;
2. A revisão completa de todos os alcaloides já descritos na família Lauraceae;
3. A avaliação das diferentes metodologias utilizadas para a obtenção de frações ou extratos alcaloídicos;
4. Uma breve apresentação sobre o uso de subprodutos oriundos da extração de materiais vegetais diversos;
5. Uma pequena apresentação dos bioensaios e técnicas utilizadas com exemplos recentes da literatura.

Dessas cinco partes, apenas um resumo da segunda (com foco no gênero *Aniba*), a quarta e a quinta serão apresentadas no capítulo 4 do texto (revisão bibliográfica).

A parte 1 foi publicada na Revista Brasileira de Farmacognosia, artigo incluído como anexo 1.

A parte 2 foi submetida para publicação à revista Natural Product Reports e é apresentada no anexo 2 e a parte 3 (anexo 3) também será submetida a essa revista.

Foram realizadas também análises de nanocompostos e a utilização de membranas para purificar o hidrolato, que não serão apresentadas, pois seguem em desenvolvimento com empresas do Rio de Janeiro e Brasília e serão oportunamente publicadas após os depósitos das patentes.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. A exploração de subprodutos

O aproveitamento de subprodutos do extrativismo vegetal tem sido aplicado com frequência cada vez maior, buscando extratos e/ou substâncias de alto valor agregado. Na exploração da biodiversidade para a obtenção de óleos, insumos e extratos, diversas iniciativas de sucesso são empregadas buscando a valorização do material já extraído para a obtenção de materiais com potencial econômico.

Os cultivos de laranja, uva e cana estão entre os de maior destaque no Brasil e também geram subprodutos. Na extração do suco de laranja são obtidos o óleo essencial e o *D*-Limoneno a partir da centrifugação do resíduo líquido (Yamanaka, 2005). Recentemente, Zhang *et al.* (2013) obtiveram o flavonoide nobelitina a partir de subprodutos da extração de laranja. Um estudo realizado com a água amarela resultante da extração da laranja mostrou a possibilidade do uso deste como meio de cultivo de *Penicilium citrinum*, levando à produção da enzima ribonuclease e também à redução de matéria orgânica neste resíduo (Tavares *et al.*, 1998). O uso de resíduos da extração de cítricos, como a laranja, na suplementação da alimentação de bovinos, levou à variação de populações bacterianas de *Escherichia coli* no trato digestivo, diminuindo a produção de algumas toxinas pelas mesmas (Duoss-Jennings *et al.*, 2013).

Na produção de vinhos e sucos a partir da uva (*Vitis vinifera*), as cascas e sementes consideradas, inicialmente, um resíduo, têm sido transformados em extratos e utilizados nas indústrias alimentícia, fitoterápica e cosmética devido à presença de compostos fenólicos como o resveratrol (Shrikhande, 2000; Torres e Bobet, 2001; Cataneo *et al.*, 2008). Soares *et al.* (2008) detectaram compostos fenólicos com atividade antioxidante nas cascas de uvas Niágara e Isabel, duas das variedades com maior produção no Brasil. Torres e Bobet (2001) obtiveram frações de derivados flavanóis a partir de subprodutos de uva, os quais mostraram atividade antioxidante.

A cana-de-açúcar, com produção elevada no Brasil, também gera grandes quantidades de subprodutos que podem ser aproveitados. Estudos realizados com melaço oriundo da produção de açúcar a partir da cana e da beterraba mostraram atividade antioxidante e um

efeito protetor sobre células humanas (HepG2) quando submetidas a estresse oxidativo (Valli *et al.*, 2012). No mesmo estudo, os autores sugerem o uso desses melaços como opções nutritivas e de baixo preço. Recentemente, Bian *et al.* (2013) obtiveram xilooligossacarídeos a partir do bagaço de cana e observaram para essas substâncias, atividade antioxidante dependente da concentração, sugerindo seu emprego em preparações alimentares. A partir do bagaço de cana e de subprodutos de arroz e do trigo, foi produzido etanol utilizando sistemas de fermentação com *Sacharomyces cerevisiae* e sistemas enzimáticos produzidos por *Aspergillus niger* (Rocha *et al.*, 2013).

A palha de trigo também foi utilizada na obtenção de glicose em um sistema conjunto com o fungo *Irpex lacteus* (Salvachua *et al.*, 2013). Vasconcelos *et al.* (2013) observaram em estudos com germem de trigo e farelo de milho, subprodutos derivados da indústria de panificação, que estes são possíveis fontes de compostos bioativos e amido.

Em outro exemplo partes florais que resultam do processamento das sementes do girassol mostraram-se fontes ricas em fibras, ferro e substâncias fenólicas (Liang *et al.*, 2013). O estudo de extratos fenólicos obtidos da pele de amêndoas levou à identificação de flavonoides como a nandigerina e a epicatequina, além do potencial antimicrobiano das frações fenólicas (Mandalari *et al.*, 2010). O solanesol, um precursor de quinonas, foi recuperado de frações pobres em alcaloides de tabaco (*Nicotiana tabacum*), com porcentagem de 30% do total de solanesol presente em folhas frescas de tabaco (Machado *et al.*, 2010).

Subprodutos oriundos da hidrodestilação de óleos essenciais também têm sido aproveitados na obtenção de novos produtos. Estudos com resíduos da obtenção do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) reportaram a presença de antioxidantes (Navarrete *et al.*, 2011), bem como seu emprego no enriquecimento da alimentação de ovelhas (Nieto Martínez, 2013) e cabras (Jordan *et al.*, 2010). A artemisinina, conhecido antimalárico, foi obtida a partir dos resíduos da extração de óleo essencial de *Artemisia annua* (Ferreira, Zheljazkov e Gonzalez, 2013). O estudo dos hidrolatos e materiais vegetais resultantes da extração do óleo essencial de *Laurus nobilis*, mostrou a presença de álcoois terpênicos e fenóis nos hidrolatos, enquanto o material vegetal extraído mostrou-se rico em fibras, possibilitando seu uso na alimentação de ruminantes (Di Leo Lira *et al.*, 2009).

Os exemplos de aproveitamento de subprodutos citados anteriormente ilustram um enorme leque de estudos que vem sendo realizados para aproveitar melhor as matérias primas, buscando além da geração de novos produtos o melhor uso dos recursos ambientais.

4.2. O gênero *Aniba*

A família Lauraceae apresenta 67 gêneros com mais de 2500 espécies descritas, sendo encontrados no Brasil 25 gêneros e aproximadamente 400 espécies, distribuídas principalmente na Mata Atlântica e na Floresta Amazônica (Souza e Lorenzi, 2005; The Plant List. Version 1., 2010). Com relação à importância econômica, destacam-se na indústria madeireira espécies como *Ocotea porosa* (imbuia) e *Ocotea odorifera* (sassafras). Na indústria alimentícia são utilizadas como condimentos: *Laurus nobilis* (louro), *Dicypellium caryophyllaceum* (canela falsa) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela); e, como alimento, a *Persea americana* (abacate). Além disso, produtos naturais obtidos de algumas espécies apresentam alto valor agregado no mercado internacional, como o óleo essencial de *Aniba rosaeodora*, sendo utilizado na perfumaria como um excelente fixador (Marques, 2001; Zanin e Lordello, 2007).

O gênero *Aniba* Aubl. apresenta 48 espécies descritas, dentre as quais algumas se destacam economicamente devido a presença de óleo essencial, encontrado em grande quantidade principalmente no lenho e na casca (Marques, 2001; The Plant List. Version 1., 2010). A espécie *Aniba rosaeodora* Ducke está presente em vários países como Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Peru, Colômbia e Equador. No Brasil, ocorre desde o Amapá e estende-se pelos Estados do Pará e do Amazonas. Os frutos são muito apreciados por pássaros, os quais atuam possivelmente como dispersores das sementes (Ohashi e Rosa, 2004). O óleo essencial de *Aniba rosaeodora* (pau-rosa) é utilizado na medicina caseira para amenizar a dor de dentes, acnes, resfriados, tosse, dermatites e cuidados com a pele, febres, dor de cabeça, infecções diversas e ferimentos, tensão nervosa e náusea (Lorenzi e Matos, 2008).

O óleo essencial do pau-rosa tem sido utilizado à décadas na perfumaria, devido a presença do linalol como constituinte majoritário (70-90%), que é um excelente fixador, e seus ésteres, como o acetato de linalila (Sampaio, Ferraz e Camargo, 2003). Além do linalol, outras substâncias tem sido observadas nos óleos essenciais de caules e folhas de *Aniba rosaeodora*, entre elas o α -terpineol (1,48% a 5,60%), o geraniol (0,19% a 1,8%) e o benzoato de benzila (0,11% a 3,7%) (D'acampora Zellner *et al.*, 2006; Maia *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2012). Na literatura são relatados geralmente 20 a 40 substâncias presentes no óleo essencial para os óleos essenciais de *A. rosaeodora*, entretanto, recentemente Fidelis *et al.* (2013)

identificaram 94 substâncias nos óleos essenciais das folhas e galhos através da cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente, um número significativamente maior que o observado nas mesmas amostras quando analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massas, 31 substâncias.

Extratos metanólicos de galhos e tronco de *A. rosaeodora* mostraram letalidade significativa frente à larvas de *Artemia franciscana* (CL_{50} 58 ± 33 e 71 ± 31 mg mL⁻¹, respectivamente). Os hidrolatos (diluídos a 25%) e óleo volátil (2,0 mg mL⁻¹) levaram a 100% de mortalidade das larvas. O óleo essencial dos galhos demonstrou atividade larvicida *in vitro* contra *Aedes aegypti* (vetor da dengue hemorrágica), apresentando CL_{50} 2,2 mg mL⁻¹ (Souza *et al.*, 2007). Almeida *et al.* (2009) observaram efeito sedativo do óleo essencial do caule de *A. rosaeodora* em camundongos. Recentemente, foi observada para o linalol atividade inibitória frente à enzima adenilato ciclase (Sampaio *et al.*, 2012), e atividade antiviral com inibição de 90% no crescimento do metapneumovírus aviário (aMPV) com concentração de 2,5 µg mL⁻¹ (Kohn *et al.*, 2012).

O óleo essencial de *Aniba rosaeodora* é extraído industrialmente por arraste a vapor, utilizando um sistema com dois compartimentos interligados, sendo o primeiro um reservatório de água, que é aquecida por caldeiras, e o segundo onde é colocado o material vegetal, neste caso, madeira de pau-rosa triturada em cavacos (Figura 1). Neste sistema ocorre a passagem de vapor de água através do material vegetal, arrastando gotículas de óleo essencial. A mistura de vapor de água e óleo essencial é coletada em um decantador e então o óleo essencial e água separam-se por diferença de densidade, sendo o óleo essencial coletado e armazenado para comercialização. O processo de obtenção do óleo essencial de *A. rosaeodora* gera quantidade significativa de resíduos líquidos (hidrolatos) e sólidos (cavacos extraídos).

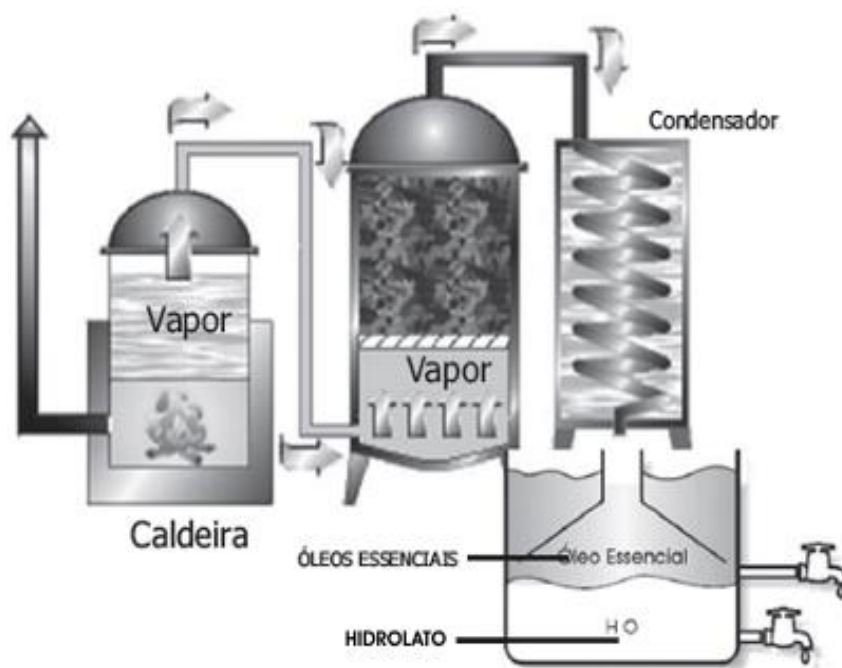


Figura 1: Representação de um sistema de extração de óleo essencial por arraste a vapor. Fonte: www.oleosessenciais.org/metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais/

Em vista da exploração predatória que ocorreu e da forma de extração, corte raso, que ainda ocorre na extração do óleo, estudos vem sendo realizados usando o extrativismo sustentável da espécie. Em estudos sobre a rebrota da espécie foi observada boa capacidade de rebrota da copa após sucessivas podas, possibilitando o manejo da biomassa das árvores através de podas (Sampaio *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007). D'Acampora Zellner *et al.* (2006) observaram a presença de linalol nas folhas de *A. rosaeodora*, tornando-as um substituinte potencial da madeira na extração do óleo essencial, uma fonte alternativa sustentável e natural de linalol. O uso de um sistema de podas e a extração de folhas e galhos é uma alternativa ao corte de árvores, mas ao fim da extração do óleo essencial ainda sobram o hidrolatos e o material vegetal extraído, que podem representar novas fontes de riqueza.

Como o gênero *Aniba* é reportado na literatura pela presença de outras substâncias além de óleos essenciais, destacando os alcaloides benzilisoquinolínicos e piridínicos, observados em *A. canellila* (Oger *et al.*, 1992; Oger *et al.*, 1993), *A. muca* (Bravo *et al.*, 1996), *A. fragrans* (Mors, Magalhães e Gottlieb, 1960), *Aniba gigantifolia* (Franca, Gottlieb e Suarez, 1973) e também em *A. rosaeodora* (Mors, Gottlieb e Djerassi, 1957; Ferreira, Gottlieb e Roque, 1980), o material vegetal resultante da extração do óleo essencial pode ser explorado na busca de extratos de alto valor agregado.

4.3. Alcaloides

Os alcaloides são substâncias orgânicas nitrogenadas, geralmente de caráter básico, encontradas principalmente em plantas, sendo também presentes em alguns microrganismos e animais, com mais de 27.000 estruturas diferentes caracterizadas, das quais 21.000 são encontradas em plantas (Dewick, 2009). Podem apresentar um ou mais átomos de nitrogênio, geralmente como aminas primárias, secundárias e terciárias, o que explica sua basicidade, facilitando seu isolamento e purificação pela formação de sais solúveis em água na presença de ácidos minerais. Entretanto, o grau de basicidade varia conforme a estrutura do alcaloide, e a presença e localização de outros grupos funcionais na molécula. Estruturas contendo aminas quaternárias também são encontradas na natureza. O átomo de nitrogênio presente na estrutura do alcaloide é obtido para a sua biossíntese a partir de aminoácidos envolvidos no metabolismo primário, tais como ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico e histidina (Harbone, 1998; Cseke *et al.*, 2006; Dewick, 2009).

Os alcaloides que apresentam um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcaloides verdadeiros e são classificados conforme o sistema anelar presente na molécula em várias classes como pirrolidínico, piperidínico, quinolínico, isoquinolínico, indólico, entre outras (Figura 2). As substâncias com o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico são designadas como protoalcalóides. Substâncias nitrogenadas com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcaloides (Bruneton, 1991; Dewick, 2009).

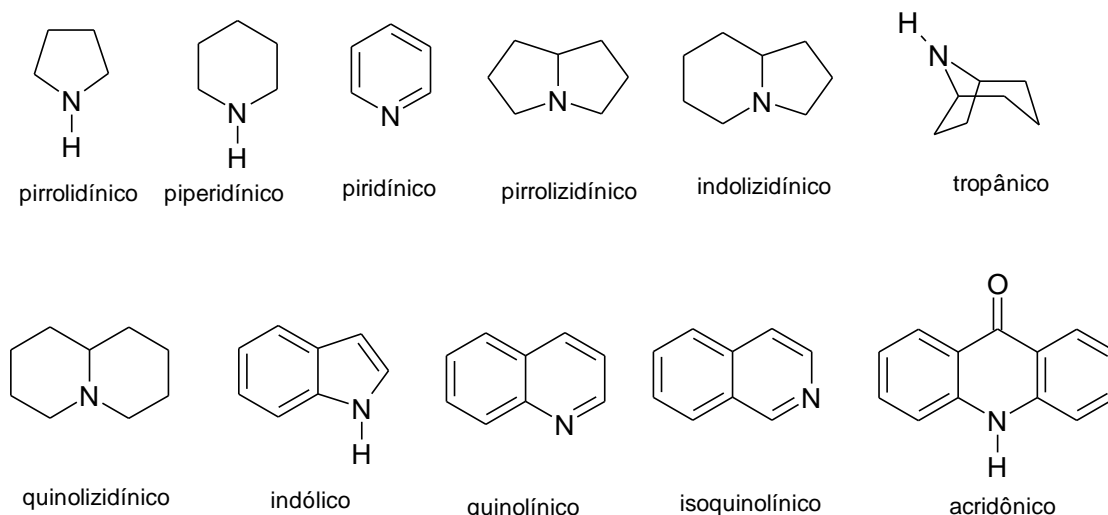


Figura 2: Classes de alcaloides.

Nas plantas, os alcaloides podem ser encontrados em todos os órgãos, geralmente em tecidos com crescimento ativo, como as células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e laticíferos (fazendo parte da composição de látex). Em relação à sua localização intracelular, os alcaloides são sintetizados no retículo endoplasmático, acumulando-se nos vacúolos. São conhecidos alcaloides presentes em várias partes das plantas, nas folhas, como a cocaína (Bieri *et al.*, 2006); no látex de bulbos, como a morfina (Brekke *et al.*, 1958); e em sementes, como a cafeína (De Maria e Moreira, 2007), por exemplo. O local de armazenamento dos alcaloides frequentemente é diferente daquele onde é sintetizado, como a nicotina, produzida nas raízes das plantas de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), e translocada para as folhas, onde é armazenada (Henriques, Kerber e Moreno, 1999).

Os alcaloides apresentam uma função de defesa nas plantas contra a invasão de microrganismos e herbívoros, provavelmente devido sua toxicidade ou ao seu sabor amargo (Adler, Karban e Strauss, 2001; Cornell e Hawkins, 2003). Outras funções têm sido sugeridas a essa classe de compostos, tais como, produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pela planta no metabolismo primário, reserva de nitrogênio, inibidores da germinação (devido seu poder quelante e citotóxico); auxílio na manutenção do equilíbrio iônico (devido ao seu caráter alcalino); e proteção contra irradiação ultravioleta, devido ao fato de, em sua maior parte, serem compostos com núcleos aromáticos altamente absorventes dessa radiação (Fattorusso e Tagliatalata-Scafati, 2008).

4.3.1. Alcaloides presentes no gênero *Aniba*

Além de óleos essenciais, muitas neolignanas e alcaloides são descritas em Lauraceae, substâncias muito usadas no desenvolvimento de novas drogas. Entre as principais classes de alcaloides relatadas na família estão os isoquinolínicos, sendo os principais esqueletos os aporfínicos e benzilisoquinolínicos, além de estruturas piridínicas e indólicas (Apers, Vlietinck e Pieters, 2003; Gottlieb, 1972; Henriques, Kerber e Moreno, 1999).

Os alcaloides isoquinolínicos são formados a partir do aminoácido tirosina por meio de reações consecutivas, formando o núcleo tetrahydroisoquinolínico. Os alcaloides isoquinolínicos são bastante importantes e várias atividades farmacológicas tem sido descritas para esqueletos aporfínicos, benziltetrahydroisoquinolínicos e pavínicos. Os alcaloides indólicos são estruturas benzopirrólícas, onde o núcleo indólico é formado pela fusão dos anéis benzeno e pirrol nas posições 2 e 3. Quando esta fusão ocorre nas posições 3 e 4 do anel pirrol ocorre a formação do núcleo isoindólico. A numeração da estrutura começa no átomo próximo da junção no anel pirrólico, seguindo pelos demais átomos em torno do núcleo indólico. Os alcaloides piridínicos apresentam um anel piridínico que é originado do ácido nicotínico (Figura 3) (Houlihan, 1972; Dewick, 2009).

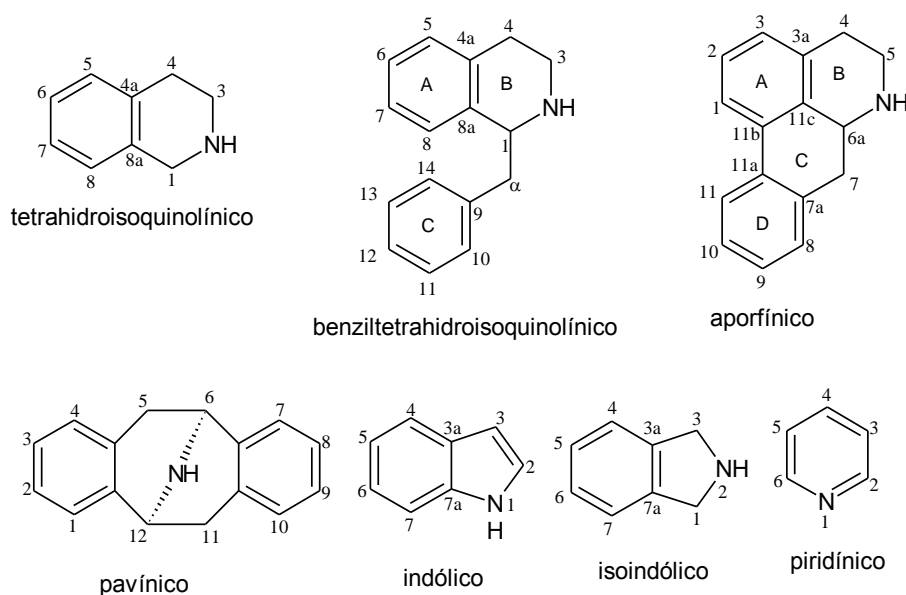


Figura 3: Esqueletos isoquinolínicos básicos de alcaloides presentes na família Lauraceae.

Os alcaloides isoquinolínicos representam a maioria dos alcaloides descritos na família Lauraceae, sendo realatados em vários gêneros de Lauraceae, desde os amplamente estudados como *Ocotea* e *Cryptocarya*, até os pouco estudados como *Dehaasia*. Alguns alcaloides destacam-se por terem sido identificados em várias espécies de Lauraceae como actinodafinina, dicentrina, isoboldina, laurólitsina (norboldina), boldina, laurotetanina, N-metillaurotetanina, reticulina e isocoridina.

No gênero *Aniba*, são encontrados alcaloides isoquinolínicos, piridínicos, indólicos e derivados triptamínicos, distribuídos em diferentes espécies. Em *Aniba canellila* é relatada a presença da (R)-(+)-noranicanina, um alcaloide benzilisoquinolínico trioxigenado isolado da casca do caule dessa espécie (Oger *et al.*, 1992). Para *A. canellila* também foram relatados outros onze alcalóides benziltetrahydroisoquinolínicos (Figura 4), sendo quatro monosubstituídos no anel C com uma hidroxila em C-11, (-)-norcanelillina, (+)-canelillina, anicanina e canelillinoxina; dois monosubstituídos em C-9 no anel D, (-) - anibacarina e (+)-manibacarina; dois monosubstituídos em C-11 no anel D (-)-pseudoanibacarina e (+)-pseudoanibacarina; e três alcalóides com o mesmo padrão de substituição nos anéis A e B com uma metila nas posições 8α e 8β , (-)- α -8-metilpseudoanibacarina, (-)- β -8-metilpseudoanibacarina e (-)- α -8-metilanibacarina (Oger *et al.*, 1993).

Ainda neste gênero foram isolados isoboldina, reticulina e a N-metilcoclaurina na casca do caule de *Aniba muca* (Figura 4) (Bravo *et al.*, 1996). Estudos neurofarmacológicos feitos com a reticulina em camundongos mostraram mudanças no padrão de sono, na coordenação motora e nas respostas condicionadas nestes animais, sugerindo que este alcaloide apresenta um potente efeito depressor do sistema nervoso central (Morais, Barbosa-Filho e Almeida, 1998). Foi observado também um efeito hipotensor da pressão sanguínea em ratos para este alcaloide (Dias *et al.*, 2004).

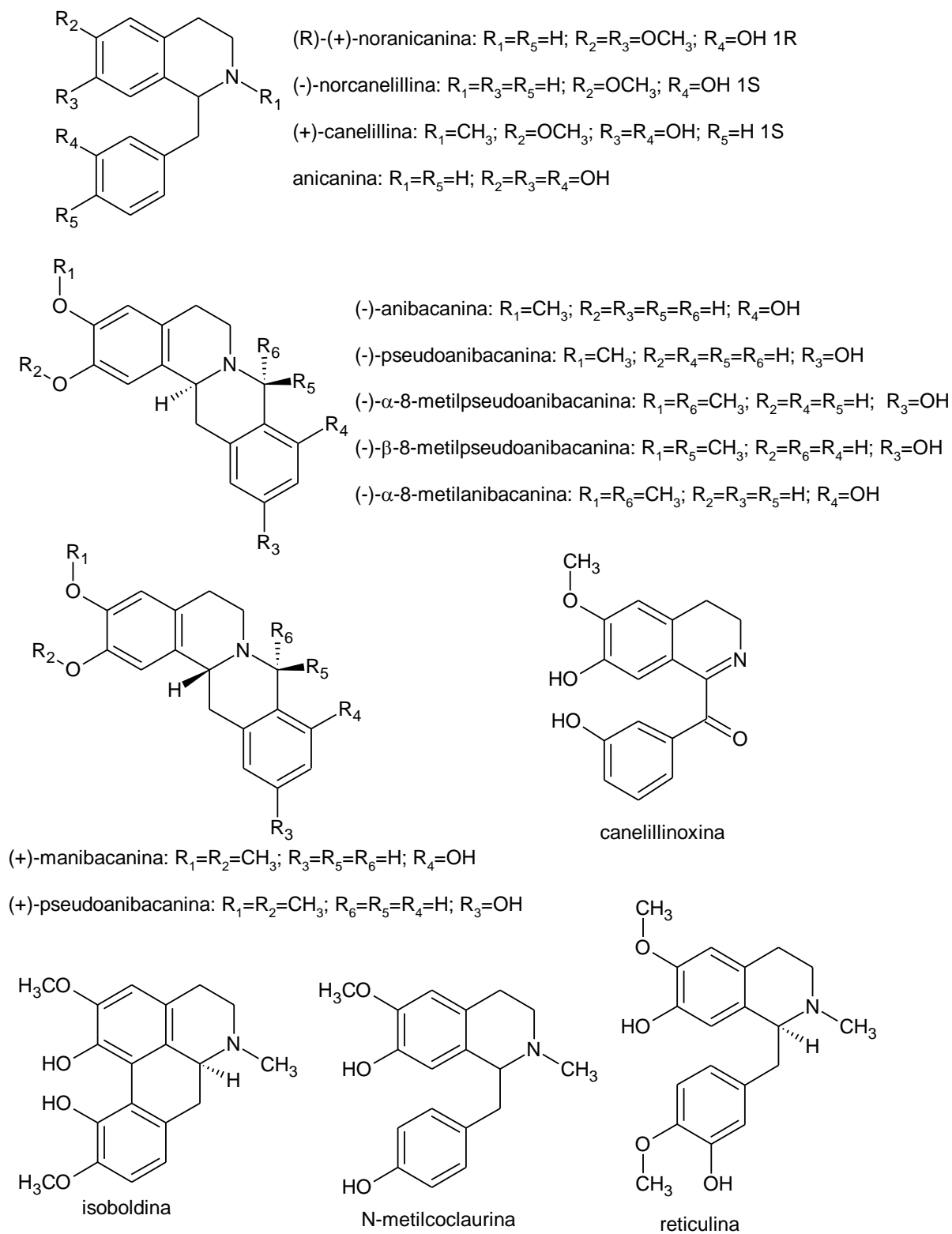


Figura 4: Alcaloides isoquinolínicos presentes no gênero *Aniba*.

A anibamina, elucidada como 6,8-dideca-(1*Z*)-eni-5,7-dimetil-2,3-dihidro-1*H*-indolizidínico, foi obtida como sal do ácido trifluoroacético, de *Aniba panurensis* (Klausmeyer *et al.*, 2004); e de outra *Aniba* sp a partir do caule (Jayasuriya *et al.*, 2004). A cecilina, um alcalóide β-carbolínico também foi obtido do tronco de *Aniba santalodora* (Figura 5) (Aguiar *et al.*, 1980).

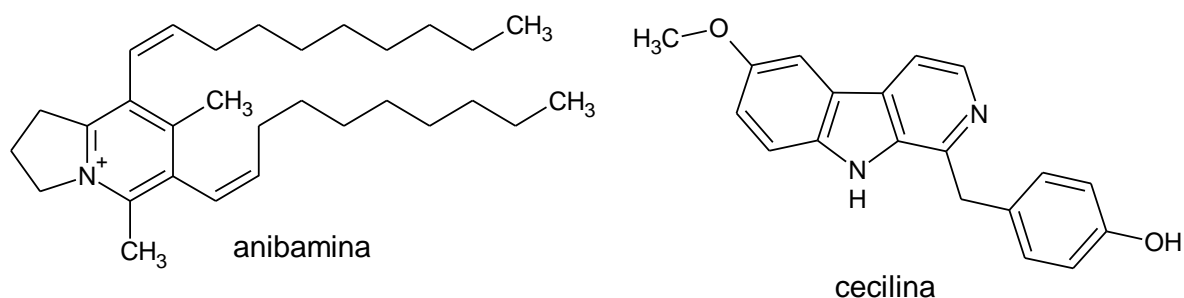


Figura 5: Alcaloides indólicos presentes no gênero *Aniba*.

Entre as estruturas piridínicas são reportados em *Aniba rosaeodora* dois alcaloides terciários, anibina (Mors, Gottlieb e Djerassi, 1957) e duckeina (De Barros Corrêa e Gottlieb, 1975), ambos obtidos do caule. A anibina foi observada também no caule de *Aniba fragrans* (Mors, Magalhães e Gottlieb, 1960) e em *Aniba gigantifolia* (Franca, Gottlieb e Suarez, 1973), sendo relatado para este alcaloide atividade analéptica (Goncalves, Correa Fo e Gottlieb, 1958) (Figura 6). Na extração da anibina e da duckeina foi utilizado o ácido clorídrico, sendo o extrato orgânico obtido em benzeno.

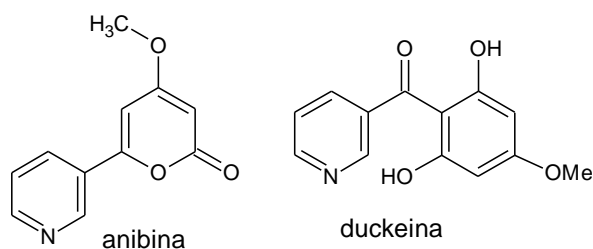


Figura 6: Alcaloides piridínicos presentes no gênero *Aniba*.

Em *Aniba riparia* foram isoladas as N-benzoiltiraminas riparina I, riparina II e riparina III (Figura 7) (M. Barbosa-Filho *et al.*, 1987). São relatadas atividades antimicrobiana para ambas (Catão *et al.*, 2005), antinociceptiva para a riparina I (Araujo *et al.*, 2009), ansiolítica para as riparinas II e III, e antidepressiva para a riparina III (Sousa *et al.*, 2004; De Melo *et al.*, 2006; De Sousa *et al.*, 2007).

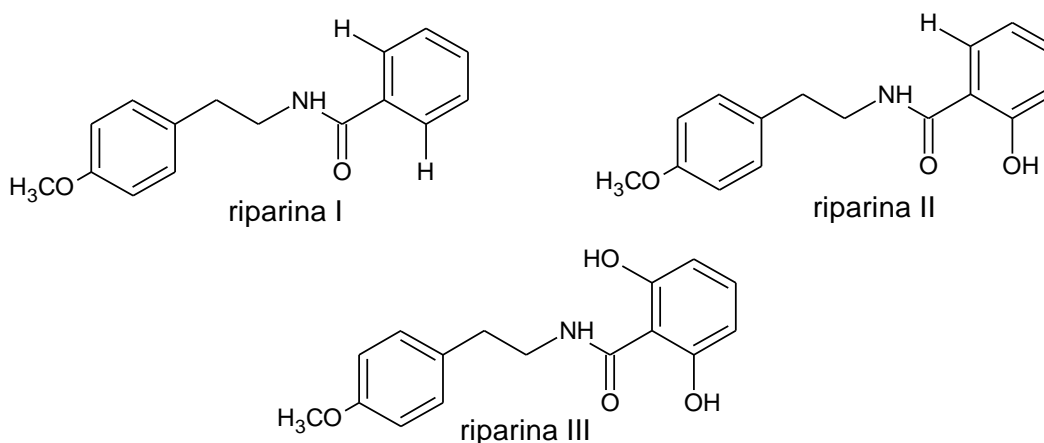


Figura 7: N-benzoiltiraminas presentes em *Aniba riparia*.

Além desses alcaloides presentes no gênero *Aniba*, diversos outros são reportados em Lauraceae, somando mais de 300 estruturas descritas nesta família. Uma revisão ampla sobre os alcaloides presentes em Lauraceae é apresentada no anexo 2.

4.4. XAD

O XAD é uma resina adsorvente resultante da polimerização de estireno e divinilbenzeno, apresentando características apolares ou de baixa polaridade. Quando associado a solventes polares, esse adsorvente apresenta comportamento hidrofóbico e adsorve solutos apolares. Já em solventes apolares, exibe propriedades ligeiramente polares ou hidrofílicas, devido à presença dos grupos fenil, sendo capaz de adsorver espécies com algum grau de polaridade. Esse adsorvente tem sido empregado no estudo de produtos

naturais de diferentes classes relatados na literatura. Há vários tipos de resinas XAD disponíveis no mercado, como a XAD-4, XAD-7 e XAD-16, entre outras, as quais apresentam variações na área de superfície, no tamanho da partícula, na porosidade e no envelope dos poros, possibilitando assim seu uso na obtenção de substâncias de classes diferentes. As resinas poliméricas XAD apresentam vantagens na utilização em larga escala, como o baixo custo, a capacidade de reutilização e a sua versatilidade, pois podem ser empregadas na obtenção de substâncias de diferentes classes (Collins, Braga e Bonato, 2006).

O uso de XAD-2 é relatado no isolamento do alcaloide higenamina a partir de extratos em metanol/água dos galhos de *Annona squamosa* (Leboeuf *et al.*, 1981), e também da ajmalicina, a partir de culturas celulares de *Catharanthus roseus* (Lee-Parsons e Shuler, 2002). Outros estudos empregando XAD na extração de alcaloides a partir de culturas celulares vegetais mostram a obtenção de alcaloides benzofenatridínicos, entre eles a sanguinarina, de *Eschscholtzia californica* (Klvana, Legros e Jolicoeur, 2005; De Dobbeleer *et al.*, 2006). Britton e colaboradores (2001) obtiveram os alcaloides granulatimida e a 6-bromogranulatimida a partir da ascídia *Didemnum granulatum*. Recentemente, o XAD foi empregado também na obtenção de frações enriquecidas em alcaloides dos frutos de *Areca catechu* (Ding *et al.*, 2012).

Compostos fenólicos também tem sido bastante estudados empregando-se XAD na sua purificação. A partir do estudo de subprodutos de couve-flor foram obtidas frações fenólicas com atividade antioxidante significativa, empregando XAD-2 (Llorach *et al.*, 2003). Flavonoides das flores azuis de *Nymphaea caerulea* (Fossen *et al.*, 1999) e das flores de dois cultivares de *Crocus chrysanthus-biflorus* (Nørbæk, Nielsen e Kondo, 1999) também foram isolados utilizando esta fase estacionária. Frações ricas em flavonoides foram obtidas de *Inga edulis* utilizando coluna de XAD-7 em sua purificação recentemente (Silva *et al.* 2012).

Recentemente, antocianinas foram obtidas empregando-se XAD das espécies *Brassica oleraceae* L. var. *capitata* L. f. *rubra*, conhecida como repolho-vermelho (Wiczowski, Szawara-Nowak e Topolska, 2013); de *Vitis rotundifolia*, uma variedade de uva (Sandhu e Gu, 2013); e de *Camellia sinensis* var. *kitamura*, os quais apresentaram elevada atividade antioxidante (Jiang *et al.*, 2013).

Outros exemplos do uso de XAD na purificação de substâncias são as hidrazinas geralcinas C-E obtidas de *Streptomyces* sp. LMA-545 (Le Goff *et al.*, 2013) e de cefalosporinas a partir de culturas de *Streptomyces clavuligerus* (De Oliveira e Barboza, 2012).

4.5. Atividade Citotóxica

O câncer está entre as maiores causas de mortalidade humana, ocupando segundo lugar no *ranking* mundial, e vem sendo bastante estudado em busca de tratamentos capazes de retardar o desenvolvimento das células cancerosas, ou mesmo descobrir a cura desta doença (Guerra, Gallo e Medonça, 2005). A doença ocorre quando uma célula tem seu ciclo de vida alterado em relação às demais células do mesmo tecido. Essas células tem um ciclo de vida rápido, com rápida proliferação, ocasionando sua migração para os tecidos vizinhos (metástase) e, assim, se espalhando no organismo. Este crescimento desregulado é chamado neoplasia e o conjunto de células que não apresenta divisão celular igualmente ao tecido que se originou é denominado tumor. Há exceções, como no caso da leucemia, câncer no sangue, que não apresenta tumores (Alberts *et al.*, 1997).

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* tem sido bastante utilizados no *screening* de possíveis moléculas a serem utilizadas como antitumorais devido às vantagens que apresentam quando comparados aos ensaios *in vivo*, como a reprodutividade e o curto período de teste. Outras vantagens podem ser enumeradas, tais como o número limitado de variáveis experimentais e a sensibilidade, além de serem mais acessíveis financeiramente (Rogero *et al.*, 2003). Diversas moléculas com atividade anticâncer vem sendo descritas, oriundas de produtos naturais ou a partir de síntese. No período de 1950 a 2010 foram relatadas 128 novas drogas com essa origem (Newman e Cragg, 2012).

Várias classes de substâncias tem demonstrado atividade citotóxica, dentre elas alcaloides da família Lauraceae, sendo possíveis antitumorais. Uma alta citotoxicidade foi observada para actinodafinina, isolada de *Cassytha filiformis*, frente às linhagens celulares Mel-5 e HL-60 (Stevigny *et al.*, 2002). A mesma substância foi observada nas raízes de *Cinnamomum insularimontana* e induziu apoptose células humanas de hepatoma Mahvalu pelo aumento de óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e a regulação da sinalização de NF-κB (Hsieh *et al.*, 2006).

A dicentrina, obtida das raízes de *Lindera megaphylla*, mostrou atividade citotóxica frente às linhagens celulares HCE-6, Molt-4, CESS, HL60, K562 e MS-G2 (Huang *et al.*, 1998), enquanto que a laurólitsina, observada nas cascas do caule de *Phoebe chinensis*, foi ativa frente à linhagem celular Hep-2 (Nguyen e Nguyen, 2004). A boldina, obtida da casca

do caule de *Dehaasia kurzii*, também apresentou atividade citotóxica frente à linhagem de células tumorais HEP-2 com inibição total da cultura celular na concentração de 0,3 mg/mL (Rahman *et al.*, 1988).

Os alcaloides carbazólicos murrayamina A e (+)-mahanina, obtidos das folhas de *Murraya euchrestifolia*, mostraram citotoxicidade significativa frente a linhagens celulares KB com concentrações de 3,0 µg/mL e 3,3 µg/mL respectivamente (Wu, 1991). Os alcaloides acridônicos isolados dos frutos e raízes de *Zanthoxylum leprieurii* mostraram moderada citotoxicidade frente a células de carcinoma do pulmão (A549), células de adenocarcinoma colorretal DLD-(1) e células normais (WS1) com valores de CI₅₀ variando de 27-77 µM (Ngoumfo *et al.*, 2010). Estes relatos ilustram a importância do estudo desses metabólitos, em especial na família Lauraceae.

4.6. Atividade antimicrobiana

A busca por novas moléculas antimicrobianas tem sido uma constante nos estudos com produtos naturais. Estudos recentes mostram que no período de 1981 a 2010 foram descobertas 147 novas drogas antimicrobianas (Newman e Cragg, 2012). Os métodos de varreduras antimicrobianas avaliam a presença de atividade antibacteriana e antifúngica e são influenciados tanto pela metodologia empregada quanto pelos microrganismos usados e pela solubilidade das substâncias estudadas (Ostrosky *et al.*, 2008).

A atividade antimicrobiana tem sido observada para substâncias de classes variadas, dentre elas alcaloides. Dentre os alcaloides isoquinolínicos, a (S)-3-metoxinordomesticina obtida de *Ocotea macrophylla* mostrou atividade antifúngica moderada frente à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* 6538 e *Enterococcus faecalis* 29212 (Pabon e Cuca, 2010).

Os alcaloides (+)-*N*-(metoxicarbonil)-*N*-nordicentrina, (+)-*N*-(metoxicarbonil)-*N*-norpredicentrina e (+)-*N*-(metoxicarbonil)-*N*-norglaucina, obtidos da casca do caule de *Litsea cubeba*, mostraram atividade antimicrobiana frente à bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) e aos fungos *Alternaria alternata* (TX-8025) e *Colletotrichum nicotianae* (SACC-1922) (Zhang *et al.*, 2012).

Os alcaloides pirrolizidínicos obtidos de *Adhatoda vasica* vasicina, vasicinona, acetato de vasicina, 2-acetilbenzil amina e vasicinolona apresentaram atividade antimicrobiana significativa. Dentre eles, a vasicina foi a mais ativa frente à *Escherichia coli* (20 µg/mL) e também frente à *Candida albicans* na concentração de 55 µg/mL (Singh e Sharma, 2013).

A partir das vagens de *Prosopis juliflora* foi obtido um extrato alcaloídico contendo majoritariamente juliflorina, prosoflorina e juliprosina, o qual foi ativo frente a *Micrococcus luteus* (25 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (50 µg/mL) e *Streptococcus mutans* (50 µg/mL). Segundo os autores, o uso desta espécie como suplemento para ruminantes poderia reduzir a produção de gás durante a digestão destes animais (Dos Santos *et al.*, 2013).

Os extratos alcaloídicos de *Rhizophora mucronata* contendo os alcaloides ajmalicina, vindolina, catarantina e serpentina apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (Gurudeeban, Ramanathan e Satyavani, 2013).

Em estudo realizado com alcaloides berberínicos foi observado o sinergismo entre diferentes combinações aumentando a atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* (MRSA). Combinações sinérgicas foram obtidas com berberina e epiberberina, jatrorrizina e palmatina; e jatrorrizina e colptisina; enquanto que efeito antagônico foi observado para colptisina e epiberberina. Os autores relataram ainda que a combinação mais ativa foi a berberina: colptisina: jatrorrizina: palmatina: epiberberina = 0,702: 0,863: 1: 0,491: 0,526 (Luo *et al.*, 2013). Ao contrário do que era alardeado há apenas algumas décadas, estudos como os desses autores mostram que a atividade ocorre não apenas de substâncias isoladas, mas também de frações com efeito sinérgico.

4.7. Espectrometria de massas

A identificação de substâncias em misturas tem sido aplicada no estudo de matrizes complexas, tanto pela identificação de substâncias já conhecidas quanto pela busca de novas moléculas. As ferramentas disponíveis para estes estudos têm evoluído, dentre elas a espectrometria de massas. Essa técnica já é utilizada há bastante tempo na identificação de moléculas associada à cromatografia em fase gasosa, sendo necessária a volatilidade da molécula. Entretanto, com a evolução da técnica, esta pode ser utilizada tanto hifenada a

outra, como a cromatografia líquida, ou sozinha, como nos estudos com inserção direta no espectrômetro de massas (Roush e Cooks, 1984).

Estudos recentes realizados com alcaloides aporfínicos em espectrômetro de massas com analisador *ion trap* observaram a presença de padrões de fragmentação de alcaloides desta classe, contribuindo na caracterização destas moléculas (Stevigny *et al.*, 2004). O uso da espectrometria de massas é relatado no estudo de diversos alcaloides, inclusive quando estes se apresentam em baixas concentrações nos extratos (Koulman *et al.*, 2007).

Silva *et al.* (2012) detectaram alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos em *Unonopsis guatteroides* utilizando a espectrometria de massas tipo *ion trap*. Os alcaloides glucoindólicos monoterpênicos (S)-5-carboxivincosida e strictosamida foram obtidos das folhas de *Vinca major* e tiveram suas estruturas elucidadas por ESI-MS entre outras técnicas (Şöhretoğlu *et al.*, 2013). A partir de *Uncaria rhynchophylla* foram identificados e quantificados 18 alcaloides oxindólicos em estudos realizados com HPLC com detector de arranjo de diodo acoplado ao espectrômetro de massas quadrupolo tempo de voo Q-TOF-MS (Xie *et al.*, 2013).

Os alcaloides ativos presentes nos galhos de *Catharanthus roseus* vimblastina, vindolina, ajmalicina, catarantina e vinleurosina foram identificados por injeção direta em espectrômetro de massas tipo *ion trap* através da análise de espectros ms^{1-2} (Chen *et al.*, 2013).

Um total de dez alcaloides pirrolizidínicos foi obtido das folhas de *Echium hypertropicum* e *Echium stenosphon* subsp. *stenosphon*, sendo oito dessas estruturas identificadas por comparação das massas moleculares e os padrões de fragmentação da literatura. Dentre eles a echimidina e a 7-(2-metilbutiril)-9-echimidinilretronecina (Carvalho *et al.*, 2013).

O conjunto destes dados da literatura nos possibilita, como nunca anteriormente, a análise de frações complexas contendo alcaloides, com a capacidade de sua identificação em mistura.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Obtenção do material vegetal

Foram coletados galhos grossos (10 Kg), galhos finos (0,5 Kg) e folhas (2 Kg) de dois indivíduos adultos de *Aniba rosaeodora* Ducke na Reserva Ducke, sendo o primeiro coletado em 06/2009 e o segundo em 10/2009, por meio de colaboração com o Dr. Paulo de Tarso, pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), que trabalha há várias décadas com esta espécie. Os galhos grossos tiveram as cascas separadas. O material coletado foi limpo, separado em galhos grossos, cascas, galhos finos e folhas, seco em estufa de circulação forçada à 40 °C, triturado em moinho de facas e armazenado.

5.2. Obtenção do subproduto industrial

Os subprodutos industriais oriundos da extração do óleo essencial de *Aniba rosaeodora* Ducke (hidrolatos e subproduto sólido, os cavacos e folhas) foram doados pelo Sr. Carlos Magaldi, diretor atual da Magaldi Agro Industrial Ltda, localizada na Av. Dr. Pereira Barreto, 144, Maués, AM. Os subprodutos sólidos foram secos e triturados.

5.3. Preparo de extratos etanólicos

A partir do material vegetal coletado foram preparados extratos etanólicos por maceração exaustiva em temperatura ambiente de caules e folhas. Em aparelho de Soxhlet foram extraídos galhos grossos, cascas, folhas, galhos finos, subproduto sólido industrial-folha e subproduto sólido industrial-caule. Foram realizados dez refluxos de aproximadamente uma hora e quinze minutos cada.

5.4 Testes de diferentes metodologias para a extração de alcalóides

Parte dos galhos grossos coletados e dos extratos etanólicos obtidos deste foram separados para os testes com diferentes metodologias de extração de alcaloides. Para tanto foram escolhidas seis metodologias de extração de alcaloides na literatura, as quais foram testadas com pequenas modificações durante seu desenvolvimento. Os testes de metodologias de extração de alcaloides foram aplicados somente aos galhos grossos devido a maior quantidade coletada e devido ao subproduto industrial sólido ser majoritariamente constituído de caule.

5.4.1 Metodologia 1 (MET1)

A metodologia 1 foi empregada segundo Wolter Filho *et al.* (1985). O extrato etanólico foi solubilizado em ácido tartárico 8% sob aquecimento, em ultrassom e posteriormente filtrado. A solução aquosa obtida foi extraída com éter etílico para a remoção das substâncias lipofílicas. Após, a fase aquosa foi basificada com NH_4OH 25% (pH 11), e extraída com éter etílico para a obtenção da primeira fração alcaloídica, e com CHCl_3 , para a obtenção da segunda fração alcaloídica. As frações alcaloídicas obtidas foram lavadas com água destilada e secas em Na_2SO_4 . A figura 8 mostra um esquema dessa metodologia.

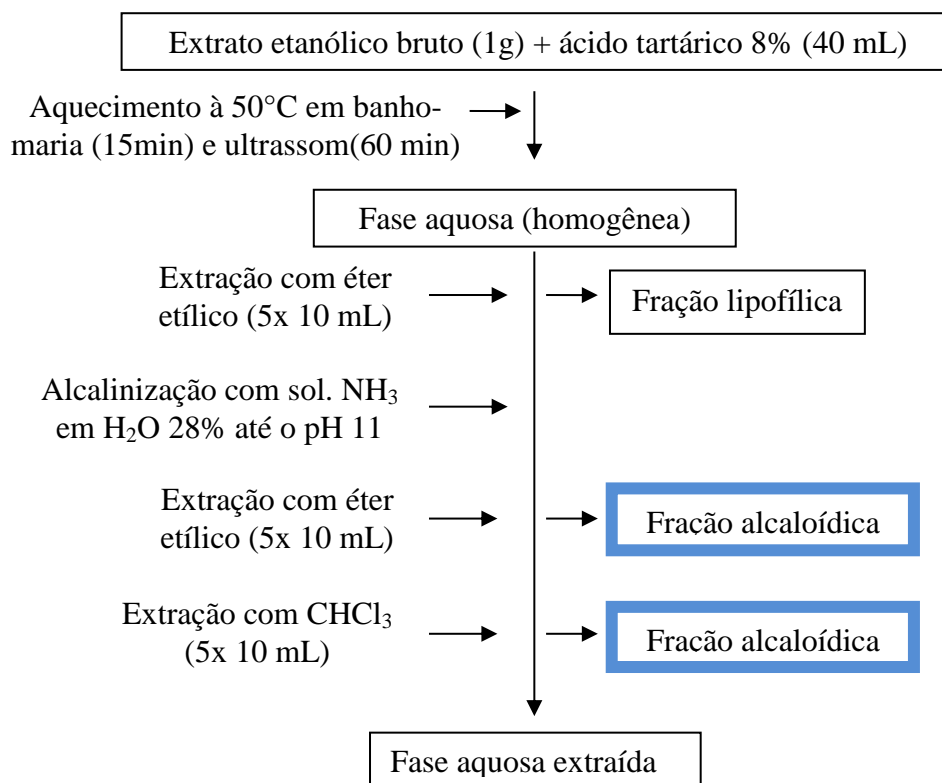


Figura 8: Esquema da metodologia 1 utilizada na obtenção de alcaloides.

5.4.2 Metodologia 2 (MET2)

A metodologia 2 foi realizada segundo estudo de Djilani *et al.* (2006) com modificações (Figura 9). O material vegetal foi extraído com uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,03% em ultrassom por 2,5 horas. A mistura foi filtrada e o filtrado foi acidificada com H_2SO_4 2% até o pH 3-4. Em seguida, os alcaloides foram precipitados com o reagente de Mayer, filtrados, solubilizados em Na_2CO_3 5% e em seguida, a fase aquosa basificada foi extraída com CHCl_3 . A fase orgânica obtida foi lavada com água destilada, seca com Na_2SO_4 e concentrada em evaporador rotatório, fornecendo uma fração alcaloídica.

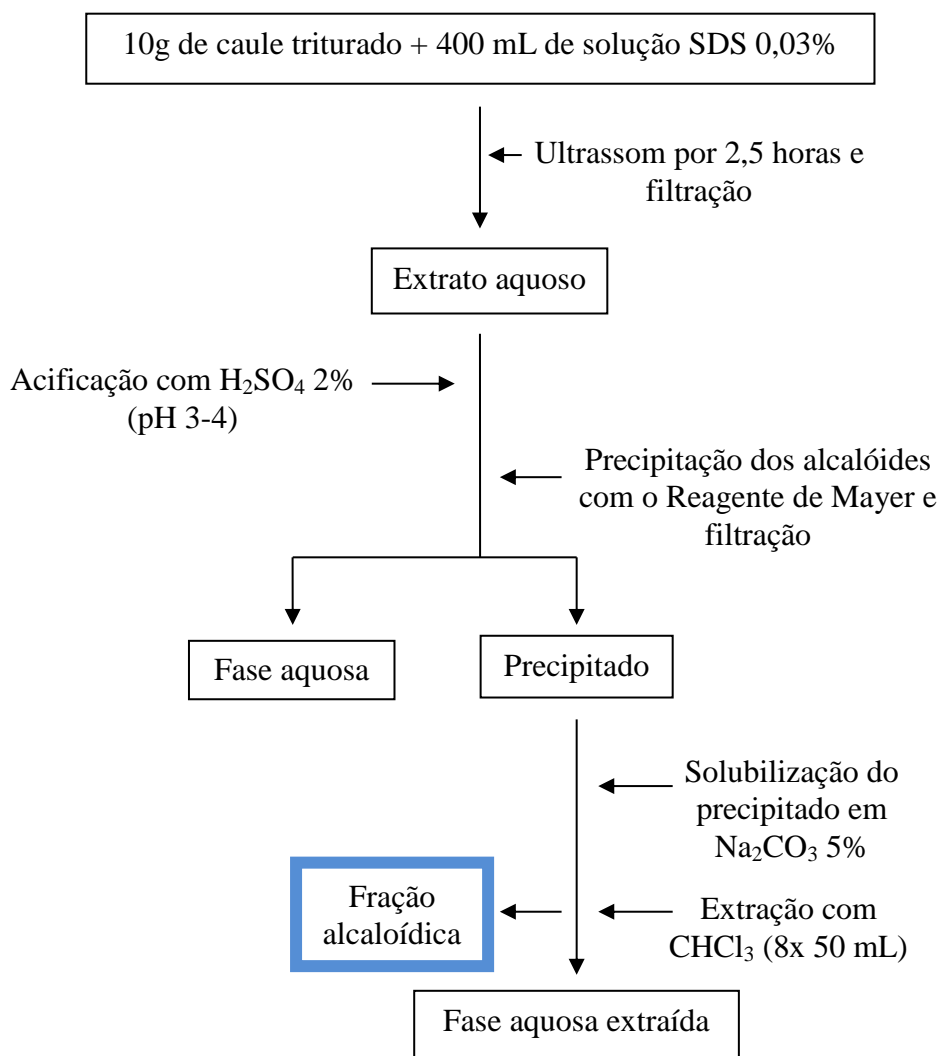


Figura 9: Esquema da metodologia 2 utilizada na obtenção de alcaloides.

5.4.3 Metodologia 3 (MET3)

Na metodologia 3 o material vegetal foi previamente alcalinizado com 45 mL de solução NH_3 em H_2O 28% e macerado em acetato de etila por 72 horas à temperatura ambiente, seguido pela filtração e concentração da fase em AcOEt. O extrato concentrado foi solubilizado em H_2SO_4 2% até o pH 3-4, extraído com éter de petróleo e éter etílico, para a remoção de substâncias lipofílicas, ácidas e neutras. Após, a fração aquosa foi alcalinizada com solução de NH_3 em H_2O 28% até o pH 9-10 e extraída com CHCl_3 . A fase orgânica

obtida foi lavada com água destilada, seca com Na_2SO_4 e concentrada em evaporador rotatório, fornecendo uma fração alcaloídica (Djilani *et al.*, 2006) (Figura 10).

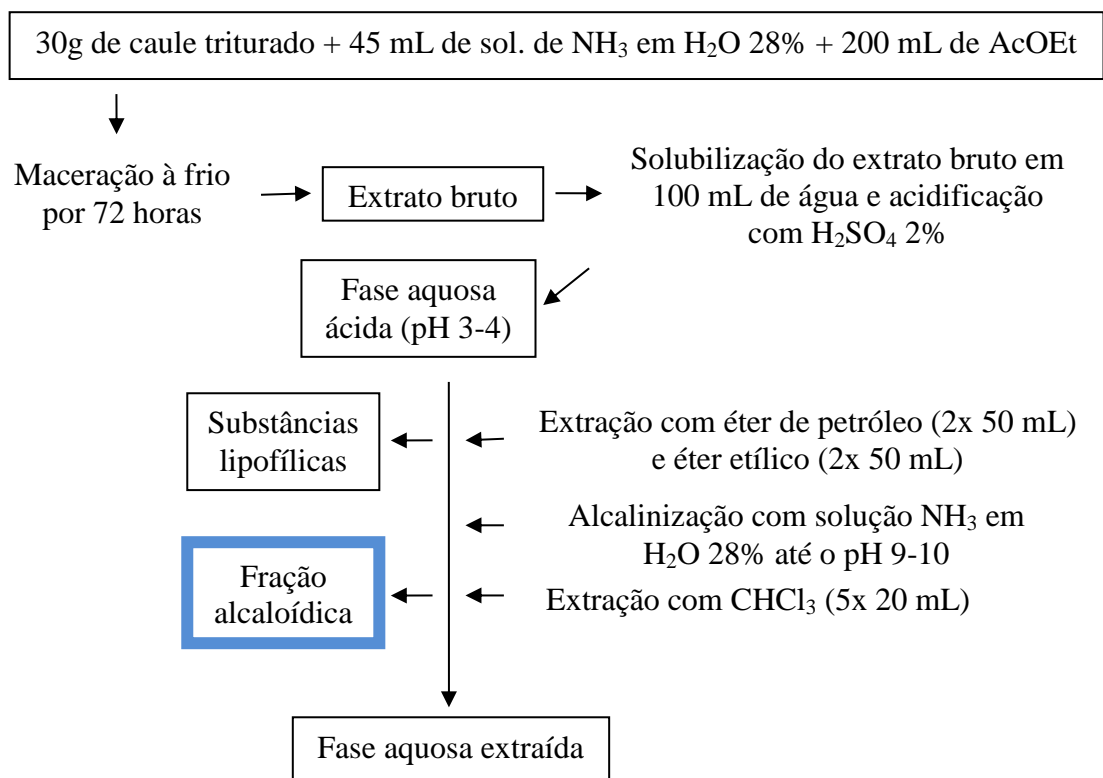


Figura 10: Esquema da metodologia 3 utilizada na obtenção de alcaloides.

5.4.4 Metodologia 4 (MET4)

A quarta metodologia foi aplicada a uma fração do extrato etanólico obtido previamente dos galhos grossos coletados, sendo este solubilizado em H_2SO_4 1% (pH 3-4). A fase aquosa obtida foi extraída com éter etílico para a obtenção das substâncias lipofílicas, e em seguida foi alcalinizada com Na_2CO_3 sólido até o pH 8-10. Esta foi então extraída com éter etílico para a obtenção da primeira fração alcaloídica. Em seguida, a fase aquosa foi alcalinizada com NaOH sólido ao pH >13, foi adicionado ácido cítrico sólido (1g) para a formação dos sais de citratos dos alcaloides. Em seguida a fase aquosa foi extraída novamente com éter etílico, obtendo-se a segunda fração alcaloídica. A fase aquosa foi então acidificada

com H_2SO_4 2% ao pH 8-10 e extraída com CHCl_3 para a obtenção da terceira fração alcaloídica. Após, a fase aquosa foi novamente acidificada com H_2SO_4 2% até o pH 5,5-7, foi adicionado KI (0,5 g), para a obtenção dos sais de iodo dos alcaloides, e foi extraída com CHCl_3 obtendo-se a quarta fração alcaloídica (Grycová, Dostál e Marek, 2007). A figura 11 ilustra esse método.

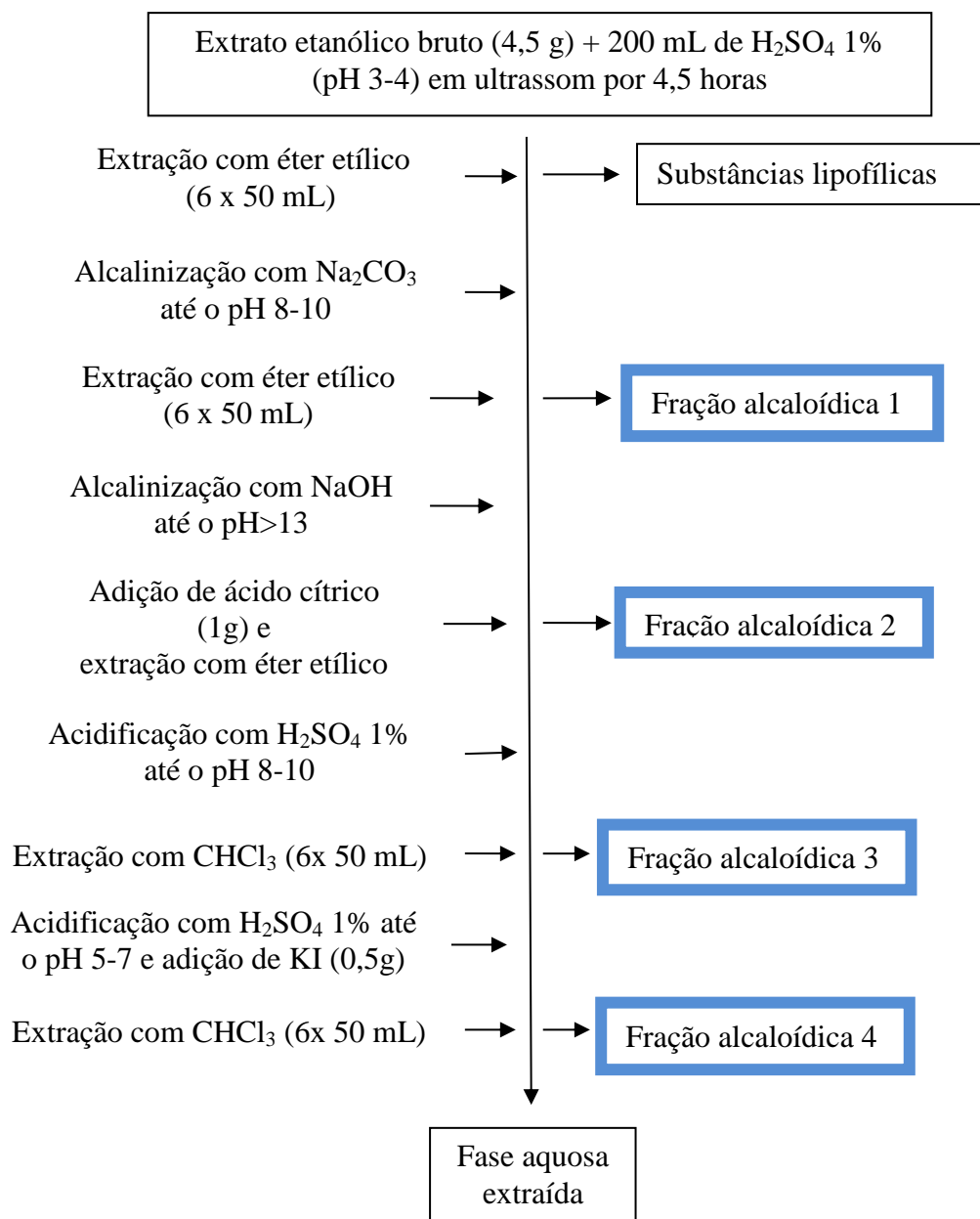


Figura 11: Esquema da metodologia 4 utilizada na obtenção de alcaloides.

5.4.5 Metodologia 5 (MET5)

A quinta metodologia utilizada é tradicionalmente aplicada à extração da cafeína, onde o material vegetal foi aquecido em água e Na_2CO_3 (60 g) por 30 minutos a 50°C . Após o resfriamento e filtração, a fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 , lavada em água destilada e seca com Na_2SO_4 , fornecendo a fração alcaloídica (Mitchell, Scott e West, 1974) (Figura 12).

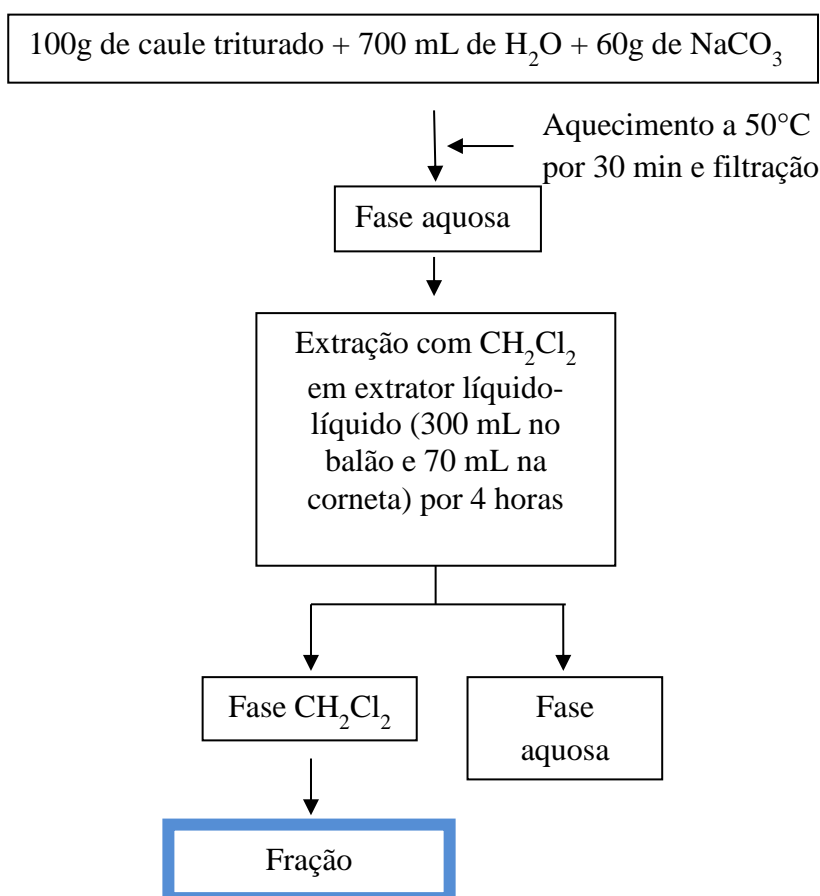


Figura 12: Esquema da metodologia 5 utilizada na obtenção de alcaloides.

5.4.5.1. Isolamento da anibina

A fração alcaloídica (200 mg) obtida da metodologia 5 a partir dos galhos grossos coletados foi submetida a cromatografia em coluna aberta em gel de sílica 70-230 mesh utilizando clorofórmio e metanol em polaridade crescente como eluente. Foram obtidas sete frações, as quais foram analisadas em cromatografia em camada delgada (CCD), sendo observada na terceira fração a presença de uma única mancha, a qual mostrou resultado positivo para alcaloides quando revelada com Dragendorff. Esta fração foi submetida à recristalização com etanol e posteriormente analisada por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

5.4.6. Metodologia 6 (MET6):

A sexta metodologia foi aplicada ao material extraído previamente com etanol, sendo uma forma de reextração. O material vegetal extraído foi reextraído por maceração em ácido cítrico 1% em água e etanol 1:1. O extrato obtido foi solubilizado em água e alcalinizado com solução aquosa de K_2CO_3 5% até o pH 11-12, e extraído com CHCl_3 . A fase orgânica foi lavada em água destilada e seca com Na_2SO_4 , fornecendo uma fração alcaloídica (BATTERSBY *et al.*, 1974) (Figura 13).

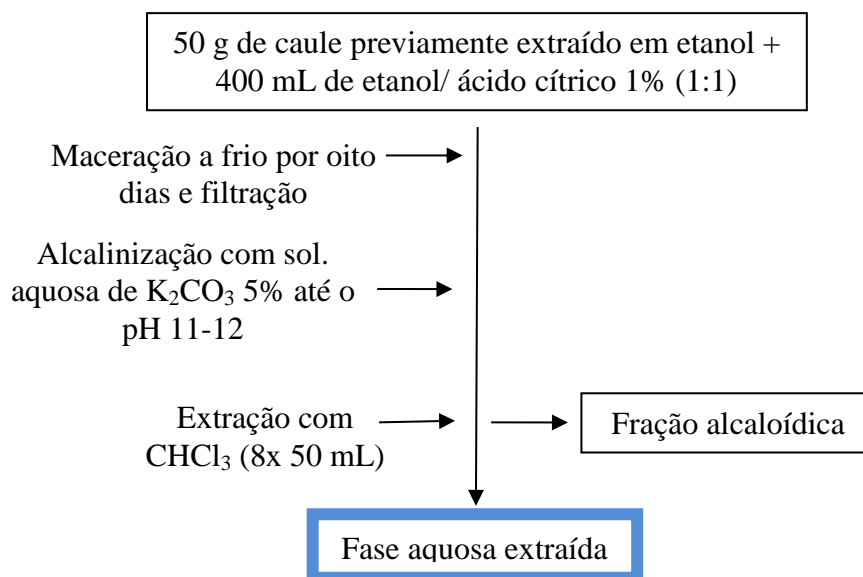


Figura 13: Esquema da metodologia 6 utilizada na obtenção de alcaloides.

5.5. Experimentos realizados com o subproduto líquido industrial (hidrolato)

5.5.1 Extração da fração oleosa do subproduto líquido industrial (hidrolatos)

Uma fração do hidrolato (240 mL), previamente homogeneizado, foi distribuída em partes iguais em seis tubos tipo falcon de 50 mL, cada um com 40 mL do hidrolato. Os tubos foram centrifugados por 15 min a 4000 rpm. Após, as frações oleosas de cada tubo foram retiradas, e colocadas juntas num tubo de ensaio pequeno. Neste tubo foram adicionadas algumas gotas de diclorometano para ajudar na separação da fase aquosa, e com auxílio de pipeta, a fase orgânica foi transferida para um frasco para secagem. Após a secagem as frações oleosas 1, 2 e 3 foram armazenadas em freezer -20 °C para análises posteriores.

5.5.2. Liofilização do subproduto líquido industrial (hidrolatos)

Uma segunda porção do hidrolato (240 mL) foi distribuída em porções iguais em placas de Pertri, congelado em freezer -20 °C por 24 horas e em seguida transferido para freezer -80 °C por mais 24 horas, como preparo pré-liofilização. Após o congelamento, a amostra foi liofilizada e transferida para um frasco com auxílio de algumas gotas de metanol e armazenada em dessecador até a secagem completa. A amostra liofilizada mostrou aspecto de um sólido amorfo de coloração marrom avermelhada com massa de 13,9 mg. Em seguida foi armazenada em freezer -20 °C para análises posteriores.

5.5.3. Coluna de XAD-4 do subproduto líquido industrial (hidrolatos)

Uma terceira fração do hidrolato foi submetida à coluna de XAD-4 a fim de se concentrar possíveis substâncias orgânicas presentes neste extrato aquoso em uma pequena fração orgânica. Para tanto foi utilizada uma coluna de vidro aberta, com torneira de teflon, de 2 cm de diâmetro e 70 cm de altura, a qual foi empacotada com 90g da resina XAD-4 em água destilada, resultando em 52,5 cm de altura da resina. Em seguida, a coluna foi lavada com água destilada para a retirada da solução salina protetora da resina.

Após o preparo da coluna, foram aplicados 10 L do hidrolato na coluna para que as substâncias presentes nesse ficassem adsorvidas nos microporos da resina. Ao final da eluição desse volume do extrato aquoso a coluna já se mostrava saturada, com velocidade de fluxo baixa. Após, a coluna foi lavada com 0,5 L de água destilada. A coluna foi eluída com 300 mL de etanol (1ª fração), na tentativa de retirar as substâncias orgânicas presentes no hidrolato. Em seguida a coluna foi eluída com 300 mL de acetona e 300 mL de metanol (2ª fração). Foram utilizados esses dois solventes como regenerantes ao final do experimento (Amberlite, 2003). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório e armazenadas em dessecador para finalização de sua secagem. Em seguida foram armazenadas em freezer -20 °C para análises posteriores.

5.6. Análises das frações obtidas

5.6.1. Análise das frações alcaloídicas obtidas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas na Central Analítica Multidisciplinar, na Universidade Federal do Amazonas. As frações alcaloídicas obtidas tiveram seus rendimentos calculados e foram inicialmente analisadas em CCD. Foram submetidas à espectrometria de massas para a obtenção de perfis alcaloídicos. Os espectros de massa foram adquiridos utilizando um espectrômetro de massas LQC Fleet (Thermo Scientific) equipado com um analisador *ion trap* e com uma fonte de *eletronspray* operando no modo positivo. Foram injetados 5 μL de amostra no *loop*, utilizando seringa de 50 μL Hamilton, em fluxo de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ de metanol grau HPLC mantido através de bomba de fluxo controlado. Os parâmetros utilizados durante a análise foram *sheath gas flow rate* (arb): 20; *aux. gas flow rate* (arb): 5; *sweep gas flow rate* (arb): 0; *spray voltage* (Kv): 5,00; *capillary temperature* ($^{\circ}\text{C}$): 300,00; *capillary voltage* (V): 26; *tube lens* (V): 110,00. Os íons foram monitorados numa faixa de 100 a 1000 m/z para a obtenção dos *full scans*. Os possíveis alcaloides foram fragmentados e os dados obtidos comparados à literatura para sua identificação.

Foram também realizadas análises de espectrometria de massas de alta resolução no Centro de Biotecnologia da Amazônia. As frações alcaloídicas foram analisadas em espectrômetro de massas de alta resolução Q-Tof equipado com analisador quadrupolo. As amostras foram solubilizadas em acetonitrila-água (1:1) acidificada com 0,1% de TFA, e analisadas por injeção direta de 20 μL .

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C) e bidimensionais foram obtidos em espectrofotômetro da marca Varian modelo INOVA-500 ($B_0 = 11,7\text{ T}$), pertencente ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), com frequência de 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . Para solubilização das amostras utilizou-se como solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3). Como referência para os deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram utilizados os δ conhecidos dos solventes utilizados. Os decaimentos livres por indução (FID – *Free Induction Decay*) obtidos nos experimentos foram tratados no software ACD/NMR Processor Academic Edition

versão 12.01 da Advanced Chemistry Development, Inc (ACD Labs). As constantes de acoplamento (J) medidas em Hertz (Hz) e as multiplicidades dos sinais identificadas: s (singleto), d (dupletto), dd (duplo dupletto), t (tripletto) e m (multipletto).

5.6.2. Análise das frações oleosas obtidas dos hidrolatos

As frações oleosas obtidas dos hidrolatos foram analisadas por cromatografia em fase gasosa no Centro de Biotecnologia da Amazônia. As amostras foram diluídas em diclorometano e submetidas à análise por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) para a obtenção de dados quantitativos e a determinação dos índices de retenção, e por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para a obtenção dos espectros de massas como dados qualitativos sobre o óleo essencial. As frações oleosas foram analisadas em cromatógrafo em fase gasosa modelo CG 2010 da Shimadzu com detector de ionização de chama (CG-DIC), em coluna DB-5, com medidas de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, sendo utilizado como gás de arraste o hélio em fluxo de 1mL/min. A injeção foi em modo split 1:10 realizada com injetor a 250 °C, e o forno foi programado de 60 °C a 240 °C com incremento de 3 °C/min. Padrões de hidrocarbonetos lineares foram injetados nas mesmas condições para a obtenção dos índices de retenção.

Após as análises em CG-DIC, as frações oleosas foram analisadas em cromatógrafo em fase gasosa modelo QP-2010 da Shimadzu acoplado a um espectrômetro de massas, empregando a ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em condições idênticas às utilizadas para o CG-DIC.

Os componentes das frações oleosas foram determinados através dos dados de tempo de retenção, obtidos no CG-DIC, e dos espectros de massas, obtidos no CG-EM. Foram calculados os índices de retenção utilizando a equação de Van der Dool-Kratz, relacionando os tempos de retenção das substâncias presentes no óleo essencial com os tempos de retenção da série homóloga de hidrocarbonetos lineares (C9-C22) injetados nas mesmas condições de análise do óleo essencial. Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com os dados da espectroteca Wiley 7.0 e da literatura (Adams, 2009).

5.7. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* – varredura inicial e determinação da CI_{50}

Foram submetidos aos ensaios de citotoxicidade *in vitro* os extratos etanólicos brutos obtidos do material coletado (galhos grossos, galhos finos, cascas e folhas) e do subproduto industrial (caules e folhas), além das frações alcaloídicas obtidas pelas metodologias de extração 3, 5 e 6 a partir dos galhos grossos coletados e dos subprodutos industriais sólidos - caules e folhas. O ensaio foi realizado pelo teste do MTT, no Grupo de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, com o qual o Grupo Q-BiomA (Grupo de Pesquisas em Química de Biomoléculas da Amazônia) possui acordos de colaboração.

5.7.1. Células

As linhagens tumorais utilizadas, OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (côlon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Na determinação da CI_{50} foram utilizadas as linhagens tumorais utilizadas, OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (côlon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda).

5.7.2. Amostras

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. Substâncias puras foram testadas na concentração única de 5 $\mu\text{g/mL}$, os extratos e óleos essenciais na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e as frações na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$.

5.7.3. Método

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (Skehan *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosmann (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (Berridge *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens OVCAR-8 e SF-295; $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-116 e $0,3 \times 10^6$ para a linhagem HL-60. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Como controle positivo foi utilizada a doxorubicina (Dox) 0,3 µg/mL, com 100% de inibição.

5.7.4. Determinação da CI_{50}

As amostras ativas na varredura inicial foram avaliadas novamente para o cálculo de suas CI_{50} . A determinação das concentrações inibitórias médias (CI_{50}) foi realizada pelo método do MTT em concentrações que variaram de 0,05 a 25 $\mu\text{g/mL}$ para frações e de 0,10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ para extratos, sendo essas amostras diluídas em série no meio RPMI 1640 para obtenção das concentrações desejadas.

5.7.5. Análise dos resultados

Os experimentos da varredura inicial foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*. Os experimentos de determinação de CI_{50} foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O cálculo das CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos desvios foram realizados a partir da regressão não-linear no programa *GraphPad Prism* (versão 6).

5.8 Ensaio de atividade antimicrobiana

5.8.1. Soluções testadas

Foram testados os extratos etanólicos brutos de galhos grossos e folhas coletados e dos subprodutos industriais – caules e folhas. Foram também avaliadas as frações alcaloídicas obtidas pelas metodologias 3, 5 e 6 obtidas dos subprodutos industriais – caules e folhas, além das frações oleosas obtidas dos hidrolatos. As amostras foram preparadas com o acréscimo de solução 1:1 de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada estéril, para concentração final de 10 mg/mL . Foram preparadas soluções de controles positivo (imipenem a 10 $\mu\text{g/mL}$) e

negativo (DMSO e água destilada estéril 1:1). Os ensaios foram realizados na Fundação Oswaldo Cruz em Manaus, no segundo semestre de 2012 e primeiro semestre de 2013, sob a supervisão da Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi.

5.8.2. Micro-organismos teste

A atividade antimicrobiana foi testada contra patógenos bacterianos de importância médica e veterinária os quais foram: sete espécies Gram-positivas: *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (ATCC 6051), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ATCC 33591), *Streptococcus oralis* (*Streptococcus sanguis*) (ATCC 10557), *Streptococcus pyogenes* grupo A tipo 1 (ATCC 12344) e *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus faecalis*) (ATCC 14506); e três espécies Gram-negativas: *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (CDC EDL-933), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022).

5.8.3. Procedimento experimental

Os testes, em duplicata, foram realizados por difusão em ágar pela técnica do orifício, com adaptações das técnicas descritas por Cursino et al. (2011) e Pieri et al. (2010). Foram utilizadas placas de Petri de 90 mm previamente preparadas com uma camada inferior de 10 mL de ágar bacteriológico e uma superior de 15 mL de ágar Müeler Hinton. Na camada superior foram feitos seis orifícios com o auxílio de ponteiras estéreis de 200 µL de forma equidistante para a posterior pipetagem de 40 µL das soluções das amostras, do controle positivo e do controle negativo.

As culturas bacterianas foram preparadas a partir de culturas novas (18-24 h), produzidas a partir de uma única colônia crescida em meio ágar BHI, e foram adequadas a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Preparados os inóculos seguiu-se a semeadura nas placas preparadas com o auxílio de suabes estéreis, segundo preconiza o CLSI (2008), que

foram imersos no inóculo e levemente pressionados na parede do tubo para retirada de excesso. Após as soluções serem inoculadas em seus respectivos orifícios, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h em estufa bacteriológica.

Após o tempo de incubação verificou-se a presença de halos de inibição circulares. Quando identificada a formação de halo acrescentou-se a placa uma sobrecamada de 10mL de solução de trifeniltetrazólio a 0,1%, um indicador colorimétrico, que passa de transparente a vermelho quando há crescimento bacteriano, acrescido de ágar bacteriológico 1% para evidenciação destacada do halo de inibição. Os halos de inibição se apresentam sem conversão do corante, com coloração transparente destacada do restante da placa onde houve o crescimento. Foi considerada inibição microbiana quando houve formação de halo de inibição, sendo este medido com auxílio de paquímetro milimetrado.

5.8.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O método utilizado para determinar a CIM frente ao *Bacillus subtilis* subsp. *subitillis* (ATCC 6051) foi o método de microdiluição descrito por NCCLS (2003) com uma modificação sugerida por Mann e Makham (1998), com a inclusão de indicador colorimétrico de crescimento resazurina, que é reduzida quando as células bacterianas viáveis estão presentes. Séries de duas diluições em anibina e imipenem foram preparadas por vórtice em DMSO à temperatura ambiente. Caldo de Luria – Bertani (LB-Himedia, Mumbai, Índia) foi inoculado com as bactérias de ensaio para se obter uma densidade final de células em torno de 1 ciclo log, mais baixa do que a densidade celular necessária para reduzir a resazurina (normalmente $2,5 \times 10^5$ mL⁻¹ de células). A densidade de inóculo foi confirmada por contagens de placa. Uma bandeja estéril de microtitulação de 96 poços foi definida da seguinte forma: 100µL de inóculo + 100 µL de anibina ou imipenem (concentrações finais foram: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,6251 mg/mL, 0,313 mg/mL, 0,156 mg/mL, 0,078 mg/mL e 0,039 mg/mL) e 100 µL de inóculo + 100 µL de DMSO (controle positivo de crescimento) e 100 µL de meio esterilizado + 100 µL de DMSO (controle negativo). Os conteúdos foram homogeneizados cuidadosamente e incubados a 37 °C durante 3h. Após a incubação, 30 µL de solução de resazurina (6 µg . mL⁻¹) foram adicionados, com exceção do controle negativo, onde foram adicionados 30 µL de água

destilada. Após uma segunda incubação durante 4 h a 37 °C, os poços foram avaliados visualmente para a mudança de cor, que foi considerada inibição quando a contagem de bactérias não aumentou após o tempo de incubação e a resazurina não foi reduzida para a coloração rosa. A concentração mais baixa dos compostos em que a resazurina permanece azul representa a CIM. Os ensaios foram realizados em duplicata.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Extratos etanólicos obtidos do material vegetal coletado e do subproduto industrial

Os extratos etanólicos das partes vegetais do material coletado foram obtidos com rendimentos de 6% a 21%, conforme a tabela 1 e foram analisados em CCD utilizando como revelador o Reagente de Dragendorff, usado na detecção de alcaloides e o H₂SO₄ 10% em etanol, um revelador universal. O extrato de folhas obtido em Soxhlet (CABC16) apresentou rendimento maior que os demais, 21%, caracterizando-se como possível material de partida promissor na obtenção de substâncias ativas.

Tabela 1: Rendimentos dos extratos etanólicos obtidos do material vegetal coletado na Reserva Ducke.

Identificação	massa de material vegetal extraído (g)	Rendimento do extrato (%)
Maceração das folhas	1556,5	13,09
Extração em Soxhlet das folhas	300,0	21,65
Extração em Soxhlet das cascas	977,0	14,06
Extração em Soxhlet dos galhos finos	200,0	13,21
Maceração do caule	2003,5	6,20
Extração em Soxhlet do caule	800,00	10,53

As análises em cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos obtidos utilizando o revelador Dragendorff mostraram manchas de coloração alaranjada em todos os extratos, sugerindo a presença de alcaloides nestes.

O subproduto industrial sólido foi separado em caules e folhas. Tanto as folhas como os caules do subproduto industrial foram extraídos em aparelho de Soxhlet com etanol, sendo observados rendimentos de 9,84% e 4,6%. Ambos foram menores que os obtidos para as folhas e caules coletados, de 21,65% e 10,53% respectivamente. Os extratos obtidos do subproduto industrial foram analisados em CCD junto com os extratos obtidos do material coletado para análise comparativa de seus perfis em placa cromatográfica. Foram observadas manchas alaranjadas bastante intensas nos extratos dos caules, tanto do material coletado,

quanto do subproduto industrial, sugerindo a presença de alcaloides em maior quantidade nesta parte da planta. Por esse motivo e pelo subproduto industrial ser formado majoritariamente de caule, as metodologias de extração de alcaloides foram empregadas no caule.

6.2 Frações alcaloídicas obtidas do material vegetal coletado e do subproduto industrial

Foram selecionadas seis metodologias de extração de alcaloides diferentes entre si, as quais foram aplicadas aos galhos grossos coletados para um teste inicial, com o objetivo de encontrar método com maior rendimento e praticidade de execução. Um segundo objetivo foi testar métodos de extração diferentes e observar se eram extraídos alcaloides diferentes conforme a metodologia aplicada.

Os rendimentos obtidos mostraram que as metodologias 3, 5 e 6 apresentaram melhores rendimentos (Tabela 2), bem como maior praticidade de execução. As demais frações obtidas apresentaram rendimentos menores, entre 0,016 a 0,14%. Os rendimentos observados são condizentes com os relatados para espécies do gênero, tais como 0,06% para *A. muca* (Bravo *et al.*, 1996), 0,45% para *A. coto* (Mors e Gottlieb, 1959) e 1% para *A. canellila* (Oger *et al.*, 1993).

Tabela 2: Rendimentos das frações alcaloídicas obtidas dos galhos grossos coletados a partir das diferentes metodologias de extração testadas.

Amostra - Metodologia	Fração	Rendimento (%)
Metodologia 1	1A	0,059
	1B	0,016
Metodologia 2	2	0,01
Metodologia 3	3	0,40
Metodologia 4	4A	0,11
	4B	0,14
	4C	0,05
	4D	0,02
Metodologia 5	5	0,29
Metodologia 6	6	2,53

As análises em CCD mostraram a presença de manchas de coloração alaranjada, indicando a presença de alcaloides de polaridades diferentes. Foram também observadas manchas nas cromatoplacas reveladas com H₂SO₄ 10% em etanol, um revelador universal, sugerindo a presença de outras classes de substâncias nas frações obtidas (Figura 14).

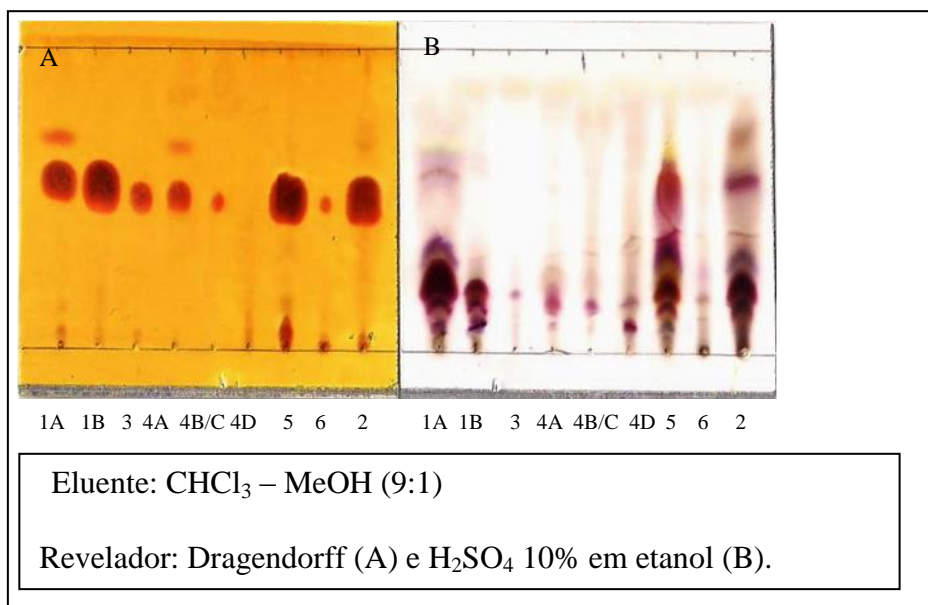


Figura 14: Análise em CCD das frações alcaloídicas obtidas do material coletado, empregando as metodologias 1 a 6.

As frações obtidas foram analisadas em espectrômetro de massa por inserção direta no modo positivo. Os espectros obtidos tanto para as amostras do caule coletado quanto dos subprodutos, apresentaram vários picos com [M+H]⁺ par em comum, mas com intensidades diferentes. Dentre os picos foram observadas massas compatíveis com alcaloides já relatados em *Aniba rosaeodora* e possivelmente alguns alcaloides observados em estudos com outras espécies da mesma família. Os picos de *m/z* 204, 300 e 330 ([M+H]⁺) foram detectados com maior abundância relativa nas frações alcaloídicas. Os demais foram observados com intensidade baixa nas frações obtidas. Esses foram fragmentados na tentativa de identifica-los comparando com a literatura (Tabela 3).

Tabela 3: Fragmentações observadas nas frações alcaloídicas.

[M+H] ⁺ detectado	principais fragmentos observados
204	187, 176, 172 e 104
246	237, 231, 213, 186, 167 e 125
286	269, 237, 178, 175, 145, 143, 137 e 107
300	269, 237, 192, 175, 145, 143, 137 e 107
314	297, 283, 265, 237, 220, 190, 176 e 151
328	313, 311, 297, 279, 265, 190 e 178
330	299, 267, 192, 175 e 137
425	407, 365, 343, 204 e 176

Após essa varredura inicial foram escolhidas as metodologias 3, 5 e 6 devido aos rendimentos, praticidade de execução e aos perfis alcaloídicos observados. As metodologias 3, 5 e 6 foram aplicadas ao caule e folha do subproduto industrial, sendo as extrações feitas em triplicata. Foram obtidas seis frações a partir do subproduto industrial sendo três dos caules (3c, 5c e 6c) e três das folhas (3f, 5f e 6f) do subproduto industrial. As frações alcaloídicas obtidas do subproduto industrial apresentaram rendimentos menores que as obtidas do material coletado, provavelmente devido ao subproduto já ter passado por uma extração anterior (Tabela 4).

Tabela 4: Rendimentos obtidos dos caules coletados e dos subprodutos do caule e folhas pelas metodologias 3, 5 e 6 (%).

Material vegetal	Metodologia 3	metodologia 5	metodologia 6
caule coletado	0,40	0,29	2,53
subproduto caule	0,12	0,16	1,92
subproduto folha	0,07	0,13	2,13

As frações alcaloidicas obtidas pela metodologia 6 apresentaram rendimentos visivelmente maiores que os demais métodos empregados (Figura 15) para as três amostras avaliadas. Considerando o caule coletado, as frações alcaloidicas 3 e 5 foram menores que a fração 6, sendo observado $p\text{-value} < 0,05$ no teste F. Entretanto quando comparadas entre si, as frações 3 e 5 mostraram-se iguais estatisticamente ($p > 0,05$), para um nível de significância de 95%. Situação semelhante foi observada para as amostras de caule do subproduto e folha de subproduto, mostrando que os subprodutos da extração do óleo essencial de pau-rosa mantem o mesmo padrão de rendimentos observado no caule coletado.

Considerando as frações obtidas das três amostras para a metodologia 6, foi observado que as frações obtidas do caule coletado e do subprodutos do caule e da folha mostraram-se estatisticamente iguais ($p > 0,05$) para um nível de significância de 95%. Padrão semelhante foi observado para as metodologias 3 e 5.

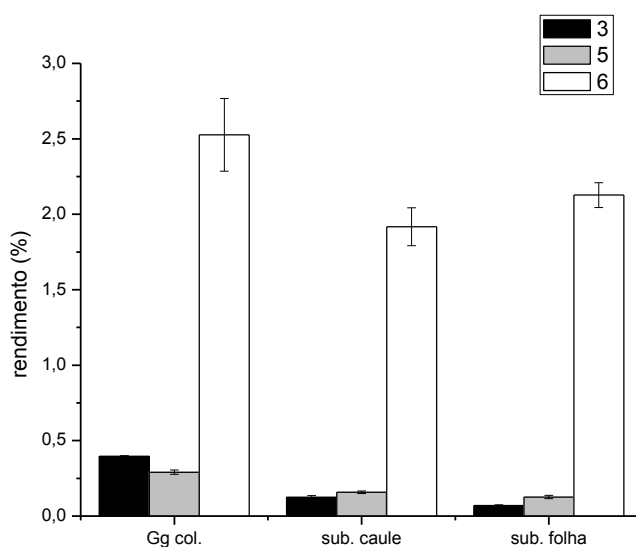


Figura 15: Rendimentos das frações alcaloídicas obtidas nas metodologias 3, 5 e 6 a partir dos galhos grossos coletados (Gg col.), do caule do subproduto industrial (sub. caule) e das folhas do subproduto industrial (sub. folha) respectivamente.

Embora o óleo essencial seja formado por substâncias voláteis, durante sua extração moléculas mais polares podem ter sido solubilizadas no vapor de água quente e pressurizado que atravessa o material vegetal diminuindo a quantidade de possíveis alcaloides nos resíduos. Outra possibilidade é que parte desses alcaloides tenha sido degradada devido à temperatura elevada.

Ao observar os espectros das frações alcaloídicas no modo *full scan* pôde-se verificar uma menor variedade de picos nos espectros obtidos na metodologia 3, tanto do caule coletado quanto das folhas e caules do subproduto industrial. Isto sugere que este método seja mais seletivo que os demais na obtenção de alcaloides (Figura 16). Entretanto, os picos detectados apresentaram intensidades variadas. Os íons $[M+H]^+$ observados com maior abundância relativa em ambas as frações foram m/z 204, 300 e 330.

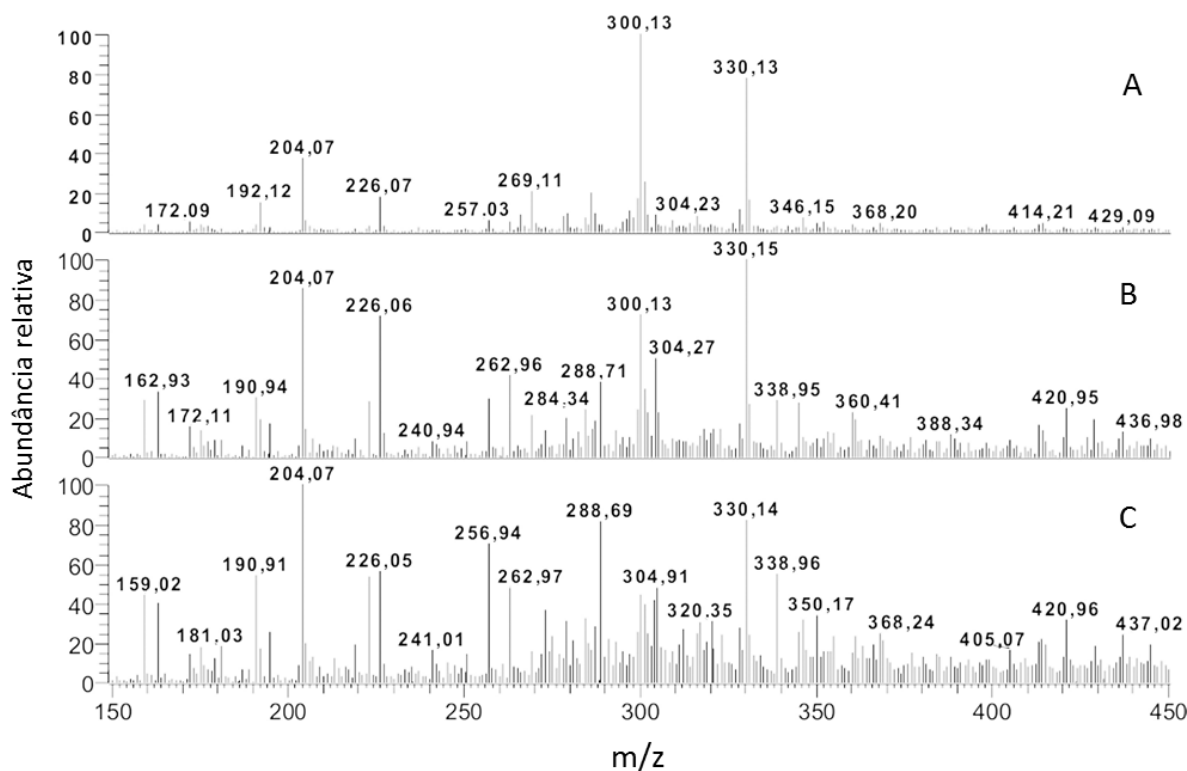


Figura 16: Frações obtidas respectivamente dos galhos grossos coletados (A), do caule do subproduto (B) e da folha do subproduto (C) pela metodologia 3, respectivamente.

Nas metodologias 5 e 6 os espectros mostraram-se mais complexos com vários íons $[M+H]^+$ pares e ímpares. Isto indica a presença, além de possíveis alcaloides, de outras substâncias que possuam afinidade pelos solventes utilizados nas extrações, mostrando menos especificidade dessas metodologias na obtenção de alcaloides.

Na metodologia 5, ocorreu situação inversa à observada na metodologia 3. O pico m/z 204 ($[M+H]^+$) foi observado com maior abundância relativa na fração obtida do caule coletado. A fração obtida do caule do subproduto apresentou os picos em m/z 204 e 300 ($[M+H]^+$) com menor intensidade que a fração obtida pela mesma metodologia para o caule coletado. O pico m/z 330 ($[M+H]^+$) mostrou-se bastante intenso tanto na fração obtida do caule coletado quanto na fração obtida do caule do subproduto. Os íons em m/z 300 e 330 ($[M+H]^+$) foram observados na fração obtida da folha do subproduto com abundância relativa baixa (Figura 17).

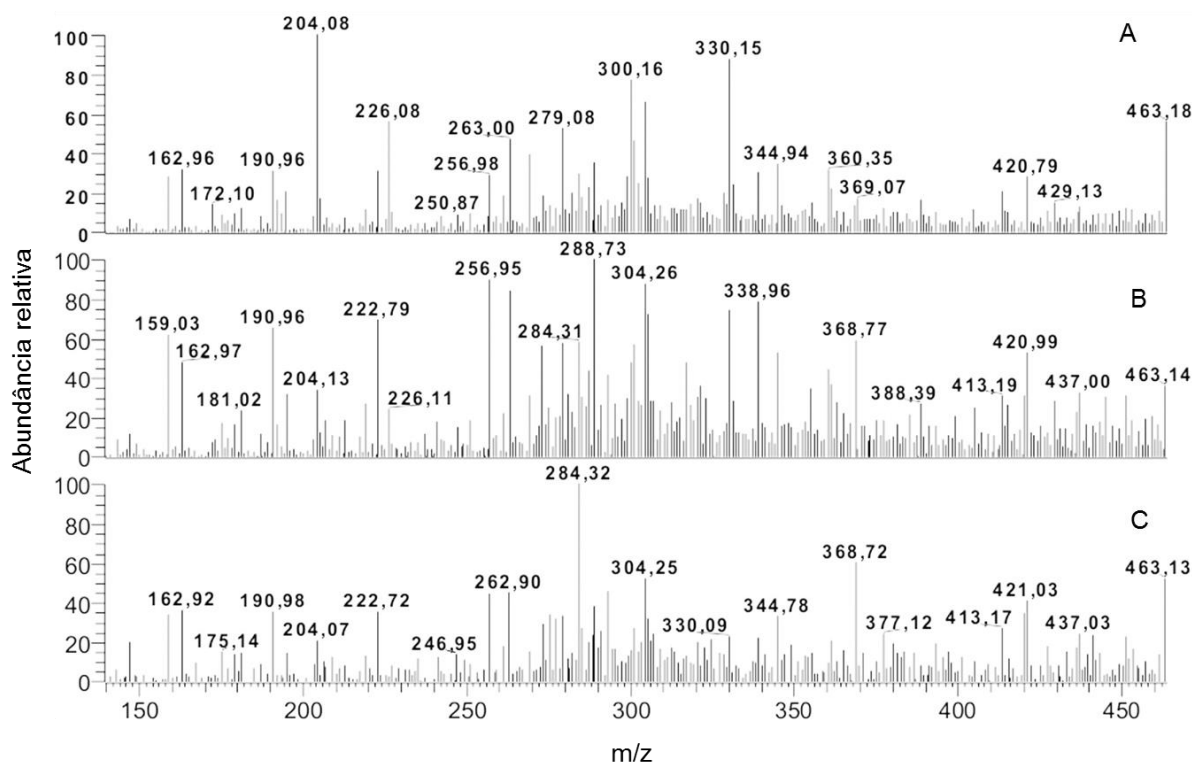


Figura 17: Frações obtidas respectivamente dos galhos grossos coletados (A), do caule do subproduto (B) e da folha do subproduto (C) pela metodologia 5, respectivamente.

A metodologia 6, embora seja a de maior rendimento, parece ter sido a menos seletiva para a extração de alcaloides entre as três selecionadas. Na fração obtida do caule coletado foram detectados os picos de m/z 204 e 330 ($[M+H]^+$) com maiores intensidades. Já nas frações obtidas da folha e do caule do subproduto, esses íons *quasi* moleculares foram detectados com abundâncias relativas baixas, menores que 40%. Isso sugere que a presença de outras substâncias nessas frações, com maior facilidade de ionização, esteja mascarando a presença destes picos nas frações obtidas dos subprodutos (Figura 18).

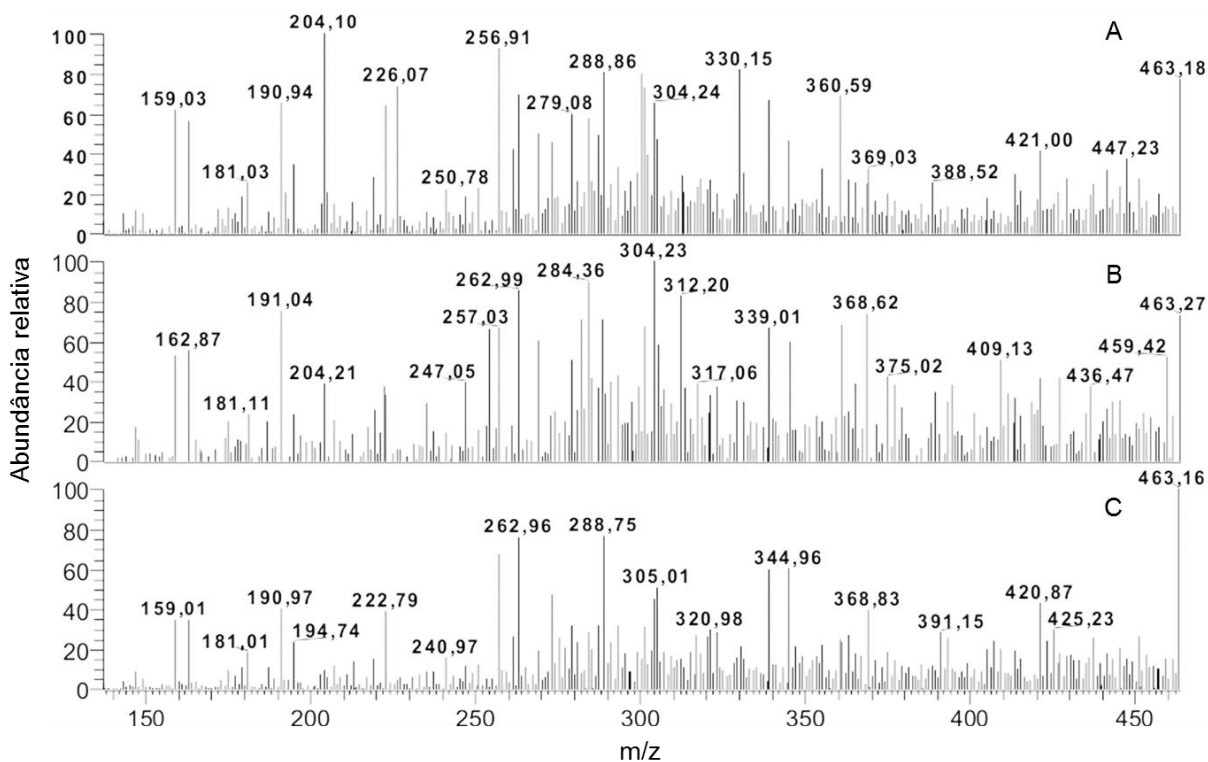


Figura 18: Frações obtidas respectivamente dos galhos grossos coletados (A), do caule do subproduto (B) e da folha do subproduto (C) pela metodologia 6, respectivamente.

É possível sugerir a identidade de alguns destes picos, como íon de m/z 204 ($[M+H]^+$), o qual é compatível com o íon *quasi* molecular ($[M+H]^+$) da anibina, alcaloide já relatado para essa espécie (Mors, Gottlieb e Djerassi, 1957). Em sua fragmentação foi possível detectar os íons filhos de m/z 187, 176, 172 e 104 (Figura 19).

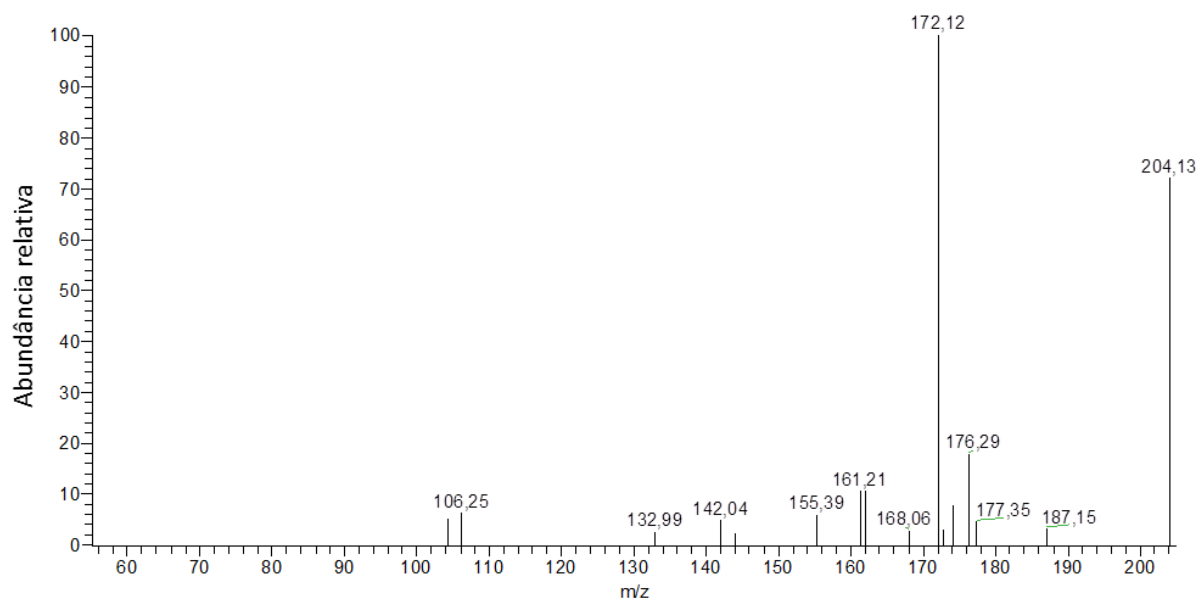


Figura 19: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon em m/z 204 ($[M+H]^+$), relativo à molécula da anibina.

Esta substância foi isolada da fração 5e foi analisada também por RMN de 1H (Figura 20).

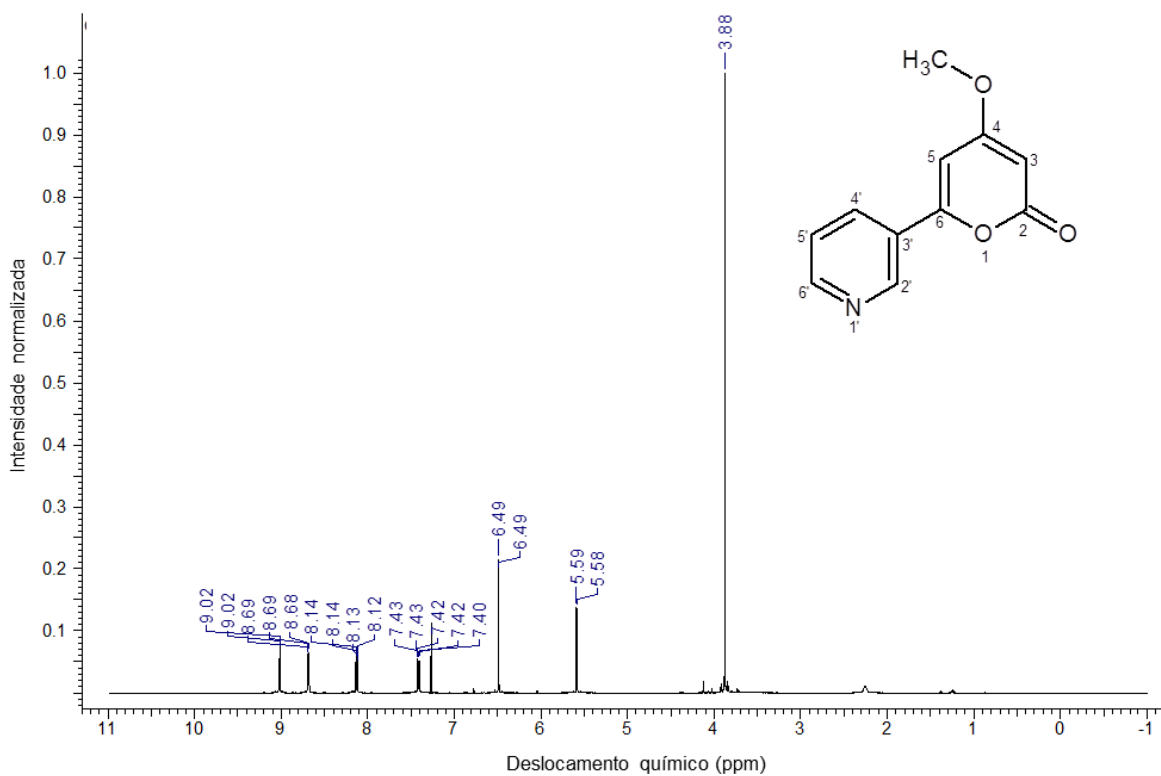


Figura 20: Espectro de RMN de 1H da anibina.

Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H foram compatíveis com dados obtidos da literatura sobre a síntese desta molécula (Dhavale, Aidhen e Shafique, 1989), confirmando sua estrutura (Tabela 5). Também foram feitas análises de RMN de ^{13}C , DEPT e bidimensionais (HMBC, COSY, HMQC), sendo os carbonos da estrutura atribuídos através de comparações entre os deslocamentos químicos e correlações observados nos espectros obtidos.

Tabela 5: Deslocamentos (δ) observados para a anibina e comparação com literatura.

C	δ (ppm) RMN ^{13}C , CDCl ₃ , 500MHz	δ (ppm) RMN ^1H , CDCl ₃ , 500MHz	δ (ppm) RMN ^1H (Dhavale, Aidhen e Shafique, 1989), CDCl ₃ , 90MHz
OCH ₃	56,5	3,80 s	4,00 (s, 3 H, OCH ₃)
C ₃	89,6	5,50 d	5,50 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, H ₃)
C ₅	99,5	6,40 d	6,50 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, H ₅)
C _{5'}	124,0	7,40 dd	7,35 (dd, $J = 8$ and 5 Hz, 1 H, H _{5'})
C _{4'}	133,6	8,10 m	8,10 (m, 1 H, H _{4'})
C _{6'}	151,7	8,67 dd	8,67 (dd, $J = 5$ and 1.5 Hz, 1 H, H _{6'})
C _{2'}	147,1	9,00 d	9,00 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, H _{2'})
C _{3'}	127,7		
C ₆	157,9		
C ₄	163,8		
C ₂	171,1		

O íon de m/z 286 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), compatível com o íon *quasi* molecular da coclaurina, alcaloide já relatado em *Ocotea duckei* (Da Silva *et al.*, 2002), foi também observado com intensidade baixa nas frações. Ao ser fragmentado, foi detectado o íon filho em m/z 269 com maior intensidade, além dos íons em m/z 237, 178, 175, 145, 143, 137 e 107 (Figura 21), os quais são compatíveis com dados de fragmentação para essa substância obtidos da literatura (Schmidt *et al.*, 2005).

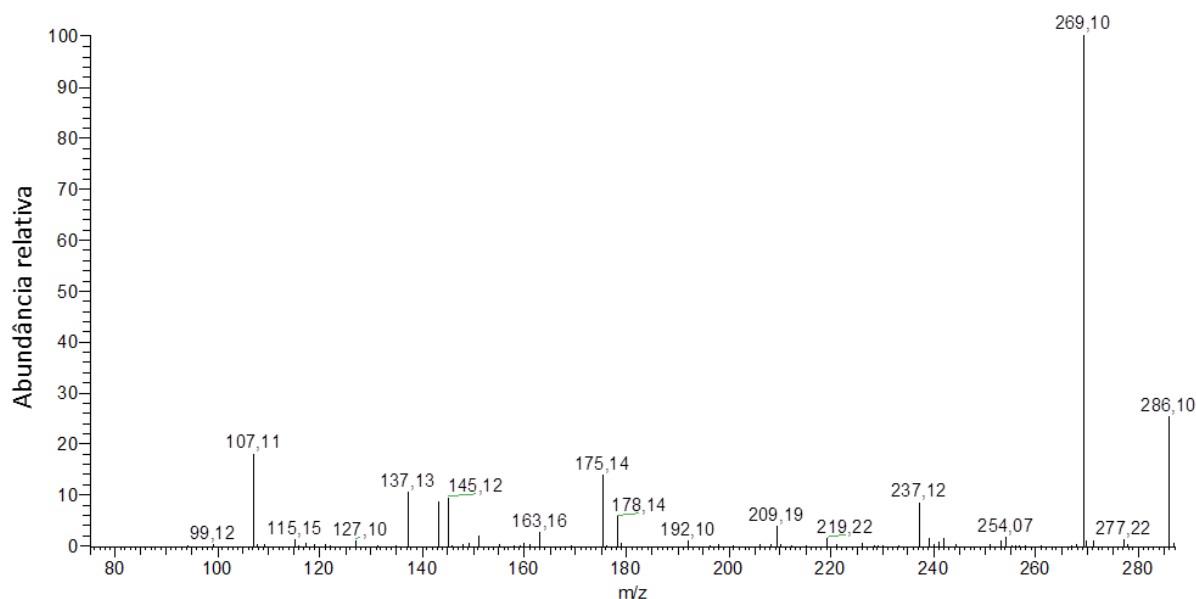


Figura 21: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon m/z 286 ($[M+H]^+$), relativo à molécula da coclaurina.

Outro íon observado foi o m/z 300 ($[M+H]^+$), compatível com o íon *quasi* molecular ($[M+H]^+$) da N-metilcoclaurina, alcaloide já relatado em *Aniba muca* (Bravo *et al.*, 1996) e também com os alcaloides (R)-(+)-noranicanina e (+)-canellilina, relatados para *A. canellila* (Oger *et al.*, 1993). No entanto, ao ser fragmentado, foram detectados os íons filhos em m/z 269, 237, 192, 175, 145, 143, 137 e 107 (Figura 22), os quais foram compatíveis com dados de fragmentação da N-metilcoclaurina obtidos da literatura (Schmidt *et al.*, 2005).

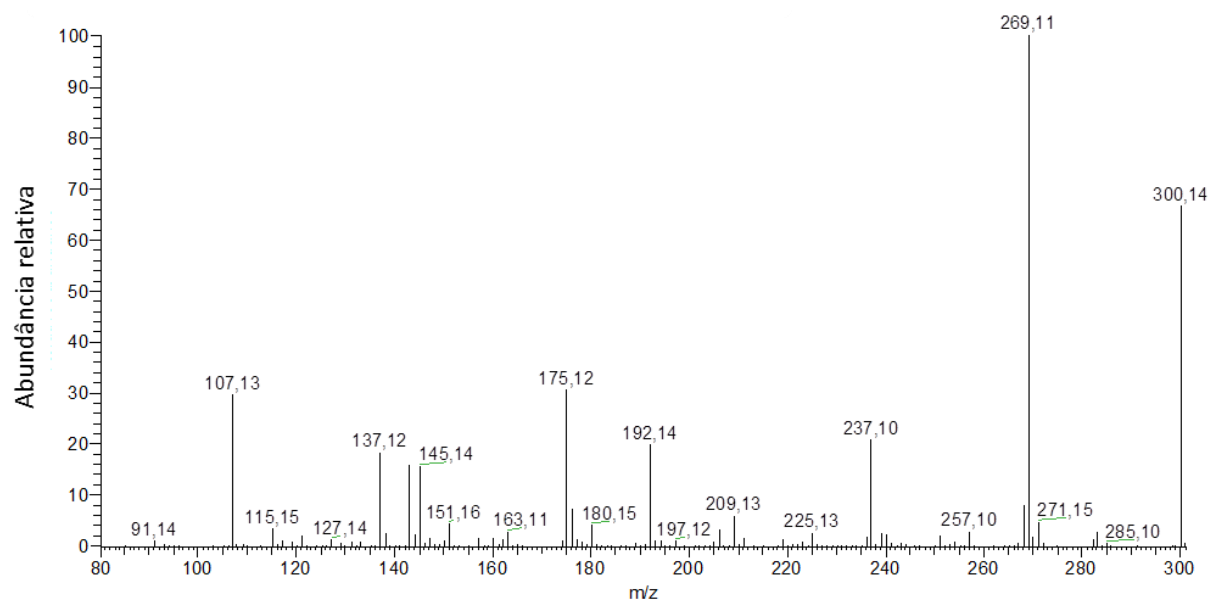


Figura 22: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon m/z 300 ($[M+H]^+$) 300, relativo à molécula da N-metilclaurina.

O íon de m/z 314 ($[M+H]^+$), compatível com a norboldina também foi observado. Dentre os íons filhos obtidos na sua fragmentação estão as razões m/z de 297, 265 e 237 (Figura 23), condizentes com dados de fragmentação relatados para este alcaloide (Wu *et al.*, 2010).

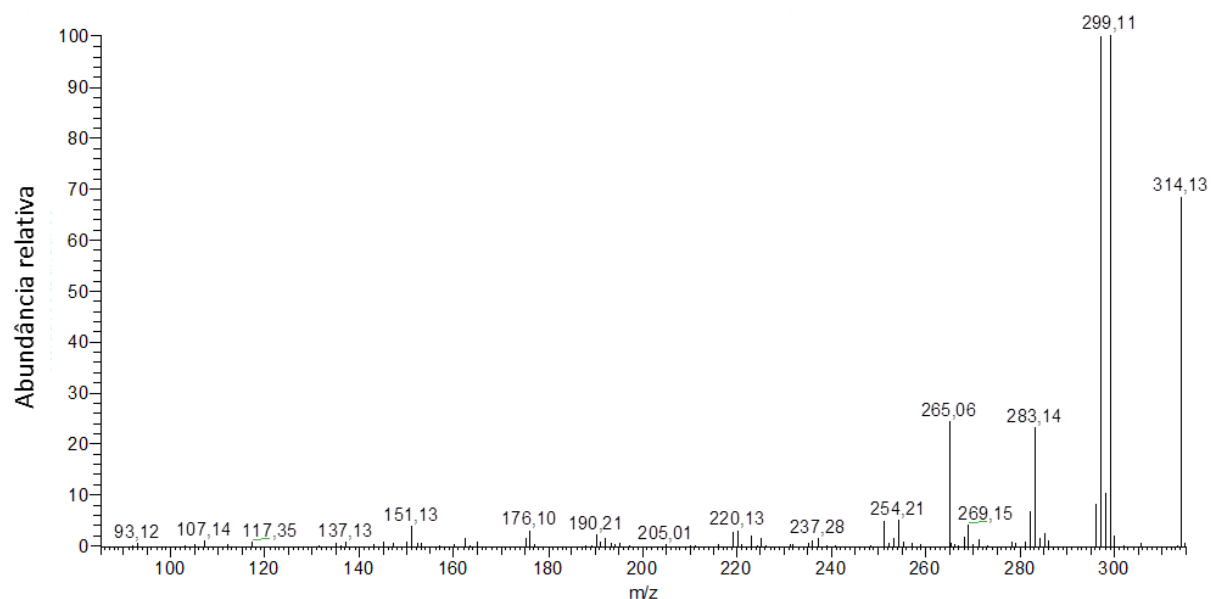


Figura 23: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon em m/z 314 ($[M+H]^+$), relativo à molécula da norboldina.

Outro íon observado foi o de m/z 328 ($[M+H]^+$), compatível com o íon *quasi* molecular ($[M+H]^+$) da boldina, um alcaloide aporfínico relatado em outras lauráceas como em *Ocotea puberula* (Zanin *et al.*, 2011) e *Laurus nobilis* (Pech e Bruneton, 1982). Quando fragmentado, foram detectados os íons filhos em m/z 297 e 265 (Figura 24), concordantes com dados da literatura sobre a fragmentação deste alcaloide (Wu *et al.*, 2010).

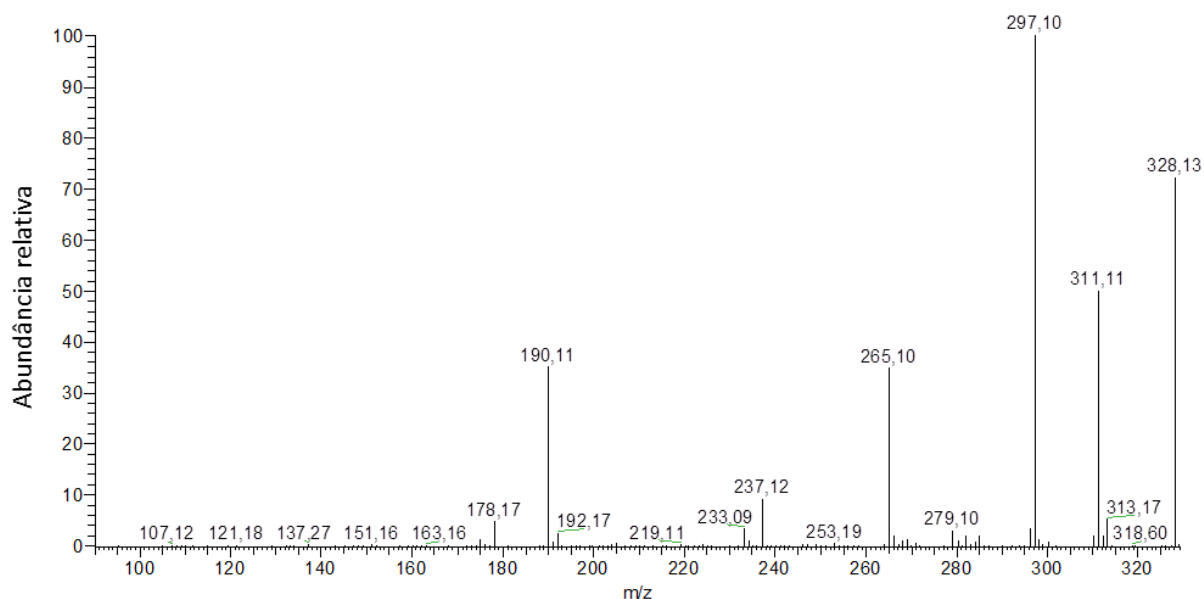


Figura 24: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon m/z 328 ($[M+H]^+$), relativo à molécula da boldina.

O íon de m/z 330 ($[M+H]^+$), observado nas frações obtidas, é compatível com o alcalóide reticulina, o qual já é relatado em *A. muca* (Bravo *et al.*, 1996) e *A. rosaeodora* (Ferreira, Gottlieb e Roque, 1980). Ao ser fragmentado foram gerados os íons filhos em m/z 299, 267, 192, 175 e 137 (Figura 25), sendo esses valores idênticos aos observados na literatura (Schmidt *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010). Potente efeito depressor do sistema nervoso central e um efeito depressor da pressão sanguínea em ratos para este alcaloide (Morais, Barbosa-Filho e Almeida, 1998; Dias *et al.*, 2004). Medeiros e colaboradores (2009) observaram que a reticulina induziu o vasorrelaxamento de anéis aórticos retirados de ratos através do bloqueio de canais de cálcio do tipo L.

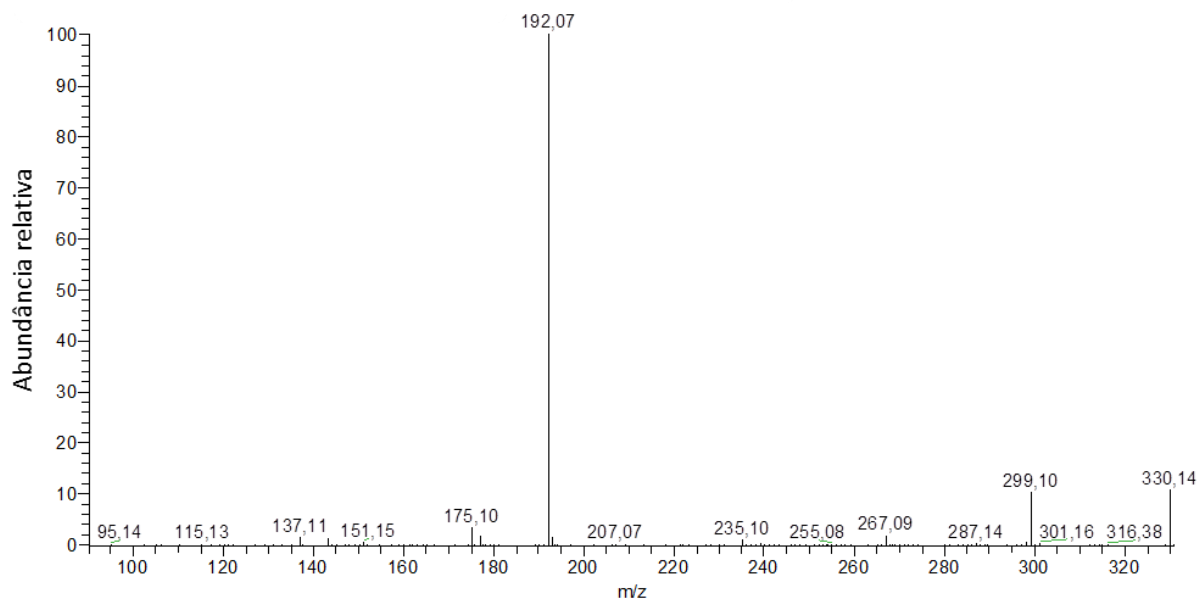


Figura 25: Espectro de massas com íons filhos observados na fragmentação do íon m/z 330 ($[M+H]^+$), relativo à molécula da reticulina.

As frações alcaloídicas obtidas do caule coletado e do caule do subproduto industrial foram também analisadas em espectrômetro de massas de alta resolução Q-Tof por inserção direta (Tabela 6). Foram detectadas as massas exatas compatíveis com os alcaloides sugeridos previamente. Os picos de mesmo valor observados nas análises mostraram tratar dos mesmos alcaloides presentes na diferentes frações com valores exatos próximos.

Tabela 6: Massas exatas obtidas para os possíveis alcaloides detectados nas análises por espectrometria de massas de alta resolução, nas frações obtidas dos galhos grossos pelas metodologias 3 (3), 5 (5) e 6 (6) e pelo subproduto caule pelas metodologias 3 (3c), 5 (5c) e 6 (6c).

alcaloide compatível	fração alcaloídica					
	3	5	6	3c	5c	6c
anibina	204,0675	204,0661	204,0665	204,0688	204,0677	204,0738
coclaurina	286,1427	286,1419	286,1423	286,1438	286,1429	286,1507
N-metilcoclaurina	300,1588	300,1584	300,1588	300,1597	300,1586	300,1666
norboldina	314,1430	314,1388	314,1390	-----	314,1386	-----
boldina	328,1554	328,1554	328,1545	328,1545	328,1545	328,1553
reticulina	330,1723	330,1713	330,1713	330,1710	330,1716	330,1726

Outros íons pares foram detectados em ambas as frações, indicando que podem apresentar outras substâncias. Entretanto, a presença de alcaloides em comum nas frações obtidas do material em natura e dos resíduos indica que este pode ser utilizado na obtenção de frações ricas em substâncias ativas como novos produtos.

6.3. Extrações com o subproduto líquido industrial (hidrolato):

6.3.1. Frações oleosas obtidas do subproduto líquido industrial (hidrolato)

As frações oleosas foram obtidas dos resíduos industriais líquidos (hidrolatos) 1, 2 e 3 por centrifugação apresentaram rendimentos 0,053%, 0,005% e 0,035% respectivamente. As análises em CG-DIC e CG-EM mostraram vários componentes em comum nas três remessas de hidrolatos avaliadas (Tabela 7).

Tabela 7: Componentes encontrados nas frações oleosas obtidas por centrifugação dos resíduos industriais líquidos (hidrolatos) 1, 2 e 3.

Substância	Hidrolato 1		Hidrolato 2		Hidrolato 3	
	IR	%	IR	%	IR	%
6-metil-5-hepta-2-ona	970	0,24	970	0,19	970	0,22
Limoneno	1016	0,11	1016	0,16		
1,8-cineol	1019	0,17	1019	0,28	1019	0,30
cis-óxido de linalol (furanoide)	1065	0,54	1065	0,65	1065	1,78
cis-óxido de linalol (piranoide)	1084	0,69			1084	1,91
Linalol	1100	62,93	1100	61,43	1099	56,70
trans-óxido de linalol (piranoide)	1159	0,15	1159	0,11		
α - terpineol	1188	7,75	1188	10,21	1188	13,89
Nerol	1225	2,91	1225	3,12		
Geraniol	1252	9,67	1252	10,94	1251	7,72
α - copaeno	1376	0,90	1376	0,94	1376	0,28
β - elemeno	1391	0,20	1391	0,21		
β - chamigreno	1477	0,35				
β - selineno	1488	1,36	1488	1,27	1488	0,47
α - selineno	1497	1,08	1497	1,01		
δ - cadineno	1524	0,26	1524	0,26		
E-nerolidol	1562	0,49	1562	0,37	1562	0,42
espatulenol	1576	0,21	1576	0,11	1576	0,54
neo-intermedeol	1662	0,54	1662	0,39	1662	0,41
benzoato de benzila	1760	2,21	1760	1,39	1760	1,66
Total identificado (%)		92,78		93,05		90,14

Dentre os componentes principais, o majoritário foi o linalol, com 62,93, 61,43 e 56,70% da composição da fração oleosa dos hidrolatos 1, 2 e 3, respectivamente, mostrando que o resíduo líquido apresenta grande quantidade de linalol. Essa alta porcentagem de linalol já era esperada uma vez que esta substância é o principal componente do óleo essencial (Maia *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2012). No hidrolato foi encontrado também o geraniol, como segunda substância em maior concentração com 9,67%, 10,94% e 7,72% nos hidrolatos. No óleo essencial o geraniol aparece em concentrações consideravelmente baixas de 0,1% a 1,8%. Outras substâncias também encontradas no óleo essencial estão presentes nos resíduos líquidos, tais como óxido de linalol, 1,8-cineol, α - copaeno e α - terpineol (Maia *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2012).

6.3.2. Subproduto líquido industrial (hidrolato) liofilizado

A partir do hidrolato liofilizado (240 mL) foram obtidos 13,9mg de amostra liofilizada. Essa amostra foi posteriormente analisada em espectrômetro de massa por inserção direta no modo positivo a fim de detectar íons de m/z compatíveis com os observados nas frações alcaloídicas obtidas previamente. O espectro de massas mostrou-se complexo, com a presença de várias m/z . Entretanto não foram observados os alcaloides presentes nas frações alcaloídicas (Figura 26).

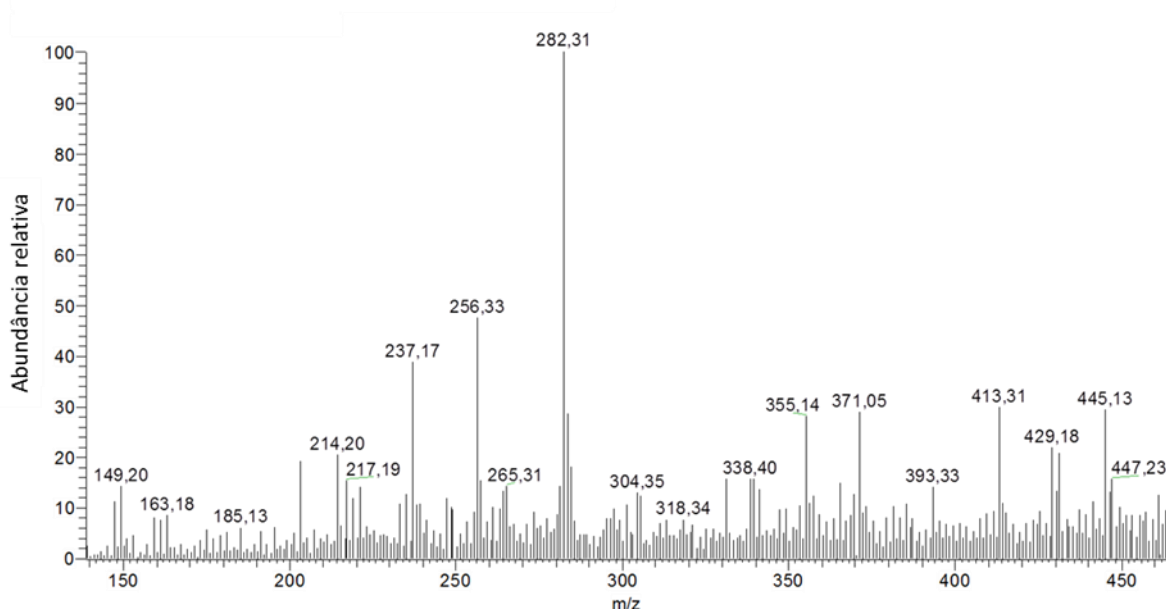


Figura 26: Espectro de massas obtido do hidrolato liofilizado.

6.3.3. Coluna de XAD-4 do subproduto líquido industrial (hidrolato)

Foram obtidas duas frações ao final da eluição da coluna de XAD-4 feita com o hidrolato (10L). As duas frações obtidas foram posteriormente analisadas em espectrômetro de massa por inserção direta no modo positivo a fim de detectar íons de m/z compatíveis com os observados nas frações alcaloídicas obtidas previamente. A primeira fração, etanólica,

apresentou aspecto oleoso e coloração amarelada e foi obtida com rendimento de 7,74g. Seu espectro de massas mostrou-se bastante complexo. Entretanto não foram detectados os alcaloides presentes nas frações alcaloídicas obtidas previamente a partir dos caules coletados e dos subprodutos industriais sólidos.

Já a fração obtida após a eluição de acetona e metanol apresentou aspecto pastoso, com coloração avermelhada, com rendimento de 0,21g. Seu espectro de massas também se mostrou complexo, mas com a faixa de m/z entre 600 e 1000 com menor intensidade que o observado na fração etanólica (Figura 27).

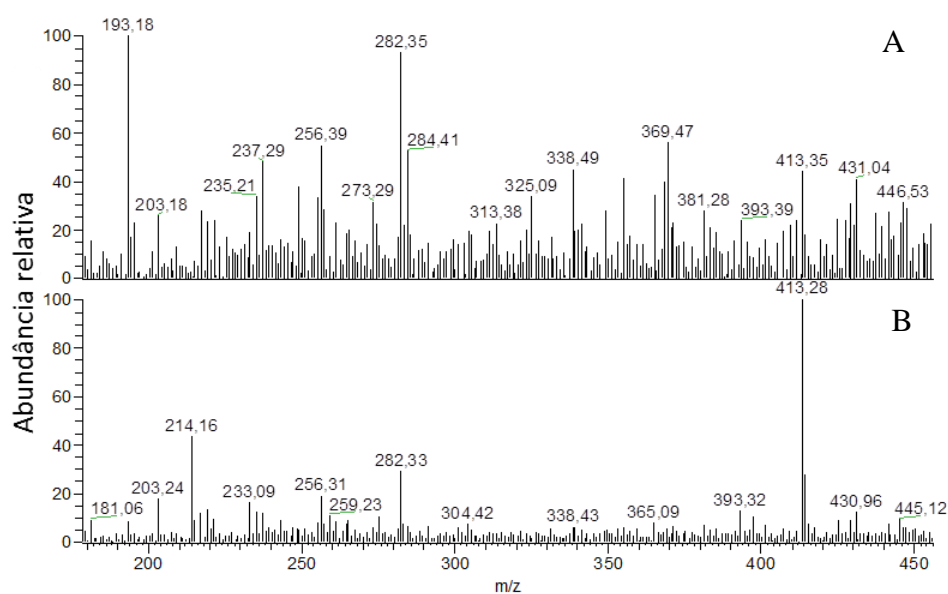


Figura 27: Frações etanólica (A) e em acetona e metanol (B) respectivamente, obtidas da coluna de XAD-4 feita com o hidrolato.

Os espectros de massa de ambas as frações obtidas do hidrolato sugerem a presença de moléculas além das presentes no óleo essencial. Comparando as frações obtidas através da liofilização do hidrolato e as frações obtidas através do experimento empregando a resina XAD-4, foram observados alguns íons comuns em ambas as amostras. Dentre eles foram observados os íons em m/z 256, 282 e 413 ($[M+H]^+$). Contudo são necessários estudos mais detalhados, bem como o aprimoramento da técnica empregada na identificação de moléculas presentes nessas amostras.

6.4 Ensaios de atividade biológica

6.4.1 Ensaios de citotoxicidade:

Nos ensaios de citotoxicidade as amostras foram diluídas em DMSO puro estéril, sendo a anibina testada na concentração única de 5 µg/mL, os extratos e óleos essenciais na concentração de 50 µg/mL e as frações alcaloídicas na concentração de 25 µg/mL.

Apenas as substâncias que apresentaram valores de inibição ≥ 75 % em pelo menos duas linhagens tumorais (elevado potencial citotóxico) foram selecionadas para avaliações subseqüentes, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

De um total de 19 amostras, 11 apresentaram elevado potencial citotóxico em pelo menos duas das três linhagens celulares testadas (Tabela 8). Dentre os extratos etanólicos avaliados foi observado elevado potencial citotóxico para os extratos dos galhos grossos coletados, dos galhos finos e do subproduto folhas nas três linhagens com percentual de inibição acima de 90%. O extrato de folhas coletadas e o extrato do subproduto caule foram ativos em duas linhagens apenas.

Foram avaliadas também as frações alcaloídicas obtidas das metodologias 3, 5 e 6 para o caule coletado, para caule e folhas do subproduto industrial. As frações em éter etílico (frações lipofílicas) obtidas pela metodologia 3 mostraram-se ativas, ao contrário das frações clorofórmicas, sugerindo a presença de substâncias de outras classes com atividade citotóxica em *Aniba rosaeodora*. Na metodologia 5, foi observado potencial citotóxico apenas para a amostra obtida do caule do resíduo, enquanto que na metodologia 6 todas as frações alcaloídicas mostraram elevado potencial citotóxico. A anibina, alcaloide isolado na metodologia 5 a partir do caule coletado não mostrou potencial citotóxico significativo, sendo o maior potencial de inibição de 23,69% frente a linhagem SF-295. Esse resultado sugere que o potencial citotóxico apresentado por algumas das frações avaliadas possa ocorrer devido aos outros alcaloides detectados nas frações analisadas (Tabela 8).

Tabela 8: Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais. Valores são média \pm DPM (Desvio Padrão da Média).

Amostras	HCT-116		OVCAR-8		SF-295	
	Média	DPM	Média	DPM	Média	DPM
extrato galhos grossos coletados	100,6	1,4	100,6	1,5	100,6	1,2
extrato galhos finos coletados	97,9	0,1	95,2	0,2	95,4	1,4
extrato cascas coletadas	61,3	12,0	93,4	0,3	60,5	5,6
extrato folhas coletadas	75,4	10,8	87,2	8,1	16,9	1,7
extrato subproduto-caule	51,9	7,8	98,8	0,1	100,2	0,2
extrato subproduto-folha	98,4	1,4	92,1	6,2	94,5	1,9
fração 3 (lipofílica)	76,9	7,6	100,1	0,4	54,1	6,3
fração 3	0,0	0,0	5,3	3,6	69,1	2,5
fração 3c (lipofílica)	97,0	0,2	100,9	1,3	100,5	0,1
fração 3c	0,0	0,0	13,8	9,8	14,7	0,7
fração 3f (lipofílica)	97,4	5,1	100,7	0,4	59,0	7,0
fração 3f	0,0	0,0	22,5	1,7	37,0	5,1
fração 5	64,9	6,3	30,5	4,0	36,0	3,1
fração 5c	77,8	4,5	100,9	0,8	48,2	3,1
fração 5f	63,2	6,9	96,0	5,0	49,8	0,1
fração 6	90,0	1,5	100,7	2,6	49,6	1,1
fração 6c	93,9	8,0	100,6	5,8	97,7	0,4
fração 6f	100,1	1,0	100,0	0,2	100,8	0,1
anibina isolada	2,5	3,5	8,3	1,8	23,7	6,1
doxorubicina (0,3 μ g/mL)	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0

Após o *screening* inicial, as amostras que apresentaram elevado potencial citotóxico foram avaliadas novamente para a determinação da CI_{50} . Dentre as amostras que apresentaram atividade na varredura inicial, os extratos dos galhos finos coletados, das folhas coletadas, do subproduto-folha e a fração alcaloídica 6 hemolisaram e por isso não tiveram suas CI_{50} determinadas. A atividade hemolítica é um ensaio de exclusão, logo as amostras com atividade hemolítica foram excluídas da determinação de CI_{50} (Tabela 9).

Tabela 9: Valores de CI_{50} e intervalo de 95% de confiança (IC95%) em $\mu\text{g/mL}$ das substâncias selecionadas em diferentes linhagens celulares no teste do MTT.

Amostras	Linhagens celulares - CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	HCT-116	SF-295	OVCAR-8	HL-60
extrato galhos grossos coletados	14,2 (13,1 - 15,3)	15,1 (12,8 - 17,8)	14,9 (12,2 - 18,2)	20,1 (15,0 - 26,9)
extrato subproduto-caule	10,1 (8,3 - 12,2)	11,7 (9,3 - 14,8)	9,3 (6,2 - 13,9)	14,4 (10,2 - 20,4)
fração 3c (lipofílica)	8,7 (7,4 - 10,2)	7,1 (4,8 - 10,4)	8,1 (5,0 - 12,9)	> 25
fração 3 (lipofílica)	14,2 (13,1 - 15,3)	19,4 (10,4 - 35,8)	> 25	> 25
fração 6c	8,8 (7,9 - 9,7)	11,0 (9,3 - 13,1)	10,2 (8,7 - 12,0)	7,5 (6,0 - 9,3)
fração 6f	8,0 (6,6 - 9,6)	8,3 (6,1 - 11,5)	6,2 (4,2 - 9,3)	6,8 (5,8 - 7,8)
fração 3f (lipofílica)	11,6 (9,3 - 14,3)	11,6 (9,3 - 14,6)	15,0 (11,9 - 18,9)	5,8 (3,9 - 8,7)
fração 5c	11,7 (8,3 - 16,5)	16,4 (10,5 - 25,5)	16,8 (13,5 - 20,9)	> 25

Dentre as amostras testadas para a determinação da CI_{50} , os extratos dos galhos grossos coletados e do subproduto - caule mostraram uma baixa atividade frente às linhagens tumorais analisadas com CI_{50} variando de 9,26 a 20,08 $\mu\text{g/mL}$. As frações 3c (lipofílica) e 3 (lipofílica) foram inativas frente a linhagem HL-60. Algumas frações mostraram um potencial citotóxico moderado frente a algumas linhagens tumorais, como é o caso das frações 3c (lipofílica) e 6f. Com relação à linhagem de células leucêmicas (HL-60), os compostos apresentaram pouco potencial citotóxico, com exceção de três (6c, 6f e 3f (lipofílica)) que mostraram ter uma atividade antiproliferativa relativamente elevada. O menor valor de CI_{50} foi observado para a fração 3f (lipofílica) com o valor de 5,8.

6.4.2 Atividade antimicrobiana

Os extratos etanólicos brutos, as frações alcaloídicas obtidas pelas metodologias 3, 5 e 6 dos subprodutos da extração de óleo essencial, os hidrolatos 1, 2 e 3 e a anibina foram

avaliados quanto ao seu potencial antimicrobiano frente a sete espécies Gram-positivas: *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (ATCC 6051), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ATCC 33591), *Streptococcus oralis* (*Streptococcus sanguis*) (ATCC 10557), *Streptococcus pyogenes* grupo A tipo 1 (ATCC 12344) e *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus faecalis*) (ATCC 14506); e três espécies Gram-negativas: *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (CDC EDL-933), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022).

Todas as cepas avaliadas foram resistentes aos extratos etanólicos brutos e hidrolatos 1, 2 e 3 avaliados. As frações alcaloídicas apresentaram atividade apenas frente ao *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (CT) ATCC6051, na concentração de 10 mg/mL, com halos de inibição de 10 mm de diâmetro, com exceção da fração 6f.

O alcaloide anibina também foi avaliado quanto a sua atividade antimicrobiana e mostrou-se ativo frente ao *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (CT) ATCC6051 com CIM (concentração inibitória mínima) de 1 µg/mL, que foi a maior concentração avaliada na obtenção da CIM. Esses resultados indicam a possibilidade da atividade antimicrobiana observada nas frações estar relacionada a presença da anibina nessas frações (Tabela 10).

7. Conclusões

Por fim, foram obtidas algumas conclusões ao final deste estudo. Sobre as metodologias de extração de alcaloides:

- O maior rendimento foi observado na metodologia 6;
- A metodologia 3 mostrou-se mais seletiva na extração de alcaloides, apresentando um perfil menos complexo;
- A metodologia 3 provavelmente apresenta maior facilidade na purificação desses alcaloides devido sua maior seletividade e menor complexidade;
- Entretanto, se otimizada sua purificação, a metodologia 6 mostra-se uma alternativa melhor, devido ao seu elevado rendimento.

Sobre os alcaloides observados:

- Os alcaloides anibina, duckeina, reticulina, N-metilcoclaurina, coclaurina, boldina e norboldina foram detectados tanto nos galhos grossos coletados quanto nos subprodutos industriais;
- Anibina, N-metilcoclaurina e reticulina foram detectados com maior abundância relativa.
- Os alcaloides N-metilcoclaurina, coclaurina, boldina e norboldina são inéditos em *Aniba rosaeodora* Ducke, sendo realçados em outras espécies da família Lauraceae;

Com relação aos ensaios biológicos:

- As amostras obtidas pela metodologia 6 dos subprodutos (caule e folha) e a fração lipofílica da metodologia 3 obtida do subproduto-folha apresentaram maior potencial citotóxico, com os menores valores de CI_{50} observados;
- As frações alcaloídicas e o alcaloide piridínico anibina foram ativos frente ao *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (CT) ATCC6051.

Várias dos alcaloides detectados no presente estudo já apresentam relatos de atividades biológicas, ressaltando a importância de se estudar este subproduto. As análises dos subprodutos mostraram a presença dos alcaloides encontrados nos galhos grossos coletados, substâncias que podem agregar valor a um material que atualmente é descartado ou utilizado como combustível em caldeiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Illinois: Allured Business Media, 2009.

ADLER, L. S.; KARBAN, R.; STRAUSS, S. Y. Direct and indirect effects of alkaloids on plant fitness via herbivory and polination. **Ecology**, v. 82, n. 7, p. 2032-2044, 2001.

AGUIAR, L. M. G. et al. Cecilin, a 1-benzyl- β -carboline from *Aniba santalodora*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 8, p. 1859-1860, 1980.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 3. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

AMBERLITE. **Product data sheet**. Rohm & Haas Company, 2003. 4.

APERS, S.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Lignans and neolignans as lead compounds. **Phytochemistry Reviews**, v. 2, n. 3, p. 201-217, 2003.

ARAÚJO, F. L. et al. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, n. 4, p. 337-344, 2009.

BERRIDGE, M. V. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, n. 4, p. 14-19, 1996.

BIAN, J. et al. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. **BioresourceTechnology**, v. 127, p. 236-241, 2013.

BIERI, S. et al. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 439-447, 2006.

BRAVO, J. A. et al. Alcaloides de la *Aniba muca*. **Revista Boliviana de Química**, v. 13, n. 1, p. 19-22, 1996.

BREKKE, O. L. et al. Opium alkaloids, morphine extraction from domestically grown opium poppy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, n. 12, p. 927-929, 1958.

BRITTON, R. et al. Granulatimide and 6-bromogranulatimide, minor alkaloids of the Brazilian ascidian *Didemnum granulatum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 2, p. 254-255, 2001.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 594.

CARVALHO, J. C. B. et al. Pyrrolizidine alkaloids in two endemic capeverdian *Echium* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, n. 0, p. 1-6, 2013.

CATANEO, C. B. et al. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 93-101, 2008.

CATÃO, R. M. R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Revista brasileira de Análises clínicas**, v. 37, n. 4, p. 247-249, 2005.

CHEN, Q. et al. Identification and quantification of active alkaloids in *Catharanthus roseus* by liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 845-852, 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006. 453.

CORNELL, H. V.; HAWKINS, B. A. Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory. **The American Naturalist**, v. 161, n. 4, p. 507-22, Apr 2003.

CSEKE, L. J. et al. **Natural products from plants**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

CURSINO, L. M. C. et al. Antibacterial activity of *Minquartia guianensis* extracts and phytochemical evaluation. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 23, n. 6, p. 505-510, 2011.

D'ACAMPORA ZELLNER, B. et al. Evaluation of leaf-derived Eextracts as an environmentally sustainable source of essential oils by using gas chromatography–mass spectrometry and enantioselective gas chromatography–olfactometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 883-890, 2006.

DA SILVA, I. G. et al. Coclaurine from *Ocotea duckei*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 9, p. 881-883, 2002.

DE ALMEIDA, R. N. et al. Rosewood oil induces sedation and inhibits compound action potential in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 440-443, 2009.

DE BARROS CORRÊA, D.; GOTTLIEB, O. R. Duckein, an alkaloid from *Aniba duckei*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 1, p. 271-272, 1975.

DE DOBBELEER, C. et al. A high-rate perfusion bioreactor for plant cells. **Biotechnology Bioengineering**, v. 95, n. 6, p. 1126-1137, 2006.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

DE MELO, C. T. et al. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p.451-454, 2006.

DE OLIVEIRA, L. M.; BARBOZA, M. Separation of cephalosporins using ionic and neutral polymeric resins. Bioengineering (ENBENG), 2012 IEEE 2nd Portuguese Meeting in, 2012, 23-25, p.1-6, 2012.

DE SOUSA, F. C. et al. Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) in anxiety models in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p.1212-1216, 2007.

DE VASCONCELOS, M. C. B. M. et al. Study of composition, stabilization and processing of wheat germ and maize industrial by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 0, p. 292-298, 2013.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. 539.

DHAVALÉ, D. D.; AIDHEN, I. S.; SHAFIQUE, M. Acyl anion equivalents in the synthesis of 2H-pyran-2-ones: an efficient synthesis of anibine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 3985-3987, 1989.

DI LEO LIRA, P. et al. Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 259-264, 2009.

DIAS, K. L. G. et al. Cardiovascular Effects Induced by Reticuline in Normotensive Rats. **Planta Medica**, v. 70, n. 04, p. 328-333, 2004.

DING, Y. et al. Adsorption and Enrichment of Alkaloids from Areca Nut by Means of Macroporous Resins. **Adsorption Science & Technology**, v. 30, n. 3, p. 193-204, 2012.

DJILANI, A. et al. New extraction technique for alkaloids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 518-520, 2006.

DOS SANTOS, E. T. et al. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 8496-516, 2013.

DUOSS-JENNINGS, H. A. et al. Effect of citrus byproducts on survival of O157:H7 and non-O157 *Escherichia coli* serogroups within in vitro bovine ruminal microbial fermentations. **International Journal of Microbiology**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. **Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology**. Weinheim:: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.

FERREIRA, J. F. S.; ZHELJAZKOV, V. D.; GONZALEZ, J. M. Artemisinin concentration and antioxidant capacity of *Artemisia annua* distillation byproduct. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 294-298, 2013.

FERREIRA, Z. S.; GOTTLIEB, O. R.; ROQUE, N. F. Chemosystematic implications of benzyltetrahydroisoquinolines in *Aniba*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 8, n. 1, p. 51-54, 1980.

FIDELIS, C. H. V. et al. Correlation between maturity of tree and GC x GC-qMS chemical profiles of essential oil from leaves of *Aniba rosaeodora* Ducke. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 73-77, 2013.

FOSSEN, T. et al. Flavonoids from blue flowers of *Nymphaea caerulea*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1133-1137, 1999.

FRANCA, N. C.; GOTTLIEB, O. R.; SUAREZ, A. M. P. 6-phenylethyl-5,6-dihydro-2-pyrones from *Aniba gigantifolia*. **Phytochemistry**, v. 12, n. 5, p. 1182-1184, 1973.

GONCALVES, N. B.; CORREA FO, J. C.; GOTTLIEB, O. R. Analeptic Action of Anibine. **Nature**, v. 182, n. 4640, p. 938-939, 1958.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the lauraceae. **Phytochemistry**, v. 11, n. 5, p. 1537-1570, 1972.

GRYCOVÁ, L.; DOSTÁL, J.; MAREK, R. Quaternary protoberberine alkaloids. **Phytochemistry**, v. 68, n. 2, p. 150-175, 2007.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MEDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GURUDEEBAN, S.; RAMANATHAN, T.; SATYAVANI, K. Antimicrobial and radical scavenging effects of alkaloid extracts from *Rhizophora mucronata*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 47, n. 1, p. 50-53, 2013.

HARBONE, J. B. **Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis**. London: Chapman and Hall, 1998.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., *et al* (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade UFRS/ Ed. da UFSC, 1999. p.641 - 656.

HOULIHAN, W. J. **Part One. In: The chemistry of heterocycle compounds: a series of monographs**. Taylor: Wiley-Interscience, 1972. 587 p.

HSIEH, T.-J. *et al*. Actinodaphnine induces apoptosis through increased nitric oxide, reactive oxygen species and down-regulation of NF- κ B signaling in human hepatoma Mahlavu cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 344-354, 2006.

HUANG, R. L. *et al*. Antitumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. **Planta Medica**, v. 64, n. 3, p. 212-215, 1998.

IBAMA. Instrução Normativa nº 09, de 25 de agosto de 2011. p. 1-3, 2011.

JAYASURIYA, H. et al. Isolation and structure of antagonists of chemokine receptor (CCR5). **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 6, p. 1036-1038, 2004.

JIANG, L. et al. Characterization and Activity of Anthocyanins in Zijuan Tea (*Camellia sinensis* var. *kitamura*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 13, p. 3306-3310, 2013.

JORDAN, M. J. et al. Introduction of distillate rosemary leaves into the diet of the. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8265-8270, 2010.

KLAUSMEYER, P. et al. A Novel Antimicrobial Indolizinium Alkaloid from *Aniba panurensis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 10, p. 1732-1735, 2004.

KLIVANA, M.; LEGROS, R.; JOLICOEUR, M. In situ extraction strategy affects benzophenanthridine alkaloid production fluxes in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 3, p. 280-289, Feb 5 2005.

KOHN, L. K. et al. In vitro antiviral activity of Brazilian plants (*Maytenus ilicifolia* and *Aniba rosaeodora*) against bovine herpes virus type 5 and avian metapneumovirus. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 10, p. 1269-1275, 2012.

KOULMAN, A. et al. High-throughput direct-infusion ion trap mass spectrometry: a new method for metabolomics. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 3, p. 421-428, 2007.

LE GOFF, G. et al. Isolation and characterization of unusual hydrazides from *Streptomyces* sp. impact of the cultivation support and extraction procedure. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 2, p. 142-149, 2013.

LEBOEUF, M. et al. Isolement de l'higénamine a partir de l'*Annona squamosa*; interet des résines adsorbantes macromoléculaires en chime végétale extractive. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 1, p. 53-60, 1981.

LEE-PARSONS, C. W. T.; SHULER, M. L. The effect of ajmalicine spiking and resin addition timing on the production of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* cell cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 408-415, 2002.

LIANG, Q. et al. Florets of sunflower (*Helianthus annuus* L.): potential new sources of dietary fiber and phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 14, p. 3435-3442, 2013.

LLORACH, R. et al. Valorization of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) by-products as a source of antioxidant phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2181-2187, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 584.

LUO, J. et al. Multicomponent Therapeutics of Berberine Alkaloids. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2615-2617, 1987.

MACHADO, P. A. et al. Recovery of solanesol from tobacco as a value-added byproduct for alternative applications. **Bioresource an Technology**, v.101, n. 3, p.1091-1096, 2010.

MAIA, J. G. S. et al. Plant sources of amazon rosewood oil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1906-1910, 2007.

MANDALARI, G. et al. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 83-89, 2010.

MARQUES, C. A. A importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MEDEIROS, M. A. et al. (S)-reticuline induces vasorelaxation through the blockade of L-type Ca(2+) channels. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 379, n. 2, p. 115-125, 2009.

MITCHELL, R. H.; SCOTT, W. A.; WEST, P. R. The extraction of caffeine from tea. **Journal of Chemical Education**, v. 51, n. 1, p. 69, 1974.

MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 57-61, 1998.

MORS, W. B.; GOTTLIEB, O. R. Anibine, the alkaloid of Coto bark. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 18, p. 185-187, 1959.

MORS, W. B.; GOTTLIEB, O. R.; DJERASSI, C. The chemistry of rosewood. isolation and structure of anibine and 4-methoxyparacotoin¹. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 16, p. 4507-4511, 1957.

MORS, W. B.; MAGALHÃES, M. T.; GOTTLIEB, O. R. The chemistry of the genus *Aniba*. X. *Aniba fragrans* Ducke, a valid species. **Anais de Associação Brasileira de Química**, v. 19, p. 193-197, 1960.

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

NAVARRETE, A. et al. Valorization of solid wastes from essential oil industry. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 2, p. 196-201, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NGOUMFO, R. M. et al. In vitro cytotoxic activity of isolated acridones alkaloids from *Zanthoxylum leprieurii* Guill. et Perr. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 10, p. 3601-3605, 2010.

NGUYEN, V. H.; NGUYEN, V. T. Aporphine alkaloids from *Phoebe chinensis* (Lauraceae) growing in Vietnam. **Tap Chi Hoa Hoc**, v. 42, p. 205-209, 2004.

NIETO MARTÍNEZ, G. Incorporation of by-products of rosemary and thyme in the diet of ewes: effect on the fatty acid profile of lamb. **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 2, p. 379-389, 2013.

NØRBÆK, R.; NIELSEN, J. K.; KONDO, T. Flavonoids from flowers of two *Crocus chrysanthus-biflorus* cultivars: "Eye-catcher" and "Spring Pearl" (Iridaceae). **Phytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1139-1146, 1999.

OGER, J.-M. et al. Nouveaux alcaloïdes isoquinoléiques isolés d'une Lauraceae bolivienne: *Aniba canelilla* H.B.K. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 71, n. 8, p. 1128-1135, 1993.

OGER, J. M. et al. (R)-(+)-noranicanine a new type of trioxygenated benzylisoquinoline isolation and synthesis. **Heterocycles**, v. 34, n. 1, p. 17-20, 1992.

OHASHI, S. T.; ROSA, L. S. Pau-rosa *Aniba rosaeodora* Ducke. **Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia**, n. 4, p. 1-2, 2004.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PABON, L. C.; CUCA, L. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 875-879, 2010.

PECH, B.; BRUNETON, J. Alcaloïdes du laurier noble, *Laurus nobilis*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 5, p. 560-563, 1982.

PIERI, F. A. et al. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1797-1801, 2010.

RAHMAN, P. et al. Cytotoxic and antimicrobial activities of alkaloids from *Dehaasia kurzii* King stem bark. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 17, n. 1, p. 25-31, 1988.

ROCHA, N. R. D. A. F. et al. Ethanol production from agroindustrial biomass using a crude enzyme complex produced by *Aspergillus niger*. **Renewable Energy**, v. 57, p. 432-435, 2013.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROUSH, R. A.; COOKS, R. G. Characterization of Alkaloids and Other Secondary Metabolites by Multiple Stage Mass Spectrometry. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 2, p. 197-214, 1984.

SALVACHUA, D. et al. Sugar recoveries from wheat straw following treatments with the fungus *Irpex lacteus*. **Bioresource and Technology**, v. 131, p. 218-225, 2013.

SAMPAIO, L. D. F. S. et al. Linalool from rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) oil inhibits adenylate cyclase in the retina, contributing to understanding its biological activity. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 1, p. 73-77, 2012.

SAMPAIO, P. T. B. et al. Biomassa da rebrota de copas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em plantios sob sombra parcial em floresta primária. **Acta Amazonica**, v. 35, n. 4, p. 491-494, 2005.

SAMPAIO, P. T. B.; FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, I. L. C. *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae). **Manual de Sementes da Amazônia**, v. 3, p. 1-8, 2003.

SAMPAIO, P. T. B. et al. Avaliação rebrota da copa das árvores de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em sistema de podas sucessivas. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 1, p. 55-60, 2007.

SANDHU, A. K.; GU, L. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins from muscadine (*Vitis rotundifolia*) juice pomace by use of macroporous adsorbent resins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 7, p. 1441-1448, 2013.

SANTOS, A. S. **Óleos essenciais: Uma abordagem Econômica e Industrial**. Rio de Janeiro: Interciências, 2011. 386.

SCHMIDT, J. et al. Analysis of benzyloquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 11, n. 3, p. 325-33, 2005.

SHRIKHANDE, A. J. Wine by-products with health benefits. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2000.

SILVA, E. M. et al. Improving the desorption of *Inga edulis* flavonoids from macroporous resin: towards a new model to concentrate bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, In press, 2012.

SILVA, F. M. A. D. et al. Desrepliação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. **Química Nova**, v. 35, p. 944-947, 2012.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Anti-inflammatory and antimicrobial properties of pyrroloquinazoline alkaloids from *Adhatoda vasica* Nees. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 441-445, 2013.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOARES, M. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

ŞÖHRETOĞLU, D. et al. Iridoids, monoterpenoid glucoindole alkaloids and flavonoids from *Vinca major*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 49, n. 0, p. 69-72, 2013.

SOUSA, F. C. et al. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.78, n. 1, p.27-33, 2004.

SOUZA, K. S. et al. Atividade biológica de extratos, hidrolatos e óleos voláteis de pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do linalol no hidrolato de folhas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

STEVIGNY, C. et al. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Cassipouira filiformis*. **Planta Medica**, v. 68, n. 11, p. 1042-1044, 2002.

STÉVIGNY, C. et al. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 18, n. 5, p. 523-528, 2004.

TAVARES, V. B. et al. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 722-725, 1998.

The Plant List. Version 1., 2010. Disponível em: < <http://www.theplantlist.org/> >. Acesso em: 08/03/2013.

TORRES, J. L.; BOBET, R. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v.49, n. 10, p.4627-4634, 2001.

VALLI, V. et al. Sugar cane and sugar beet molasses, antioxidant-rich alternatives to refined sugar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 51, p. 12508-12515, 2012.

WICZKOWSKI, W.; SZAWARA-NOWAK, D.; TOPOLSKA, J. Red cabbage anthocyanins: profile, isolation, identification, and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 303-309, 2013.

- WOLTER FILHO, W. et al. Alcalóides de *Peschiera affinis* (Muell. Arg.) Miers (Apocynaceae). **Acta Amazonica**, v. 15, n. 1-2, p. 193-197, 1985.
- WU, T.-S. Murrayamine-A,-B,-C and (+)-mahanine, carbazole alkaloids from *Murraya euchrestifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 3, p. 1048-1051, 1991.
- WU, Y. J. et al. Development of the fingerprint for the quality of Radix Linderae through ultra-pressure liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 17-18, p. 2734-2742, 2010.
- XIE, S. et al. Systematic identification and quantification of tetracyclic monoterpenoid oxindole alkaloids in *Uncaria rhynchophylla* and their fragmentations in Q-TOF-MS spectra. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 81-82, p. 56-64, 2013.
- YAMANAKA, H. T. **Sucos cítricos**. São Paulo: CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 2005. 45.
- ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 30, n.1, p. 92-98, 2007.
- ZANIN, S. M. W. et al. Seedlings of *Ocotea puberula* (Lauraceae): Identification and monitoring of aporphinoid alkaloids. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 743-747, 2011.
- ZHANG, W. et al. Antibacterial, antifungal and cytotoxic isoquinoline alkaloids from *Litsea cubeba*. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12950-12960, 2012.
- ZHANG, Y. et al. Optimization of nobiletin extraction assisted by microwave from orange byproduct using response surface methodology. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 153-159, 2013.

ANEXO 1

ANEXO 2

Lauraceae alkaloids

Dayana Lacerda Custódio and Valdir Florêncio da Veiga Junior

Covering up to the beginning of 2013

1 Introduction

2 Isoquinoline alkaloids

3 Indole alkaloids

4 Pyridine alkaloids

5 Other classes of alkaloids

6 Conclusion

7 References

Lauraceae is one of the most representative botanical families, presenting 67 genera with over 2,500 species, and more than 300 different alkaloids reported, mainly isoquinolines. Its diversity and relevance to chemosystematic relationships is presented and discussed.

1 Introduction

The Lauraceae botanical family has a tropical and subtropical distribution, concentrated in Asian and American rain forests, including about 67 genera with over 2,500 species. It is found particularly in countries with biodiversity hot spots. Brazil, for example, has a great representative number of species, with approximately 25 genera and 400

Lauraceae species. Lauraceae is considered one of the most important families in the floristic composition in some of its forest ecosystems.^{1,2}

Several Lauraceae species have been used in the manufacture of various products with great economic value, in areas such as the food and wood industries, for example *Ocotea porosa*, the popular “Imbuia” and *Ocotea odorifera*, known as “Sassafras”. Additional, natural products found in species such as *Aniba rosaeodora*, with an essential oil rich in linalool, an excellent perfume fixative, possess high economic value in international markets.³⁻⁶

However, some species have their use restricted to traditional communities, who have empirical knowledge about the use of these plants.⁷ Many neolignans have been described in this family, and these substances have been used as lead compounds for new drug development.⁸ Together with neolignans and essential oils, this family presents several alkaloids, with isoquinolines as the main class reported in the literature.^{9,10}

The isoquinoline alkaloids are formed from the amino acid tyrosine by consecutive reactions forming the tetrahydroisoquinoline core (**1**) and have a great importance due several pharmacological activities described to the benziltetrahydroisoquinoline (**2**), aporphine (**3**), and pavinine (**4**) skeletons. Another alkaloid group present in Lauraceae are the indole alkaloids, which have benzopyrrolic structures where the indole (**5**) core is formed by the fusion of benzene and pyrrole rings at positions 2 and 3. When this link occurs at positions 3 and 4 of the pyrrole ring, the formation of the isoindole (**6**) core occurs. The structure numbering starts at the atom near the pyrrole ring junction, followed by other atoms around the indolic core.¹¹ The pyridine alkaloids, also found in this family, present a pyridine (**7**) ring that originates from nicotinic acid.¹² The alkaloid cores observed in Lauraceae are presented in Fig. 1.

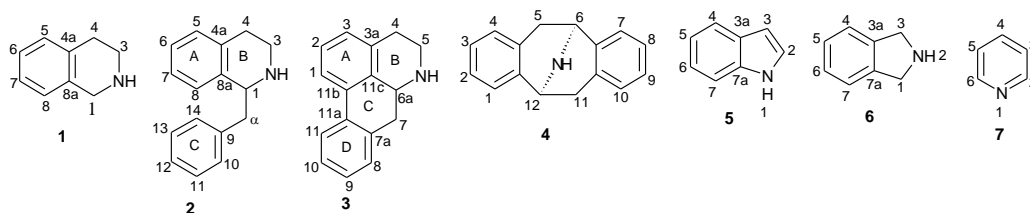


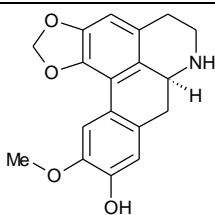
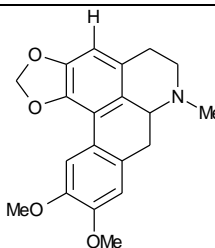
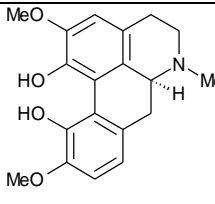
Fig. 1

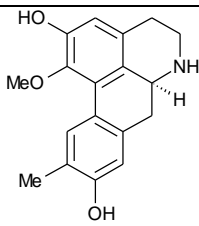
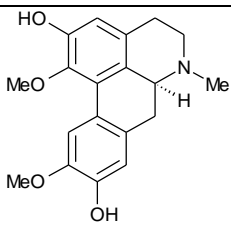
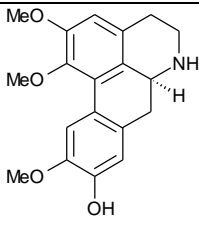
2 Isoquinoline alkaloids

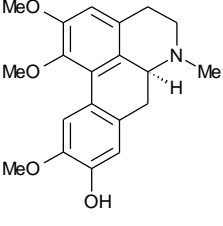
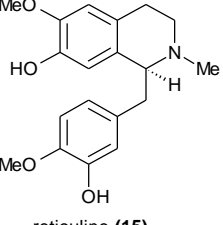
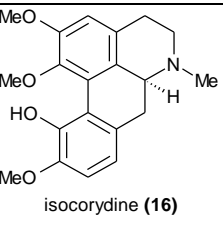
The isoquinoline alkaloids represent the majority of the alkaloids described in the Lauraceae family, and have been reported in various genera. They stand out in Lauraceae due their detection in several species and in various plant parts.

The most frequently detected alkaloids in Lauraceae belong to the aporphinic group, with only one benzyltetrahydroisoquinoline. With methoxyls and only a few hydroxyl groups located at positions 1, 2, 8, 10 or 11, these alkaloids have similar structures and polarities: actinodaphnine (**8**), dicentrine (**9**), isoboldine (**10**), laurilitine (norboldine) (**11**), boldine (**12**), laurotetanine (**13**) and N-methylaurotetanine (**14**). The alkaloids actinodaphnine (**8**) and dicentrine (**9**) present a dioxymethylene at C-1 and C-2, while reticuline (**15**), a benzyltetrahydroisoquinoline alkaloid, also has two hydroxyls at C-7 and C-11, two methoxyls at C-6 and C-10 and a methyl at the nitrogen atom. Among the aporphine structures, actinodaphnine (**8**), laurilitine (**11**), boldine (**12**), laurotetanine (**13**) and N-methylaurotetanine (**14**) present a hydroxyl at C-9. Laurilitine (**11**) has a methyl at C-10, while laurilitine (**11**), boldine (**12**), laurotetanine (**13**), N-methylaurotetanine (**14**) and isocorydine (**16**) have a methoxyl at C-1. Laurilitine (**11**) and boldine (**12**) have a hydroxyl at C-2, and laurotetanine (**13**), N-methylaurotetanine (**14**) and isocorydine (**16**) have a methoxyl at C-2 (Table 1).

Table 1: Distribution of the most common isoquinoline alkaloids from Lauraceae.

Alkaloid	Genus	Species	Part of the plant	Ref
 <p>actinodaphnine (8)</p>	<i>Actinodaphne</i>	<i>obovata</i>	leaves and branches	13
	<i>Cassytha</i>	<i>filiformis</i>	aerial part	14
				15
				16
				17
	<i>Cinnamomum</i>	<i>insularimontanum</i>	roots	18
	<i>Laurus</i>	<i>nobilis</i>	aerial part and root	19
	<i>Litsea</i>	<i>sebifera</i>	leaves and branches	13
		<i>laurifolia</i>	leaves	20
<i>Neolitsea</i>	<i>sericea</i>	leaves and stem bark	21	
			22	
	<i>acuminatissima</i>	stem bark	23	
 <p>dicentrine (9)</p>	<i>Actinodaphne</i>	<i>sesquipedalis</i>	stem bark	24
	<i>Cassytha</i>	<i>filiformis</i>	aerial part	14
				16
				17
	<i>Lindera</i>	<i>megaphylla</i>	roots	25
	<i>Ocotea</i>	<i>brachybotra</i>	leaves	26
		<i>macropoda</i>		14
		<i>minarum</i>	leaves	27
		<i>macrophylla</i>	leaves	28
		<i>puberula</i>	leaves	29
			fruits	30
<i>vellosiana</i>	stem, leaves and fruits	31		
 <p>isoboldine (10)</p>	<i>Aniba</i>	<i>muca</i>	stem bark	32
	<i>Cassytha</i>	<i>filiformis</i>	aerial part	15
		<i>pubescens</i>		33
	<i>Cryptocarya</i>	<i>chinensis</i>	leaves	34
	<i>Lindera</i>	<i>angustifolia</i>	roots	35
	<i>Litsea</i>	<i>petiolata</i>	stem bark	36
	<i>Neolitsea</i>	<i>acuminatissima</i>	stem bark	23
	<i>Ocotea</i>	<i>caesia</i>	stem	37
	<i>Sassafras</i>	<i>albidum</i>	root bark	38

Alkaloid	Genus	Species	Part of the plant	Ref
 <p>lauroilsine (11)</p>	<i>Actinodaphne</i>	<i>nitida</i>	leaves	39
		<i>pruinosa</i>	stem bark	40
	<i>Alseodaphne</i>	<i>perakensis</i>	stem bark	41
	<i>Cinnamomum</i>	<i>camphora</i>	roots	42
	<i>Lindera</i>	<i>aggregata</i>	roots	43
		<i>angustifolia</i>	roots	35
		<i>chunii</i>	roots	44
	<i>Litsea</i>	<i>laurifolia</i>	stem bark	20
		<i>wightiana</i>	stem bark	13
		<i>leefeana</i>	leaves	45
	<i>Neolitsea</i>	<i>acuminatissima</i>	stem bark	23
		<i>sericea</i>	stem bark and leaves	22
				21
	<i>Phoebe</i>	<i>chinensis</i>	stem bark	46
		<i>formosana</i>	stem bark	47
	<i>grandis</i>	stem bark	48	
	<i>scortechinii</i>	stem bark	49	
<i>Sassafras</i>	<i>albidum</i>	root bark	38	
 <p>boldine (12)</p>	<i>Actinodaphne</i>	<i>nitida</i>	stem bark	39
		<i>pruinosa</i>	stem bark	40
	<i>Beilschmiedia</i>	<i>kunstleri</i>	stem bark	50
	<i>Laurus</i>	<i>nobilis</i>	leaves	19
	<i>Lindera</i>	<i>aggregata</i>	roots	43
		<i>angustifolia</i>	roots	35
	<i>Litsea</i>	<i>leefeana</i>	leaves	45
		<i>sebifera</i>	leaves and branches	13
		<i>wightiana</i>	stem bark	13
	<i>Neolitsea</i>	<i>acuminatissima</i>	stem bark	23
		<i>sericea</i>	stem bark and leaves	22
				21
	<i>Ocotea</i>	<i>puberula</i>	leaves	29
	<i>Phoebe</i>	<i>grandis</i>	stem bark	48
	<i>Sassafras</i>	<i>albidum</i>	root bark	38
 <p>laurotetanine (13)</p>	<i>Actinodaphne</i>	<i>obovata</i>	leaves and branches	13
	<i>Beilschmiedia</i>	<i>kunstleri</i>	stem bark	50
	<i>Cryptocarya</i>	<i>odorata</i>	stem bark	51
	<i>Lindera</i>	<i>angustifolia</i>	roots	35
		<i>benzoin</i>	branches	52
	<i>Litsea</i>	<i>cubeba</i>	stem bark	53
		<i>sebifera</i>	leaves and branches	13
	<i>Neolitsea</i>	<i>sericea</i>	stem bark and leaves	22
				21
	<i>Phoebe</i>	<i>chinensis</i>	stem bark	46
	<i>grandis</i>	stem bark	48	

Alkaloid	Genus	Species	Part of the plant	Ref
 N-methylaurotetanine (14)	<i>Actinodaphne</i>	<i>obovata</i>	leaves and branches	13
	<i>Alseodaphne</i>	<i>perakensis</i>	stem bark	41
	<i>Cryptocarya</i>	<i>odorata</i>	stem bark	51
	<i>Lindera</i>	<i>angustifolia</i>	roots	35
		<i>pipericarpa</i>	stem bark	54
	<i>Litsea</i>	<i>cubeba</i>		55
		<i>cubeba</i>	stem bark	53
<i>sebifera</i>		leaves and branches	13	
<i>Neolitsea</i>	<i>sericea</i>	stem bark and leaves	22	
		21		
 reticuline (15)	<i>Aniba</i>	<i>muca</i>	stem bark	32
		<i>rosaedora</i>	stem	56
	<i>Cinnamomum</i>	<i>camphora</i>	roots	42
	<i>Cryptocarya</i>	<i>odorata</i>	stem bark	51
	<i>Laurus</i>	<i>nobilis</i>	roots and aerial part	19
	<i>Lindera</i>	<i>aggregata</i>	roots	43
	<i>Litsea</i>	<i>laurifolia</i>	leaves	20
		<i>leefeana</i>	leaves	45
		<i>petiolata</i>	stem bark	36
	<i>Neolitsea</i>	<i>acuminatissima</i>	stem bark	23
		<i>sericea</i>	leaves	22
	<i>Ocotea</i>	<i>duckei</i>	stem bark and leaves	57, 58
		<i>vellosiana</i>	fruits	31
<i>Phoebe</i>	<i>pittieri</i>	stem bark	59	
<i>Sassafras</i>	<i>albidum</i>	root bark	38	
 isocorydine (16)	<i>Cryptocarya</i>	<i>odorata</i>	stem bark	51
	<i>Dehaasia</i>	<i>triandra</i>	leaves	60
	<i>Lindera</i>	<i>pipericarpa</i>	stem bark	54
	<i>Litsea</i>	<i>cubeba</i>	stem bark	53
	<i>Ocotea</i>	<i>macrophylla</i>	stem	61
	<i>Ocotea</i>	<i>vellosiana</i>	fruits	31

Stem bark is the most common plant part where these alkaloids can be found in Lauraceae, together with leaves. Several studies have found these alkaloids in roots as well. Taking into account that almost all of these species are trees and not shrubs, it is important to note that the preference of performing a phytochemical study on roots indicates an objective approach based on a characteristic of the family.

Some of these alkaloids have been pharmacologically studied with promising activities for use in different health areas. High cytotoxicity was observed for actinodaphnine (**8**) using the Mel-5 and HL-60 cell lines.¹⁶ This alkaloid also induced apoptosis in human hepatoma cells Mahvalu by increasing nitric oxide, reactive oxygen species and modulating NF- κ B signalling.¹⁸

Dicentrine (**9**) showed cytotoxic activity in the HCE-6, Molt-4, CESS, HL60, K562 and MS-G2 cell lines.²⁵ Hoet et al.⁶² observed that dicentrine (**9**) presented activity against *Trypanosoma brucei* using *in vitro* assays. Recently, it was observed that this alkaloid has an antinociceptive effect following a pain stimulus (acetic acid) in experiments with mice.³⁰ This alkaloid also presented potent vasorelaxation in experiments conducted in mice, where the IC₅₀ ranged from 0.08 to 2.48 μ M.¹⁷

Lauroilsine (**11**) showed cytotoxic activity against the Hep-2 cell line.⁴⁶ This substance also presented significant inhibitory activity against type I HIV integrase with an IC₅₀ of 16.3 μ M.⁴⁴ Antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* (clone 3D7) was also reported for this substance with an IC₅₀ of 1.49 mg/mL.⁶³

Boldine (**12**) showed antiinflammatory activity using a model of the oedema induced by carrageenan, in addition to antinociceptive activity.^{64,65} This compound has also shown cytotoxic activity against HEp-2 tumour cells with total inhibition of the cell culture at a concentration of 0.3 mg/mL.⁶⁶

Morais et al.⁶⁷ performed neuropharmacological studies carried out with reticuline (**15**) in mice, observing that this alkaloid caused changes in sleep behaviour, motor coordination and conditioned avoidance responses in these animals, suggesting that this alkaloid possesses potent central nervous system depressant effects. Dias et al.⁶⁸ observed a blood pressure lowering effect in rats, and Medeiros and coworkers⁵⁸ observed that this molecule induces vasorelaxation through the blockade of L-type Ca²⁺ channels.

The similarity of these substances and their pharmacological activities strongly indicates that further studies must be performed. These alkaloids are commonly obtained in very small quantities. Isolation on the gram scale would allow additional pharmacological experiments.

In addition to these substances, the most common alkaloids found in Lauraceae, there have been many other isoquinoline alkaloids described, with more restricted distribution. The genus *Ocotea* is one of the most studied in Lauraceae, with several alkaloids found, predominantly aporphines. In *Ocotea macropoda*, dicentrine (**9**), together with predicentrine (**17**), ocopodine (**18**), nordicentrine (**19**), dehydrodicentrine (**20**), dehydroocopodine (**21**) and dicentrinone (**22**) were identified.^{69,70} In *O. macrophylla*, isocorydine (**16**), (+)-natenine (**23**), glaucine (**24**) and dehydronantenine (**25**) were identified (Fig. 2).⁶¹

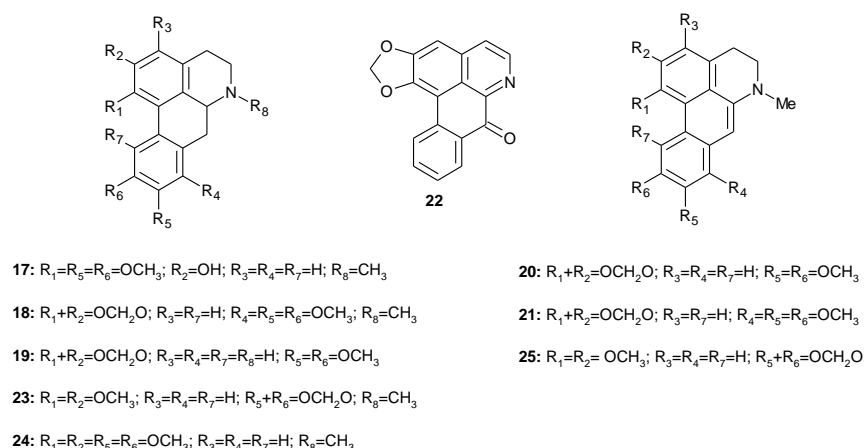


Fig. 2

In recent studies performed on *O. macrophylla* leaves, the alkaloids dicentrine (**9**), (+)-nantenine (**23**), dehydronantenine (**25**), (+)-neolitsine (**26**), (+)-N-acetyl-nornantenine (**27**), (+)-cassythidine (**28**) and didehydroocotein (**29**)²⁸ were isolated. From the stem, the alkaloids (S)-3-methoxynordomesticine (**30**), (S)-N-ethoxycarbonyl-3-methoxynordomesticine (**31**),

(S)-N-formyl-3-methoxynordomesticine (**32**) and (S)-N-methoxycarbonyl-3-methoxynordomesticine (**33**) were also detected and identified (Fig. 3). The alkaloid (S)-3-methoxynordomesticine (**30**) showed moderate antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and antimicrobial activity towards *Staphylococcus aureus* 6538 and *Enterococcus faecalis* 29212⁷¹. (+)-nantenine (**23**) has also presented a reversible effect in muscle contraction and Ca²⁺ transients in experiments using rats.⁷²

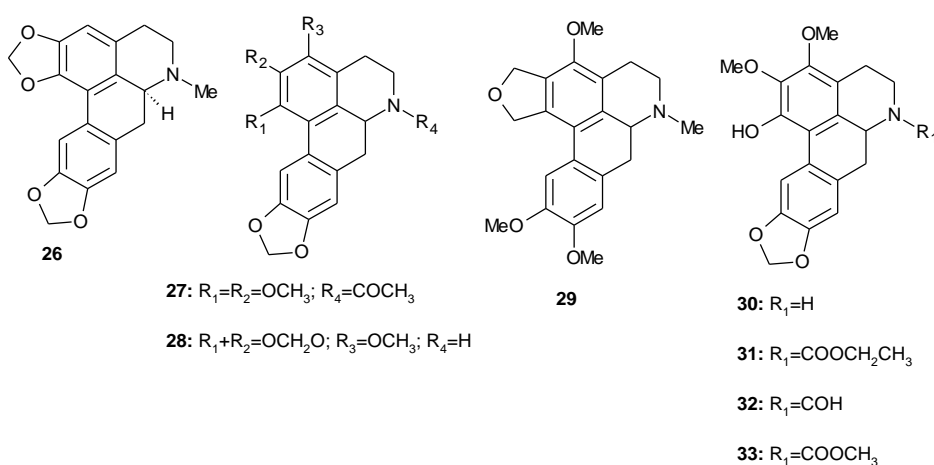


Fig. 3

Extracts from the leaves of *O. brachybotra* yielded the alkaloids dicentrine (**9**), predicentrine (**17**), ocopodine (**18**), (±)-glaziovine (**34**), cassythicine (**35**), leucoxine (**36**) and sinacutine (**37**). In the same study, the authors isolated morphinone derivatives such as pallidine (**38**), ocobitrine (**39**) and 14-episiomenine (**40**). Their structures were elucidated by the usual spectroscopy methods and chemical correlations (Fig. 4).²⁶

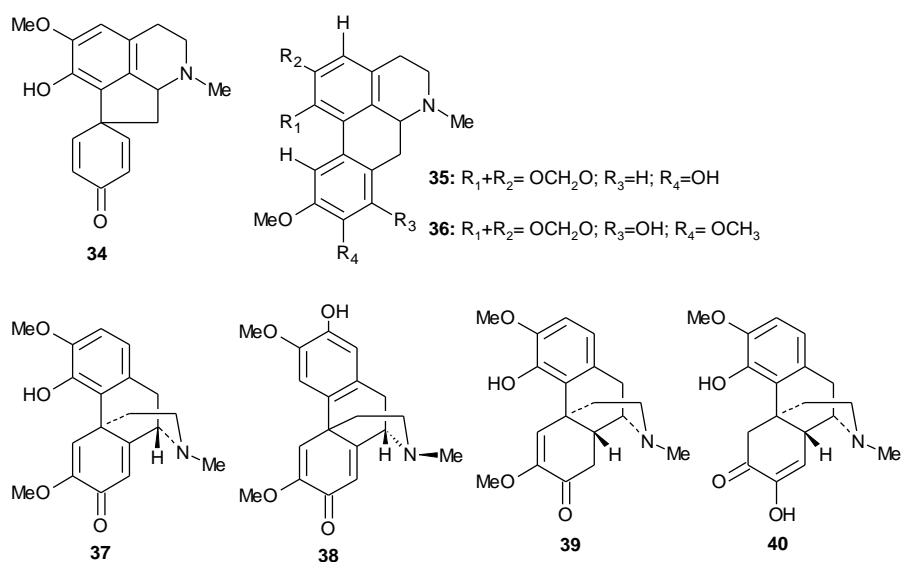


Fig. 4

A great number of isoquinoline alkaloids has been reported in other species of *Ocotea*, including (+)-isoboldine (10), (-)-zenkerine (41), (+)-laurelliptine (42), (-)-pulcine (43) and nororientidine (44), observed in *O. caesia* stems³⁷, and 1-(p-methoxybenzoyl)-6,7-methylenedioxyisoquinoline (45), 1-(hydroxy-p-methoxybenzyl)-6,7-methylenedioxyisoquinoline (46), 1,2-dihydro-1-(p-methoxybenzoyl)-6,7-methylenedioxyisoquinoline (47) and 1,2-dihydro-1-(hydroxy-p-methoxybenzyl)-6,7-methylenedioxyisoquinoline (48), obtained from *O. pulchella* stem bark (Fig. 5).⁷³

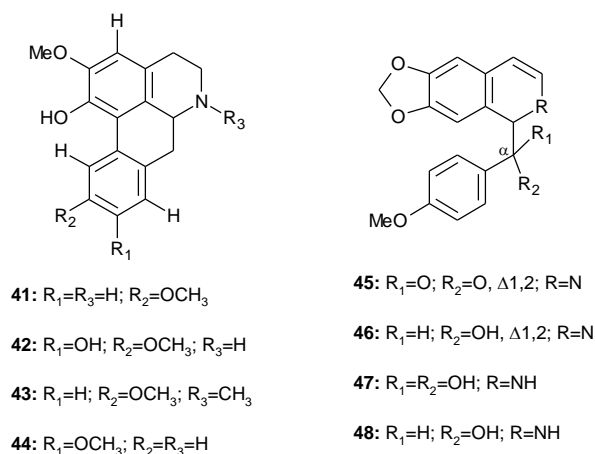


Fig. 5

In *Ocotea vellosiana*, the alkaloids predicentrine (**17**), nordicentrine (**19**), ocoteine (**49**), O-methylcassyfiline (**50**), leucoxyllonine (**51**), ocotomarine (**52**) and reticuline (**15**) were detected in the branches; ocopodine (**18**) and ocominarine (**53**) in the leaves; glaucine (**24**), isocorydine (**16**) and corydine (**54**) in fruits; dicentrine (**9**) were identified in all plant parts studied.³¹ In *Ocotea duckei* were isolated the benzyloisoquinoline alkaloids reticuline (**15**) from the leaves and stem bark^{58,67} and coclaurine (**55**) from the stem.⁷⁴ Several aporphine structures were isolated from *O. minarum* leaves, which were identified as dicentrine (**9**), predicentrine (**17**), ocopodine (**18**), dicentrinone (**22**), leucoxine (**36**), ocoteine (**49**), leucoxyllonine (**51**), ocotomarine (**52**), ocominarine (**53**), thalicminine (**56**), norleucoxyllonine (**57**), isoconovine (**58**), 4-hydroxydicentrine (**59**) and ocominarone (**60**). Structure identification was performed by spectroscopy methods and chemical correlations (Fig. 6).²⁷

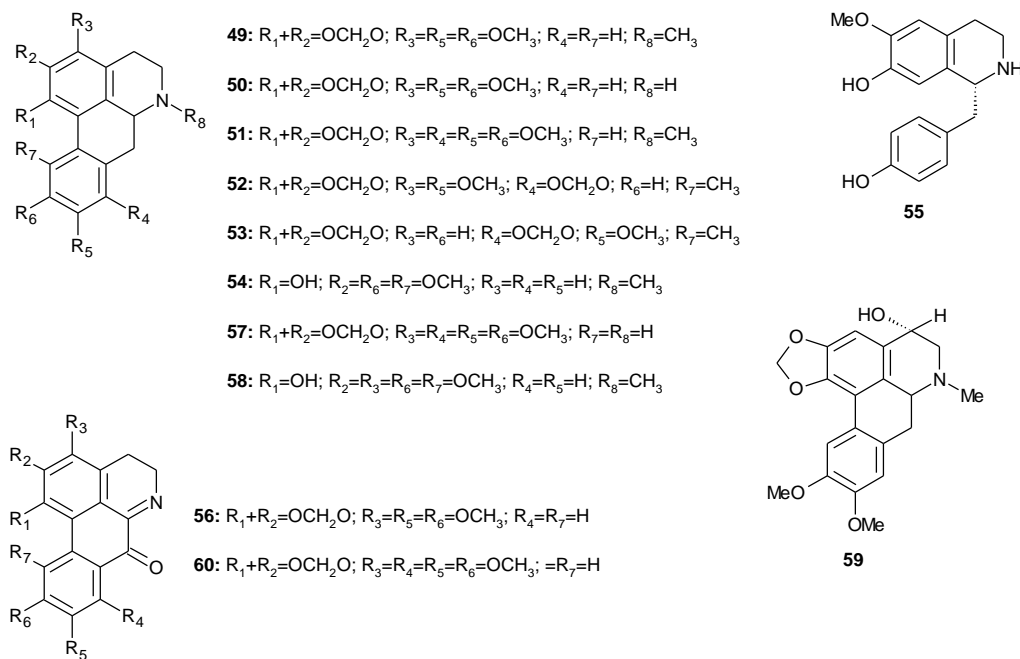


Fig. 6

Investigations on *O. glaziovii* leaves have afforded assimilobine (**61**), caaverine (**62**), liridinine (**63**) and glaziovine (**34**),⁷⁵ these compounds were also observed in *O. variabilis*.⁷⁶ This species has also shown the presence of nantenine (**23**), apoglaziovine (**64**) and variabiline (**65**).⁷⁶ In the species *O. sinuata*, nordomesticine (**66**) was found, while isocorydine (**16**), taliporfine (**67**), oconovine (**68**), ococriptine (**69**), ocoxilonine (**70**) and hernandonine (**71**) were identified in *Ocotea*, but without species recognition (Fig. 7).^{69,77,78}

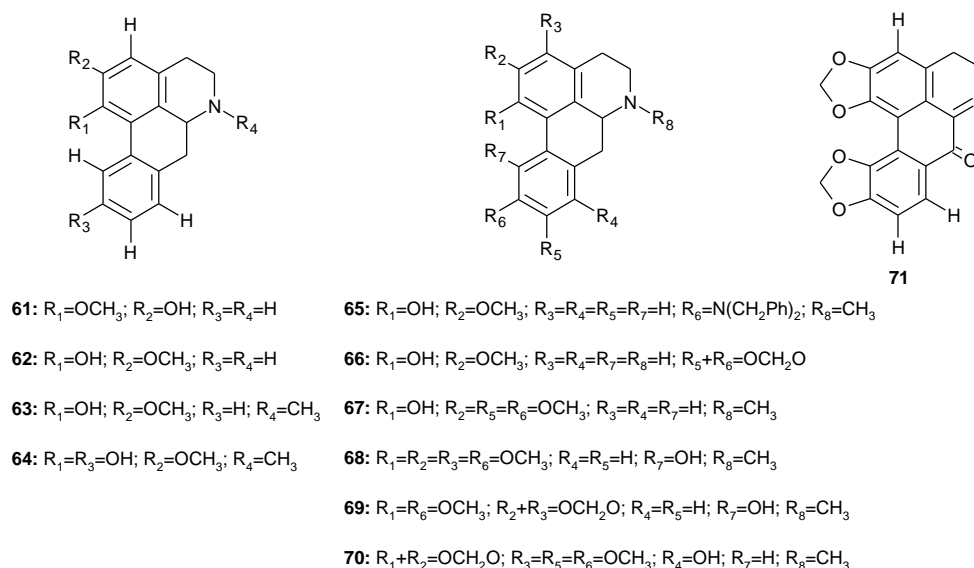


Fig. 7

A number of alkaloid structures have been elucidated in *O. puberula*: dicentrine (**9**), N-methylauronetanine (**14**), predicentrine (**17**), leucoxine (**36**), ocoteine (**49**), talicminime (**56**), isodomesticine (**72**), dicentrine N-oxide (**73**), dehydroocoteine (**74**), didehydroocoteine (**75**) and 3-hydroxydicentrine (**76**).^{69,79-81} Further studies on the seedling leaves of *Ocotea puberula* have yielded dicentrine (**9**), boldine (**12**), leucoxine (**36**) and isodomesticine (**72**), in concentrations higher than those observed in the leaves of adult individuals.²⁹ The methanolic extract of *O. leucoxyton* yielded dicentrinone (**22**) as the major alkaloid besides dicentrine (**9**) and leucoxytonine (**51**).⁸² In the leaves of *O. holdridgeiana*, isocorydine (**16**), O,O-dimethylcorituberine (**77**), 3-hydroxynuciferine (**78**) and 3-methoxynuciferine (**79**) were identified (Fig. 8).⁸³

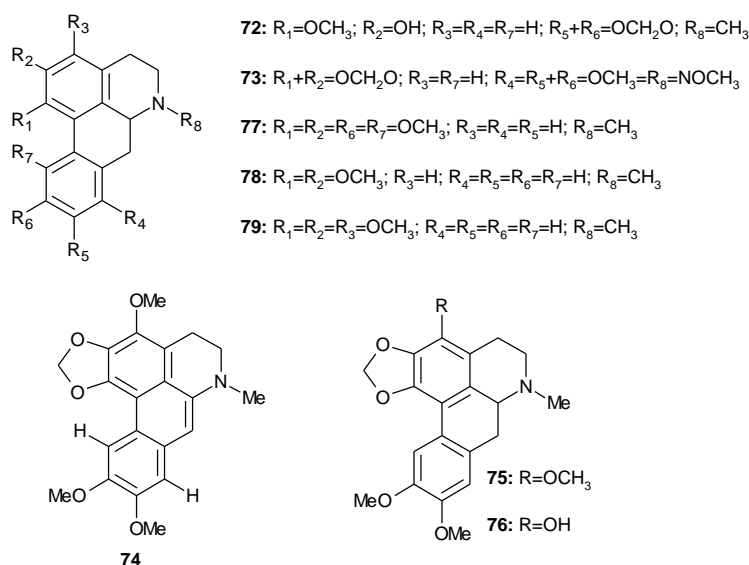


Fig. 8

López and coworkers⁸⁴ obtained the alkaloids isocorydine (**16**), 3-hydroxynuciferine (**78**) and 3-hydroxy-6a,7-dihydronuciferine (**80**) from ethanolic extracts of *O. brenesii* leaves. Studies performed with *O. acutangula* leaves led to the identification of (S)-(-)-pallidine (**38**), its derivative (S)-(-)-O-methylpallidine (**81**), as well as the alkaloids (S)-(-)-pallidine (**82**) and (S)-(-)-O-methylpallidine (**83**) (Fig. 9).⁸⁵

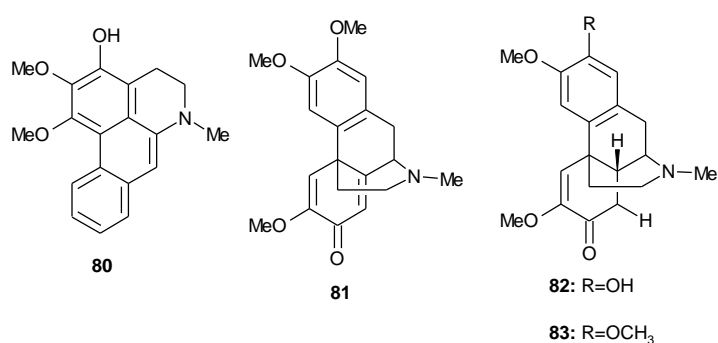


Fig. 9

From *O. rodiaei* stem bark, the structures of the alkaloids rodiasine (**84**), ocoteamine (**85**), demerarine (**86**), norrodiasine, dirosine, otocamine and ocodemerine were elucidated.⁸⁶

Other alkaloids found in the genus *Ocotea* are talbaicalidine (**87**) in *O. bucherii*,⁸⁷ talictuberine (**88**) and 3-O-dimethyltalictuberine (**89**) in *O. insularis* (Fig. 10).⁸⁸

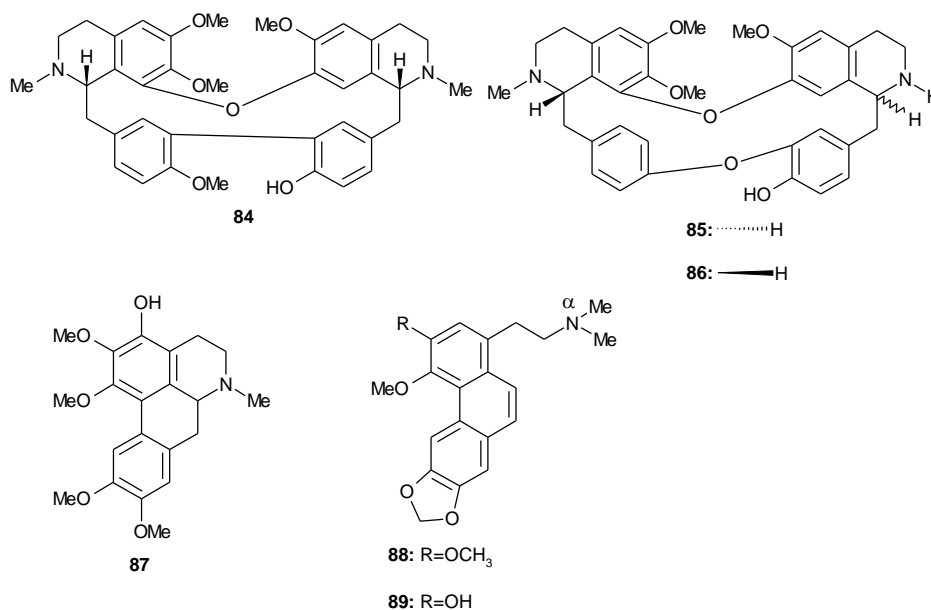


Fig. 10

Most of these references on the *Ocotea* genus addressed is mentioned in the review about *Ocotea* aporphine alkaloids performed by Zanin and Lordello,³ in which the authors reported the occurrence of 54 aporphine alkaloids distributed in 17 species, including 39 aporphines, four oxoaporphines, five 6a,7dehydroaporphines, one didehydroaporphine, one C-3-O-aporphine, one C-4-O-aporphine, two fenantrenes and one proaporphine.

Recently, the alkaloids (+)-neolitsine (**26**), (+)-6S-ocoteine-N-oxide (**90**), (+)-norocoxilonine (**91**) and (+)-talicsimidine (**92**) were isolated from the leaves and stem bark of *Ocotea acutifolia* (Fig. 11).⁸⁹

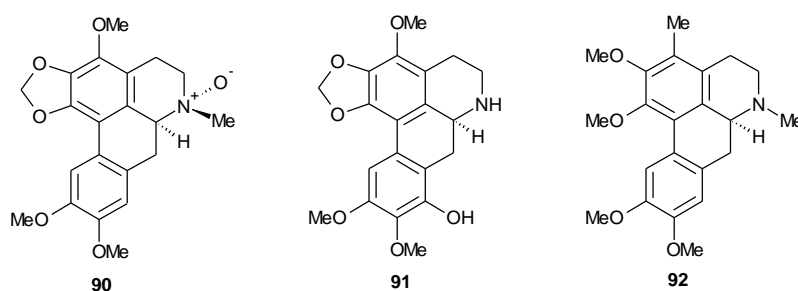


Fig. 11

In *Cryptocarya*, several isoquinoline alkaloids have also been described. However, this genus presents several unusual pavine alkaloids. Among the exceptions are armepavine (**93**), a benzylisoquinoline alkaloid obtained from *Cryptocarya archboldiana* leaves that represents 70% of the alkaloidal fraction obtained.⁹⁰ Other alkaloids present in the genus are (+)-orientaline (**94**) and laudanidine (**95**) in the stem bark of *C. amygdalina*,⁹¹ ateroline (**96**) and velucryptine (**97**) in *C. velutinosa* leaves⁹² and (+) - (1R, 1Ra)-1a-hydroxymagnocumarine (**98**) from *C. konishii*.⁹³ Lisicamine (**99**) was isolated from the stem bark of *Cryptocarya strictifolia*.⁹⁴ In *C. odorata* stem bark, laurotetanine (**13**), N-methyllaurotetanine (**14**), reticuline (**15**), isocorydine (**16**) and cryptodorine (**100**) were found.⁵¹ From *C. phyllostemom* stem bark, two tetrahybenzylisoquinoline alkaloids, (+)-phyllocryptine (**101**) and (+)-phyllocryptonine (**102**) were obtained (Fig. 12).⁹⁵

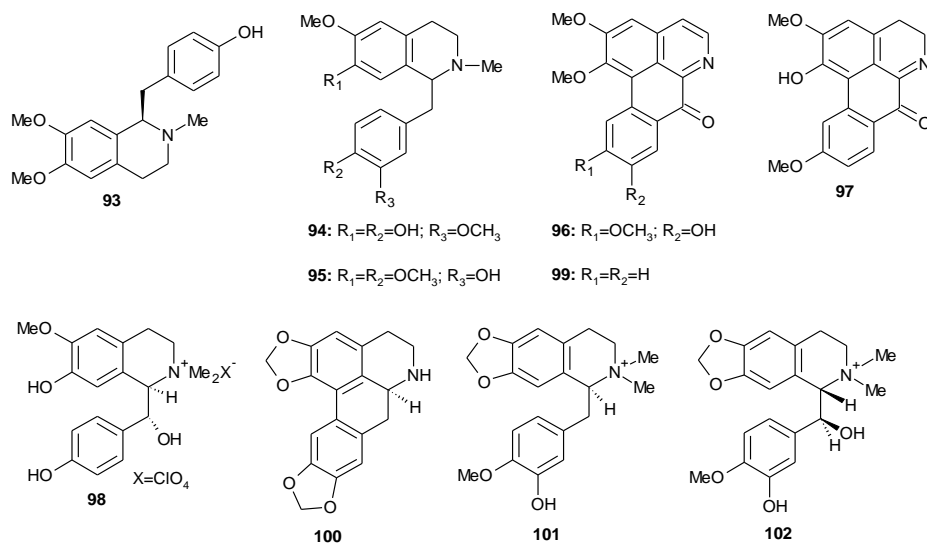


Fig. 12

The study of *C. ferrea* stems led to the isolation of three aporphine alkaloids, (-)-O-methylisopiline (**103**), (+)-lirioferine (**104**) and (+)-norlirioferine (**105**).⁹⁶ Seven benzyloquinoline alkaloids were obtained from *C. rugulosa* stem bark: (+)-reticuline (**15**), papraline (**106**), (+)-norcinnamolaureine (**107**), (+)-codamine (**108**), (+)-6-methoxy-1-(3'-methoxybenzyl)-N-methyl-7-isoquinolinol (**109**), (-)-N-methylisococlaurine (**110**) and (+)-reticuline N-oxide (**111**) (Fig. 13).⁹⁷

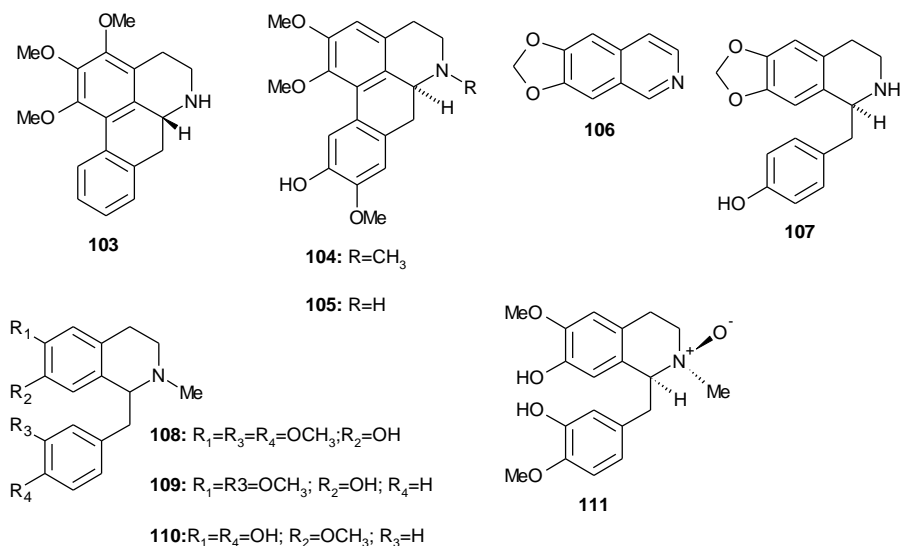


Fig. 13

Cryptocarya chinensis is one of the most studied in this genus, with several alkaloids identified: isoboldine (**10**), (\pm)-romneine (**112**), (-)-eschscholtzine (**113**), (+)-eschscholtzidine (**114**),⁹⁸ (-)-isocaryachine-N-oxide (**115**), isoboldine- β -N-oxide (**116**), 1-hydroxycryprochine (**117**), (+)-isocaryachine (**118**), (+)-caryachine (**119**), (-)-caryachine (**120**), (-)-isocaryachine (**121**), (-)-munitagine (**122**), bisnorargemine (**123**),³⁴ all of them isolated from the leaves of this species (Fig. 14).

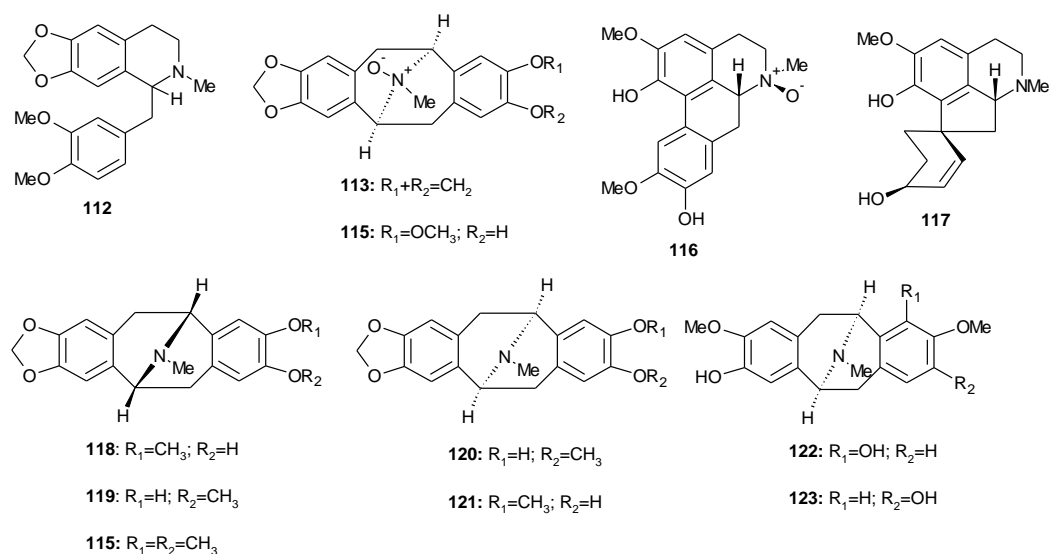


Fig. 14

C. chinensis stems have yielded the pavine alkaloids (+)-eschscholtzidine (**114**), (+)-caryachine (**119**), (+)-escholtzidine-N-oxide (**124**), (-)-12-hydroxyeschscholtzidine (**125**), (-)-12-hydroxycrychine (**126**), (-)-N-demethylcrychine (**127**), neocaryachine (**128**), crychine (**129**), (-)-argemonine (**130**), dorianine (**131**), (-)-N-demethyl-phelocryptine (**132**), in addition to the proaporphines cryprochine (**133**), isocryprochine (**134**), prooxocryptochine (**135**), isoamurinine (**136**) and (+) - 8,9-dihydroestepharine (**137**) (Fig. 15).⁹⁹

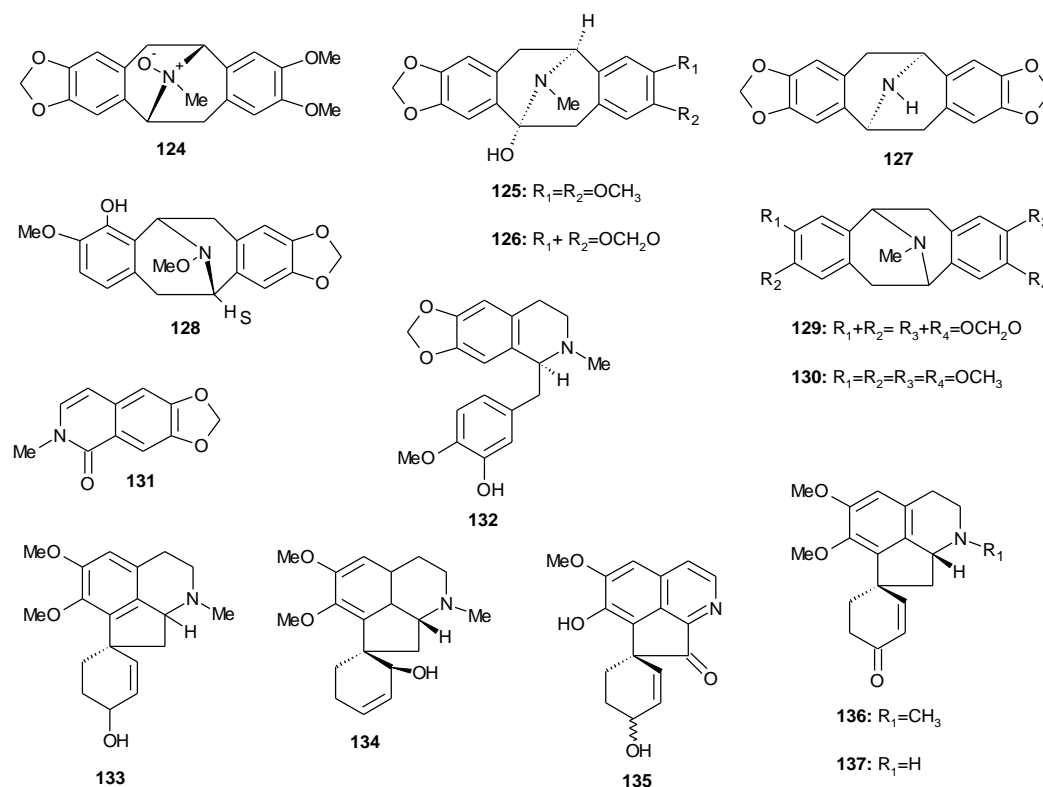


Fig. 15

From the stem bark, (-)-eschscholtzidine (**114**), 1-hydroxycryprochine (**117**), (+)-caryachine (**119**), (-)-caryachine (**120**), (-)-isocaryachine (**121**), (-)-neocaryachine (**128**), (+)-cryprochine (**133**), (-)-isocaryachine-N-oxide B (**138**), (-)-caryachine-N-oxide (**139**), 6,7-methylenedioxy-N-methylisoquinoline (**140**), (+)-isocaryachine-N-oxide (**141**), (+)-cinnamolaurine (**142**), (-)-mutagenine, 4-(6,7)-dimethoxyisoquinoline-1-ylmethylfenol, (-)-

2-O-norargemonine and (-)-N,N-dimethylcaryachine were isolated,^{98,100,101} as well as three quaternary pavine alkaloids as N-methoxy salts of caryachine (**143**), neocaryachine (**144**) and crychine (**145**) from *C. chinensis* callus culture.¹⁰² Caryachine was also obtained as an N-methoxy salt (**143**) by Chen et al.¹⁰³ from the stem bark of *C. chinensis* (Fig. 16).

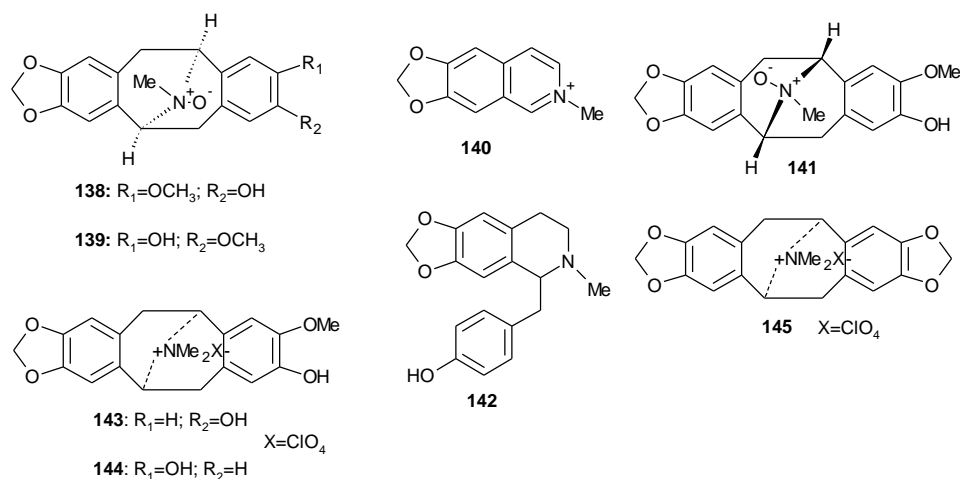


Fig. 16

A number of isoquinoline alkaloids have been reported in the genus *Cassytha*; the most studied species is *Cassytha filiformis*. Several alkaloids have been ascribed to this species, including neolitsine (**26**), cassythidine (**28**), O-methylcassyfiline (= O-methylcassythine) (**50**), cassyfiline (= cassythine) (**146**), lisicamine (**99**), cassamedine (**147**), cassameridine (**148**), launobine (**149**), bulbocapnine (**150**), (+)-nornuciferine (**151**), (+)-nuciferine (**152**), aterspermidine (**153**), liriodenine (**154**), O-methylateroline (**155**), catafiline (**156**), cataformine (**157**), isofiliformine (**158**), cassythic acid (**159**), norpredicentrine (**160**), (-)-O-methylflavinatine (= sebiferine) (**161**), (-)-salutaridine (**162**) and 1,7-methylenedioxy-3,10,11-trimethoxyaporphine (**163**) (Fig. 17).¹⁴⁻¹⁷

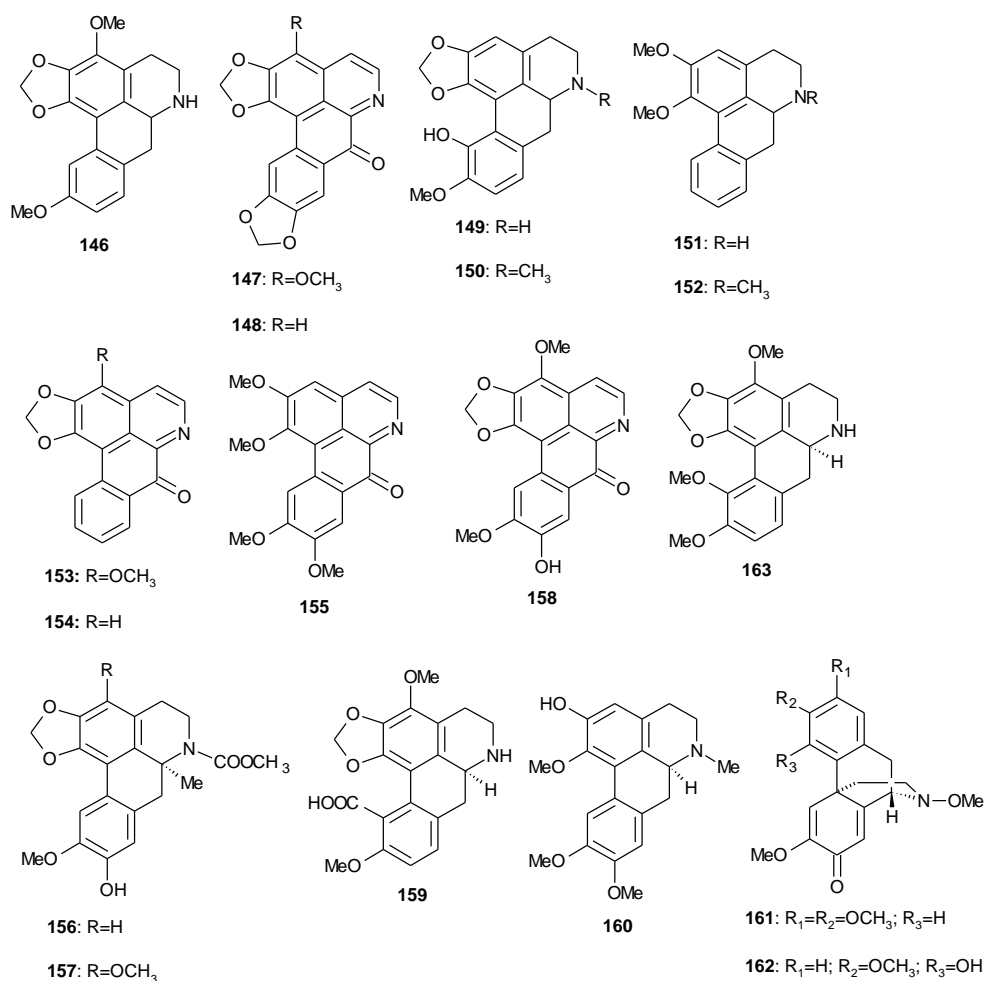


Fig. 17

In *Cassipoupa pubescens*, the aporphine alkaloids isoboldine (**10**), nantenine (**23**), laurelliptine (**42**), nordomesticine (**66**), domesticine (**164**) and sinoacutine (**165**) were identified (Fig. 18).³³ Tsai and coworkers¹⁷ observed in this species dicentrine (**9**), neolitsine (**26**), casshytine (**146**) and casshytic acid (**159**). The casshytine (**146**) showed high activity against the cell lines Mel-5 (IC₅₀ of 24.3 μM) and HL-60 (IC₅₀ of 19.9 μM), and was also active in *in vitro* assays with *Trypanosoma brucei*.^{16,62} Cytotoxic activity of neolitsine (**26**) was also observed in the cancer cell lines HeLa and 3T3 with an IC₅₀ of 21.6 μM and 21.4 μM, respectively.¹⁶

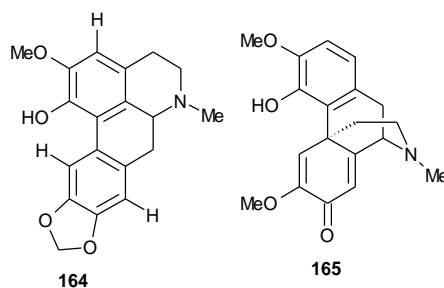


Fig. 18

Investigations into *Aniba* species afforded (R)-(+)-noranicanine (**166**), a benzylisoquinoline trioxygenated alkaloid that was isolated from the stem bark of *Aniba canellila*.¹⁰⁴ Eleven other benzyltetrahydroisoquinoline alkaloids were also reported in this species, including four compounds monosubstituted on ring C with a hydroxyl at C-11, i.e. (-)-norcanelliline (**167**), (+)-canelliline (**168**), anicanine (**169**) and canellinoxine (**170**); two compounds monosubstituted at C-9 in ring D, i.e. (-)-anibacanine (**171**) and (+)-manibacanine (**172**); two compounds monosubstituted at C-11 in ring D, i.e. (-)-pseudoanibacanine (**173**) and (+)-pseudoanibacanine (**174**); and three alkaloids with the same substitution pattern on rings A and B with a methyl group at positions 8α and 8β , i.e. (-)- α -8-methylpseudoanibacanine (**175**), (-)- β -8-methylpseudoanibacanine (**176**) and (-)- α -8-methylanibacanine (**177**).¹⁰⁵ Additionally, isoboldine (**10**), reticuline (**15**) and N-methylcoclaurine (**178**) were isolated from *Aniba muca* stem bark.³² Reticuline (**15**) was also found in *Aniba rosaeodora* (Fig. 19).⁵⁶

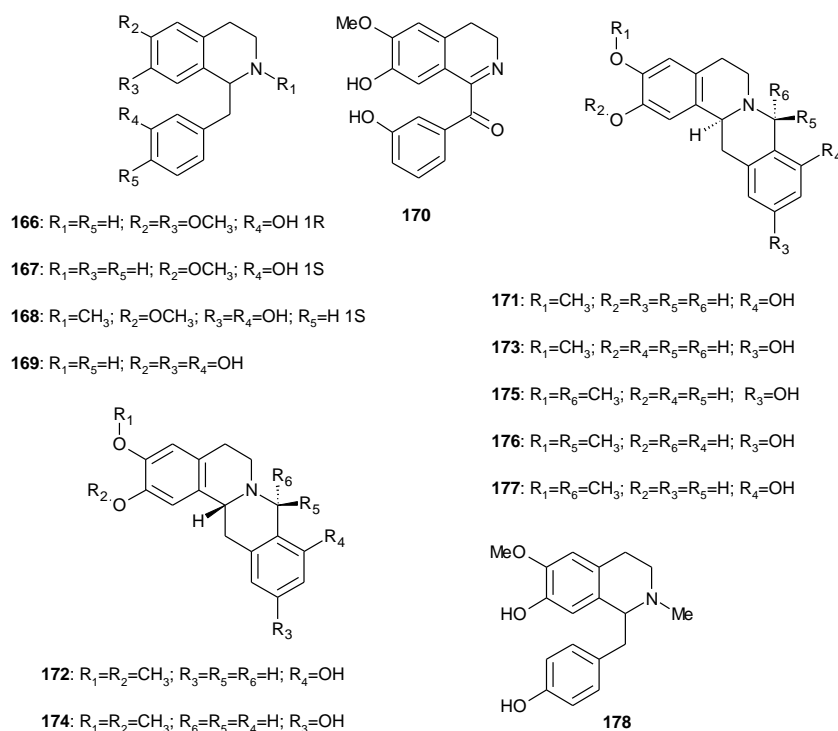


Fig. 19

In the genus *Lindera*, lindecarpine (**179**) and N-methylindecarpine (**180**) have been reported in *L. pipericarpa* roots,¹⁰⁶ and N-methyllaurotetanine (**14**), isocoridine (**16**) and norisocoridine (**181**) in the stem bark.⁵⁴ The bisbenzylisoquinoline dimer lindoldhamine (**182**) was isolated from leaves of *L. oldhamii*.¹⁰⁷ D-dicentrine (**9**) was observed in *L. megaphylla* roots,²⁵ while laurotetanine (**13**) was obtained from *L. benzoin* branches.⁵² The alkaloids laurolitsine (**11**), hernandine (**183**), hernangerine (**184**), N-methylhernangerine (**185**), ocokryptine (N-methylhernandine) (**186**), hernandonine (**187**), 7-oxohernangerine (**188**), lindechunine A (**189**), lindechunine B (**190**) and 7-oxohernagine (**191**) were isolated from the roots of *Lindera chunii* (Fig. 20).⁴⁴ Among the alkaloids found in *Lindera chunii* significant inhibitory activity against type I HIV integrase was observed for hernandonine (**187**), 7-oxohernangerine (**188**) and lindechunine A (**189**) with IC_{50} of 7.7 μM , 18.2 μM and 21.1 μM , respectively.⁴⁴

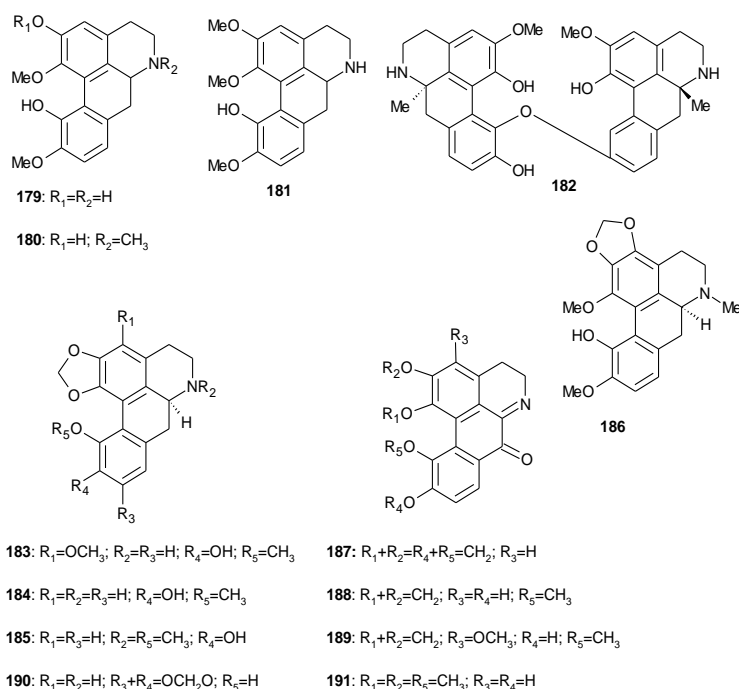


Fig. 20

More recently, some common aporphinic alkaloids were observed in *Lindera angustifolia* roots, such as isoboldine (**10**), norboldine (**11**), boldine (**12**), laurotetanine (**13**), N-methylaurotetanine (**14**), reticuline (**15**), norisocoridine (**181**), and N-ethoxycarbonyllaurotetanine (**192**), in addition to the magnocurarine (**193**).³⁵ In *Lindera aggregata*, the alkaloids laurolitsine (**11**), boldine (**12**), reticuline (**15**), (-)-pallidine (**38**), norisocoridine (**181**), linderaline (**194**), protosinomenine (**195**), laudanosoline 3',4'-dimethylether (**196**), norisoboldine (**197**) and pronuciferine (**198**), together with the bisbenzylisoquinoline linderegatine (**199**) were isolated from the ethanolic extract of the roots.^{43,108} Among these alkaloids, norisoboldine (**197**) has been reported to inhibit the production of proinflammatory cytokines in experiments with the mouse macrophage cell lineage RAW 264.7.^{43,109} For norisocoridine (**181**), antinociceptive activity and a high capacity for sequestering free radicals with an SC_{50} of 14.1 mg/mL have been found (Fig. 21).⁶⁵

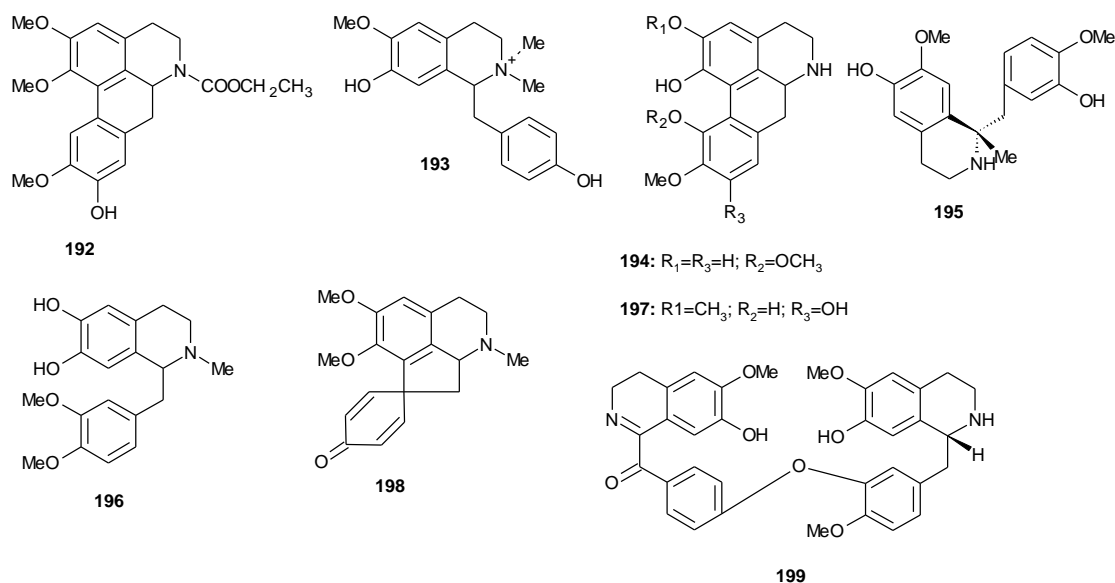


Fig. 21

A number of structures are related to the genus *Litsea*, among them litebamine (**200**), a phenanthrene alkaloid observed in *L. cubeba* stems, with the structure 3,7-dihydroxy-4,6-dimethoxy-*N*-methyl-tetrahydropyridine [4,3-*a*]phenanthrene,¹¹⁰ *N*-methyllaurotetanine (**14**) and the quaternary alkaloids (-)-magnocurarine (**193**), (-)-oblongine (**201**), (-)-8-O-methyloblongine (**202**) and xantoplanine (**203**).^{55,93} *L. cubeba* stem bark yielded five new isoquinoline alkaloids, i.e. (+)-*N*-(methoxycarbonyl)-*N*-nordicentrin (**204**), (+)-*N*-(methoxycarbonyl)-*N*-norpredicentrine (**205**), (+)-*N*-(methoxycarbonyl)-*N*-norglaucine (**206**), (+)-*N*-(methoxycarbonyl)-*N*-norbulbodione (**207**), (+)-*N*-(methoxycarbonyl)-*N*-norisocorydione (**208**) and (+)-8-methoxyisolaurenine-*N* oxide (**209**), all obtained from the 70% ethanolic extract (Fig. 22).¹¹¹ The alkaloids (+)-*N*-(methoxycarbonyl)-*N*-nordicentrin (**204**), (+)-*N*-(methoxycarbonyl)-*N*-norpredicentrine (**205**) and (+)-*N*-(methoxycarbonyl)-*N*-norglaucine (**206**) showed antimicrobial activity against the bacteria *S. aureus* and two fungi, *A. alternata* and *C. nicotianae*, while (+)-*N*-(methoxycarbonyl)-*N*-norbulbodione (**207**) and (+)-*N*-(methoxycarbonyl)-*N*-norisocorydione (**208**) exhibited significant cytotoxicity against

six tested tumour cell lines.¹¹¹ Other alkaloids found in the stem bark of this species were (+)-laurotetanine (**13**), N-methylaurotetanine (**14**) and isocorydine (**16**).⁵³

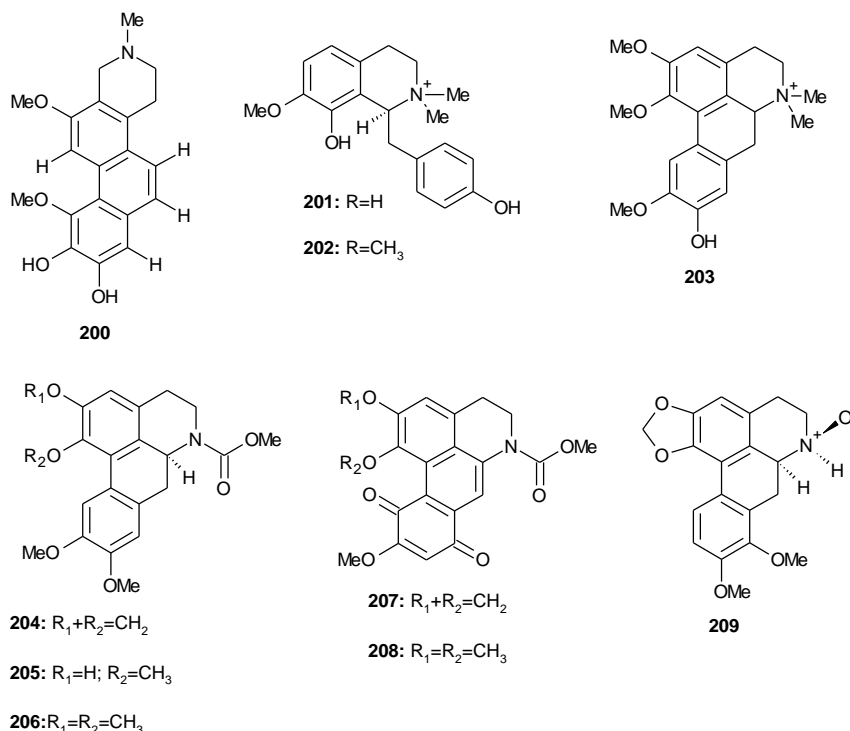


Fig. 22

Some well-known alkaloids were also found in species of *Litsea*, such as isoboldine (**10**), laurelliptine (**42**) and liriodenine (**154**) in *L. glutinosa* leaves,¹¹² actinodaphnine (**8**), boldine (**12**), laurotetanine (**13**) and N-methylaurotetanine (**14**) in *L. sebifera* leaves and branches, norboldine (laurolitsine) (**11**) and boldine (**12**) in *L. wightiana* stem bark¹³ and laurolitsine (**11**), boldine (**12**) and (+)-reticuline (**15**) in *L. leefeana* leaves.⁴⁵

A study on *Litsea laurifolia* led to the isolation of laurolitsine (**11**) from the bark and actinodaphnine (**8**), reticuline (**15**) and glaziovine (**34**) from the leaves.²⁰ From *Litsea laeta* stem bark, the alkaloids glaucine (**24**), laetanine (**210**), laetine (**211**) and N,O-dimethylharmovine (**212**) were isolated.^{113,114} In the same study, the authors isolated nordicentrine (**19**) and dicentrinone (**22**) from the leaves of *Litsea salicifolia*. Barbosa-Filho et al.⁶⁴ listed several alkaloids with anti-inflammatory activity, including glaucine (**24**).

Recently, a new bisbenziylisoquinoline alkaloid was isolated from the stem bark of *Litsea lancifolia*, the lancifoliaine (**213**), plus seven other known alkaloids: actinodaphnine (**8**), norboldine (**11**), boldine (**12**), reticuline (**15**), cassythicine (**35**), pallidine (**38**) and N-allyllaurolicsine (**214**).¹¹⁵ The alkaloids isoboldine (**10**), reticuline (**15**) and thalifoline (**215**) were isolated from *L. petiolata* bark (Fig. 23).³⁶

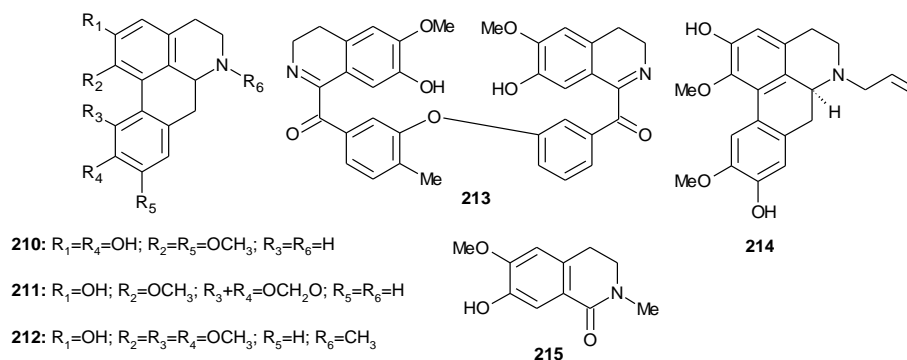


Fig. 23

In the genus *Neolitsea*, the alkaloids actinodaphnine (**8**), isoboldine (**10**), laurolicsine (**11**), boldine (**12**), reticuline (**15**), (-)-talicsimidine (**92**), (+)-cassythine (**146**), liriodenine (**154**), (+)-O-methylflavinatine (= sebiferine) (**161**), neolitacumonine (**216**), (-)-norushinsunine (**217**), N-methylactinodaphnine (**218**), (-)-anonaine (**219**) and oxogalucine (**220**) were isolated from the stem bark of *N. acuminatissima*.²³ In *Neolitsea sericea* stems and leaves, actinodaphnine (**8**), isoboldine (**10**), laurolicsine (**11**), boldine (**12**), laurotetanine (**13**), N-methylaurotetanine (**14**), reticuline (**15**), N-oxides of reticuline (**111**), norisocoridine (**181**), N-methylactinodaphnine (**218**), L-roemerine (**221**), litsericine (**222**), N-oxides of pallidine (**223**), boldine (**224**), juziphine (**225**) and N-methylaurotetanine (**226**) were found as well as (+)-corituberine (**227**).^{21,22,116-120} In the stem bark of *Neolitsea variabilissima*, L-hernovine (**228**), L-nandigerine (**229**) and L-N-methylhernovine (**230**) were found (Fig. 24).¹²¹

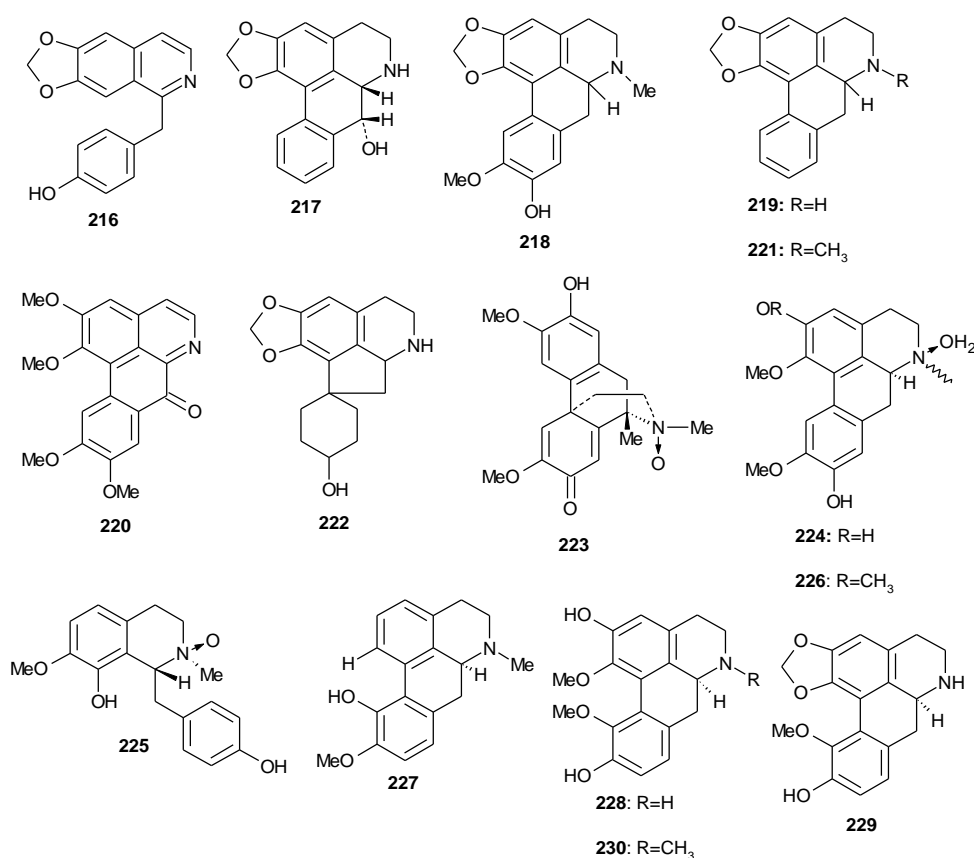


Fig. 24

Among the isoquinoline alkaloids described in the genus *Phoebe*, laurilitine (**11**), liriodenine (oxoushinsunine) (**154**), roemerine (**221**), ushinsunine (**231**) and laurdionine (**232**) were isolated from the bark and stem of *Phoebe formosana*,^{47,122} and some pentasubstituted aporphines were found in the bark of *Phoebe molicella*, i.e. norpurpureine (**233**), purpureine (**234**), preocoteine (**235**) and norpreocoteine (**236**).¹²³ From the leaves of *Phoebe pittieri*, the alkaloids liriiferine (**104**) and norliriiferine (**105**) were obtained.¹²⁴ Reticuline (**15**), norliriiferine (**105**), norpurpureine (**233**) and 1,2,3-trimethoxy-9,10-methylenodioxinoraporphine (**237**) were isolated in the bark of the same species.⁵⁹ In *P. chinensis*, several compounds with aporphine skeletons were obtained from the stem bark, including laurilitine (**11**) and laurotetanine (**13**), very common structures in Lauraceae, as

well as caaverine (**62**), liriodenine (**154**), sebiferine (=O-methylflavinatine) (**161**), anonaine (**219**) and roemerine (**221**) (Fig. 25).⁴⁶

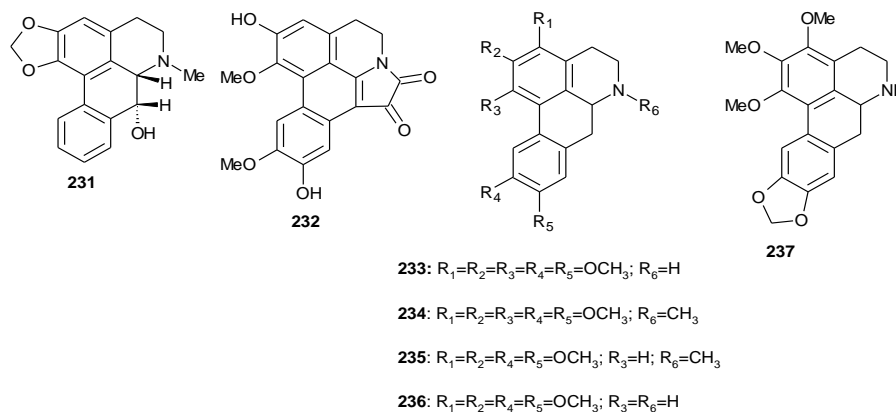


Fig. 25

In *Phoebe grandis*, the phoebegrandines A (**238**) and B (**239**), as well as phoebegrandine C, D and E were isolated from the leaves, while norboldine (**11**), boldine (**12**), laurotetanine (**13**), lindecarpine (**179**), (-)-grandine A (**240**), (-)-8, 9-dihydrolinearisine (**241**), scortechiniines A and B (**242**) and lauroformine (**243**) were obtained from the stem bark.^{48,125-127} In *P. lanceolata* stem bark, the alkaloids laurodionine (**232**) and nordelporphine (**244**) were identified, and were also observed in *P. formosana* stem bark.^{122,128,129} In *Phoebe scortechinii* leaves, the dimer tryptamine proaporphine, (-)-phoebescortechiniine and phoebegrandines A (**238**) and B (**239**) were found,¹³⁰ while in the stem the aporphine norboldine (**11**), as well as the proaporphine alkaloids (+)-scortechiniine A and B (**242**), (-)-hexahydromecambrine A (**245**) and (-)-norhexahydromecambrine A (**246**) were identified.⁴⁹ Antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* (clone 3D7) was reported for the alkaloids isolated from the stem bark of *P. tavoyana*, i.e. sebiferine (**161**) and roemerine (**221**), with IC₅₀ values of 2.76 mg/mL and 0.89 mg/mL, respectively (Fig. 26).⁶³

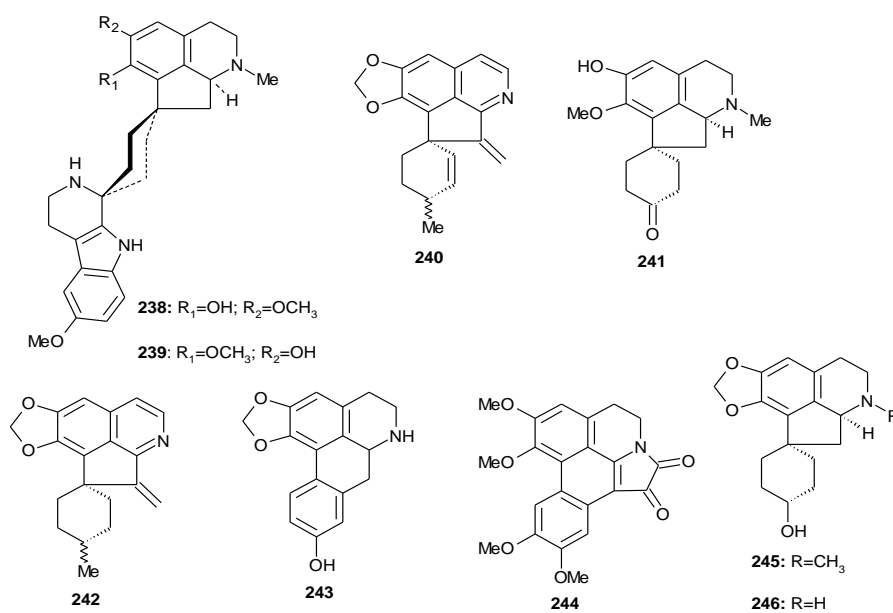


Fig. 26

Investigations into *Dehaasia triandra* afforded isocorydine (**16**) in the leaves, and some bisbenzylisoquinoline structures, including obaberine (**247**), norobaberine (**248**), 3',4'-dihydrostafasubine (**249**) and norisotetrandrine (**250**) were detected in stems of *D. triandra*.^{60,131,132} Mukhtar et al.¹³³ studied the leaves of *Dehaasia longipedicellata* and isolated five morfinandienone alkaloids, including (-)-pallidine (**38**), (+)-pallidine (**82**), (-)-sinoacutine (**165**), (+)-milonine (**251**) and (-) 8,4-dehydrosalutaridine (**252**) (Fig. 27).

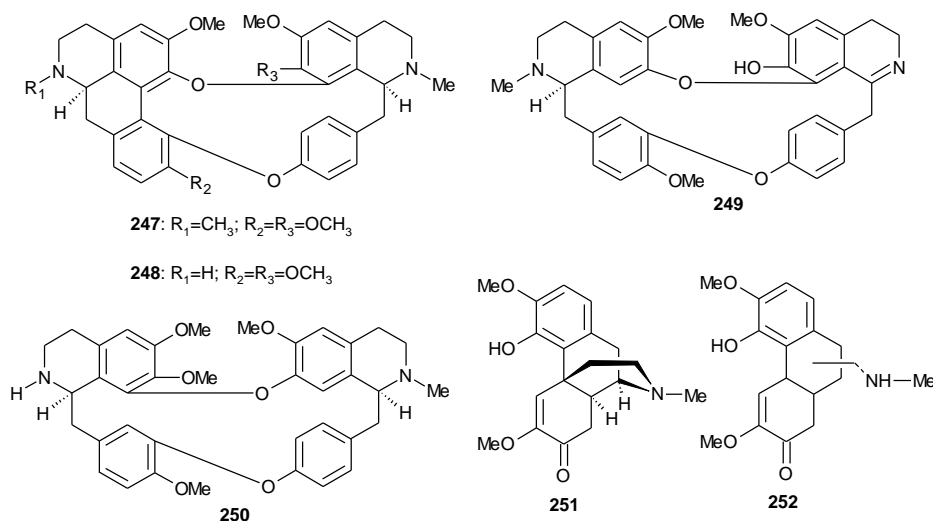


Fig. 27

From the stem bark of *Actinodaphne pruinosa* a new alkaloid was isolated, (+)-N-(2-hydroxypropyl)lindecarpine (**253**), which showed cytotoxicity against P-388 leukaemia cells with an IC_{50} of 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$.⁴⁰ Additionally, the alkaloids (+)-norboldine (**11**), (+)-boldine (**12**), (+)-lindecarpine (**179**) and (+)-methyllindecarpine (**180**) were obtained.⁴⁰ In *A. sesquipedalis*, the presence of dicentrine (**9**) was reported in the stem bark,²⁴ while in *A. nitida* lauroiltsine (**11**) and boldine (**12**) were found in the stem bark and leaves (Fig. 28).³⁹

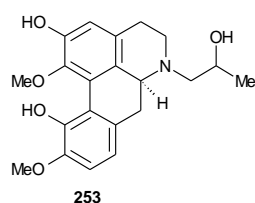


Fig. 28

Two morphinandienone structures were obtained from *Beilschmiedia oreophila* stems and bark, i.e. oreobiline (**254**) and 6-epioreobiline.¹³⁴ From *B. brevipes* leaves, the benzylisoquinoline alkaloids (6,7-dimethoxy-4-methylisoquinolinyl)-(4'-methoxyphenyl)-

metanone (**255**) and *O,O*-dimethylannoherine (**256**) were obtained.¹³⁵ Recently, in *Beilschmiedia kunstleri*, the alkaloids (+)-norboldine (**11**), (-)-pallidine (**38**) and (+)-*N*-methylisococlaurine (**257**) from leaves; (-)-isocaryachine (**121**), (+)-nornuciferine (**151**), noraterosperminine (**258**) and (+)-*N*-demethylphyllocaryptine (**259**) were isolated from stem bark; (+)-boldine (**12**), (+)-laurotetanine (**13**) and (+)-cassythicine (**35**) were obtained from vegetal parts (Fig. 29).^{50,136}

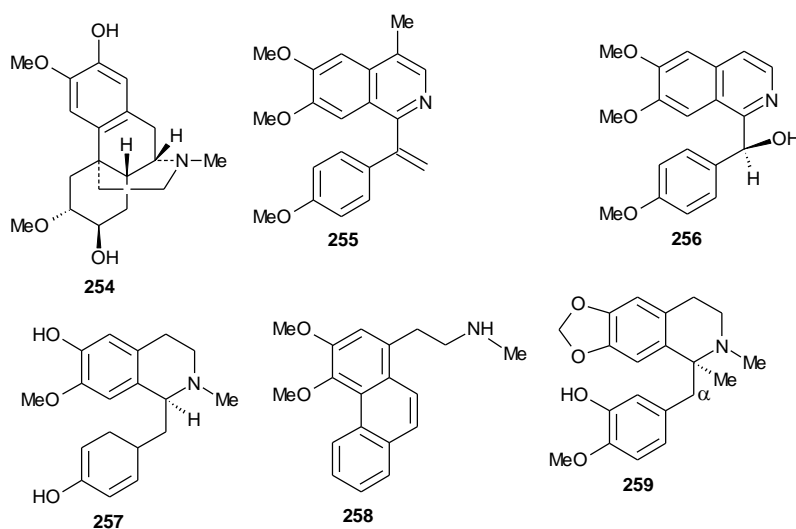


Fig. 29

In the genus *Machilus*, the alkaloid (+)-L-reticuline (**15**) was found in *M. thumbergii*, D,L-coclaurine (**55**) in *M. kusanoi* and *M. macranta*; (+)-L-laudanidine (**95**) in *M. obovatifolia* and *M. arisanensis*; (-)-L-*N*-noramepavine (**260**) in *M. kusanoi*, *M. pseudolongifolia*, *M. thumbergii*, *M. obovatifolia*, *M. arisanensis* and *M. zuihoensis*; D,L-*N*-norarmepavine (**261**) in *M. pseudolongifolia*, *M. thumbergii*, *M. obovatifolia*, *M. arisanensis* and *M. zuihoensis*.¹³⁷⁻¹⁴² From *M. glauscescens* leaves, the oxoaporphine alkaloids machigline (1,2-methylenedioxy-9-hydroxy-10-methoxyoxoaporphine) (**262**) and ateroline (**96**) were obtained (Fig. 30).¹⁴³

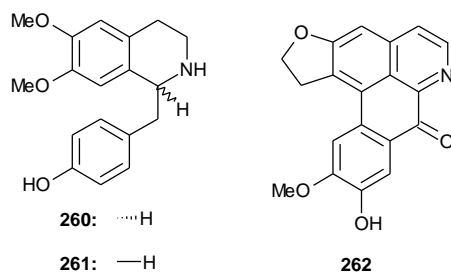


Fig. 30

Studies performed on *Alseodaphne* species led to the identification of (+)-reticuline (**15**), a mixture of coclaurine (**55**) isomers in a proportion of 3:1 ((+)-coclaurine: (-)-coclaurine) and (-)-N-norarmepavine (**261**) in *A. archboldiana*,¹⁴⁴ while in *A. semicarpifolia*, the C-4 hydroxylated aporphine srilankine (**263**) was obtained.¹⁴⁵ In *A. corneri* stem bark, a new bisbenzylisoquinoline alkaloid, 3',4'-dihydronorstephasubine (**264**), together with two known structures, norstephasubine (**265**) and girolidine (**266**) we found; moderate vasorelaxation effects were identified for **264** and **266** in rat aorta assays.¹⁴⁶ From the roots of the same species, the bisbenzylisoquinoline alkaloids norstephasubine (**265**), (-)-girolidine (**266**), (+)-norlimacusine (**267**) and (+)-stephasubine (**268**) were isolated (Fig.31).¹⁴⁷

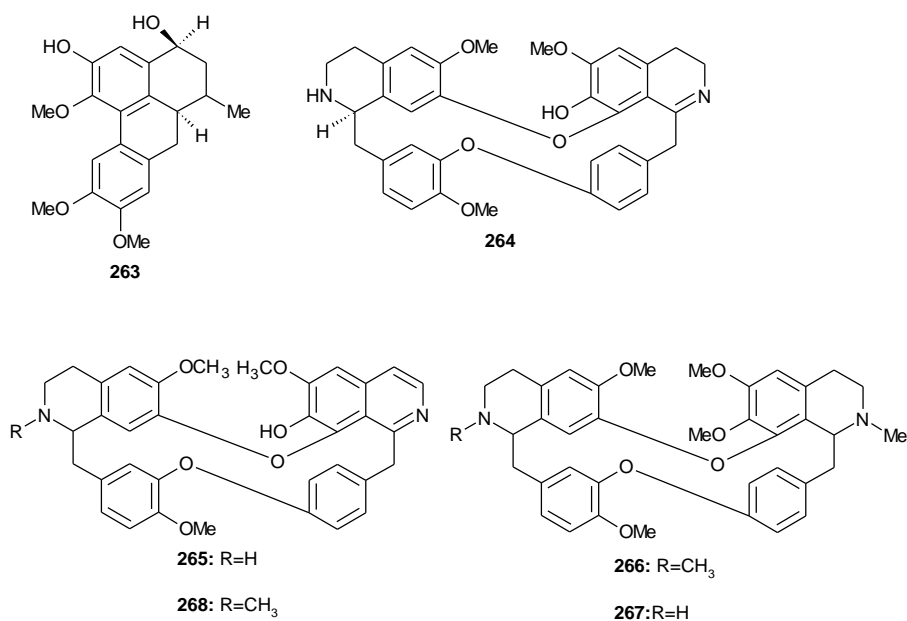


Fig. 31

Among the alkaloids described in *Alseodaphne perakensis*, N-methyl-2,3,6-trimethoxymorphinandien-7-one (**269**) has been described as the main alkaloid in leaves, along with a mixture of other alkaloids in small quantities, including N-methyl-2,3,6-trimethoxymorphinandien-7-one N-oxide (**270**).^{148,149} From the stem bark of the same species, the alkaloids α' -oxoperakensimines A (**271**), B (**272**) and C (**273**) were isolated. In the same study, vasorelaxation activity was also reported for both substances using rat aorta assays.¹⁵⁰ Recently, a new alkaloid in this species was observed, also present in the stem bark, i.e. N-cyanomethylnorboldine (**274**), in addition to the known structures, N-methylaurotetanine (**14**) and norboldine (**11**) (Fig. 32).⁴¹

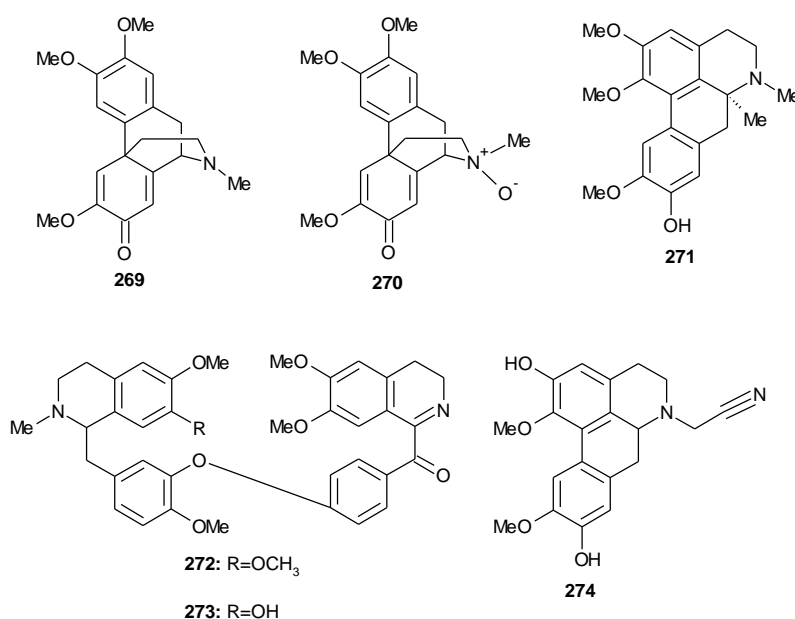


Fig. 32

Some genera of Lauraceae have had few reports regarding the occurrence of alkaloids in their species. For example in, *Sassafras albidum* root bark, structures common in Lauraceae, such as isoboldine (**10**), norboldine (**11**), boldine (**12**) and reticuline (**15**) have been described, as well as norcinnamolaurine (**107**) and cinnamolaurine (**142**).³⁸ Coclaurine

(55), norcinnamolaurine (107) and corituberine (227) were isolated from the stems of *Mezilaurus synandra*.¹⁵¹ Le Quesne et al.¹⁵² obtained laurelliptine (42), an aporphine alkaloid, from the leaves and branches of *Nectandra rigida*. In *Ravensara aromatica* stem bark, the quaternary chloride base of N-methylisocorydine (275) was observed.¹⁵³ From the ethanolic extract of *Pleurothyrium cinereum* leaves, the oxoaporphines thalicminine (56) and pleurotirine (276) were isolated (Fig. 33).¹⁵⁴

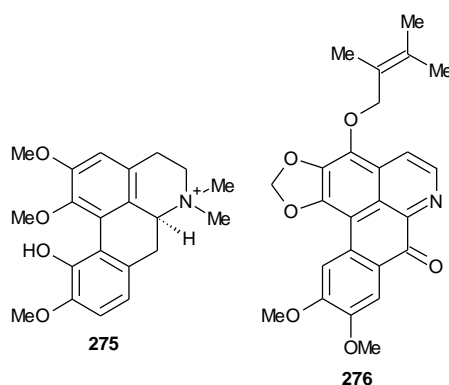


Fig. 33

A number of common Lauraceae alkaloids have been found in *Laurus nobilis*, such as (+)-actinodaphnine (8), (+)-boldine (12), (+)-reticuline (15), (+)-neolitsine (26), (+)-isodomeesticine (72), (+)-cryptodorine (100), (+)-launobine (149), (+)-N-methylactinodaphnine (218), (+)-nandigerine (229), (+)-norisodomeesticine (277) from the leaves; actinodaphnine (8), reticuline (15) and launobine (149) from the branches; and actinodaphnine (8), (+)-reticuline (15), (+)-launobine (149) and (+)-nandigerine (229) from the roots (Fig. 34).¹⁹

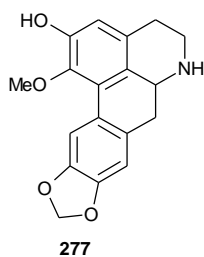


Fig. 34

Three related alkaloids were found in *Licaria arminiaca* stem bark, i.e. bracteoline (278), O-methylbracteoline and α -dehydroreticuline (279); this was the first report of these structures in this genus (Fig. 35).¹⁵⁵

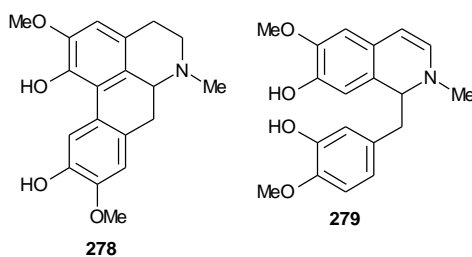


Fig. 35

3 Indole alkaloids

The indole substances reported in Lauraceae include cecilin (280), a β -carboline alkaloid isolated from the trunk of *Aniba santalodora*¹⁵⁶ and triptophol-5-O- β -D-glycopiranoside (281), obtained from *Ocotea minarum* fruits (Fig. 36).¹⁵⁷

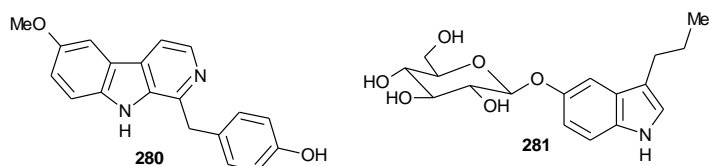


Fig. 36

In *L. petiolata*, two indole alkaloids were isolated from the bark, identified as aribine (= harmane) (**282**) and norharmine (**283**).³⁶ Other β -carboline structures, i.e. the daibucarboline A (**284**), B (**285**) and C (**286**), were obtained from *Neolitsea daibuensis* roots. In the same study, moderate antiinflammatory activity of daibucarboline A (**284**) was observed due to the inhibition of nitrite-producing cell lines, with an IC_{50} of 18.41 μ M (Fig. 37).¹⁵⁸

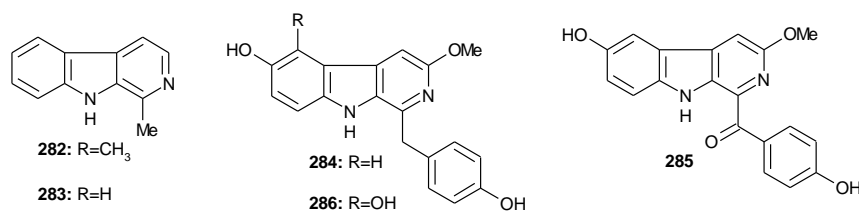


Fig. 37

4 Pyridine alkaloids

Pyridine type alkaloids have been observed in Lauraceae, but with less frequency, as well as some indole alkaloids. In *Aniba rosaeodora*, the presence of two tertiary structures, anibine (**287**)¹⁵⁹ and duckein (**288**)¹⁶⁰ has been reported, both obtained from the stem. Anibine (**287**) was also found in *Aniba fragrans* stems;¹⁶¹ this alkaloid was reported to possess analeptic activity (Fig.38).¹⁶²

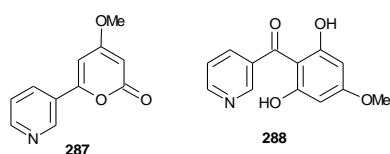


Fig. 38

5 Other classes of alkaloids

Besides isoquinoline, indole and pyridine alkaloids, the Lauraceae family also presents some other less common skeletons. Criptopleurine (**289**), a phenanthroquinolizidine, was observed in *C. laevigata*, and showed good activity against human nasopharyngeal epidermoid carcinoma (KB) cells with an IC_{50} of 5.10 mg/mL.¹⁶³ The indolizidine quaternary alkaloid anibamine, elucidated as 6,8-didec-(1*Z*)-eni-5,7-dimethyl-2,3-dihydro-1*H*-indolizidine (**290**), was obtained from *Aniba panurensis* as a salt of trifluoroacetic acid,¹⁶⁴ and from another *Aniba* species (Fig. 39).¹⁶⁵

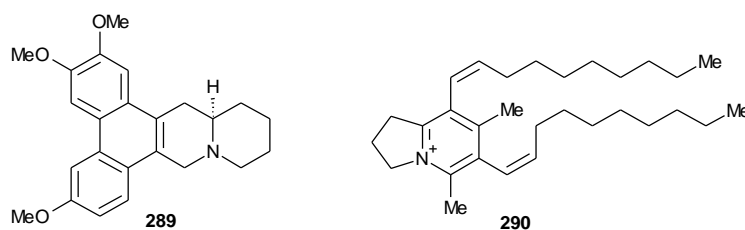


Fig. 39

The dibenzopyrrolidine alkaloids cryptowoline (**291**), O-methyl-cryptowoline (**292**), cryptowolinol (**293**) and cryptowolidine (**294**) were observed in *Cryptocarya phyllostemon* stem bark, while cryptaustoline (**295**) and cryptowolinol (**293**) were obtained from *Cryptocarya oubatchensis* stem bark and leaves.¹⁶⁶ In *Litsea cubeba*, two dibenzopyrrolidine structures, i.e. (-)-litcubine (**296**) and (-)-litcubinine (**297**) were isolated (Fig. 40).¹⁶⁷

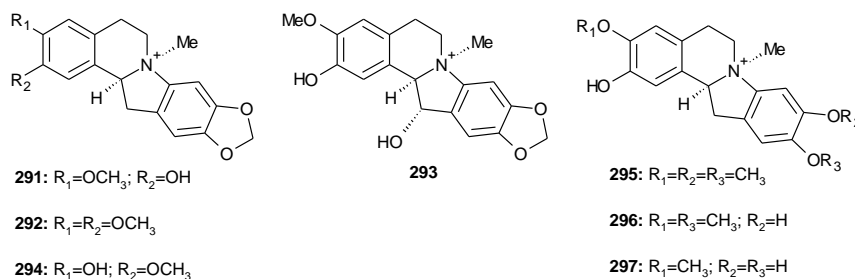


Fig. 40

Andrianaivoravelona et al.¹⁶⁸ isolated a tryptamine-derived alkaloid in a methanolic extract from the stem bark of *Ravensara anisata*, *N*-(*p*-coumaroyl)-tryptamine (**298**) (Fig. 41).

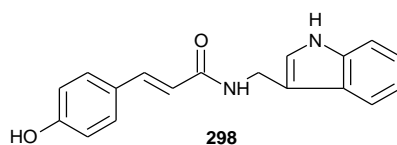


Fig. 41

In *Aniba riparia*, the *N*-benzoyltyramines riparin I (**299**), riparin II (**300**) and riparin III (**301**) were isolated.¹⁶⁹ Antimicrobial activity was reported for all three substances,¹⁷⁰ as well as antinociceptive activity for riparin I (**299**),¹⁷¹ anxiolytic activity for riparin II (**300**) and III (**301**), and antidepressant activity for riparin III (**301**), dependent on its interaction with serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems.¹⁷²⁻¹⁷⁵ Castelo-Branco et al.¹⁷⁶ observed in pharmacological studies that the riparins I (**299**), II (**300**) and III (**301**) induced relaxation of contractions in guinea pig ileum and rat uterus produced by acetylcholine and histamine and oxytocin and bradykinin, respectively (Fig. 42).

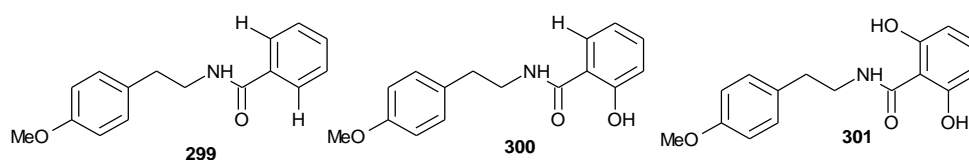


Fig. 42

In study performed in *Machilus yaoshansis* stem bark, two triterpene glycosylated alkaloids were isolated, machilaminoside A (**302**) and machilaminoside B (**303**), as new substances in this species (Fig. 43).¹⁷⁷

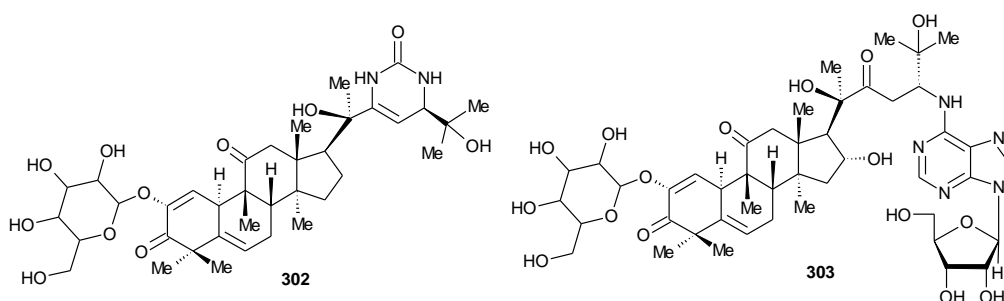


Fig. 43

6 Conclusion

According to the data presented here, it can be seen that the Lauraceae family presents a great number of alkaloids with wide variety, with over 300 structures in 21 genera described in the literature. Isoquinoline alkaloids are reported as the major class with about 287 compounds, as well as seven indoles, seven dibenzopyrrolidines, three pyridines, three benzoyltyamines, two glycoside triterpene alkaloids, one phenanthroquinolizidine, one indolizidine and one tryptamine derivative. The isoquinoline alkaloids are present in all genera reported in this review, and represent the major class in Lauraceae. However, other

classes are reported in this family, some of them with only a few structures restricted to a specific genus.

Concerning the indole alkaloids, one structure has been mentioned in *Aniba santalodora*, one in *Ocotea minarum*, two in *Litsea petiolata* and three in *Neolitsea daibuensis*. Another class present in Lauraceae is the pyridine alkaloids, represented by three structures restricted to *Aniba rosaeodora*. Among the dibenzopyrrolidines, five structures are present in *Cryptocarya oubatchensis* and *Cryptocarya phyllostemon* and two have been reported in *Litsea cubeba*. Other alkaloid classes are also present in Lauraceae, such as the N-benzoyltyramines riparins I, II and III, observed in *Aniba riparia*, an indolizidine in *Aniba panurensis*, a quinolizidine in *Cryptocarya laevigata*, a tryptamine derivative in *Ravensara anisata* and two glycoside triterpene alkaloids in *Machilus yaoshansis*.

In order to evaluate a possible grouping taxonomic effect on the alkaloid composition, Hierarchical Cluster Analysis (HCA) was performed using R software, version 3.0.1. The alkaloid frequency was analysed in the species according to data in the literature. In the HCA analysis, classes were separated into two groups. The first group was formed by *Ocotea* grouping with the other genera that present major isoquinoline alkaloids, including *Cassytha*, *Lindera* and *Phoebe* (Fig. 43). These genera have only isoquinoline alkaloids of different subclasses, is soon expected to be grouped. The genus *Ocotea* is not in this group, but very close to it since this genus also presents an indole structure and several isoquinolines.

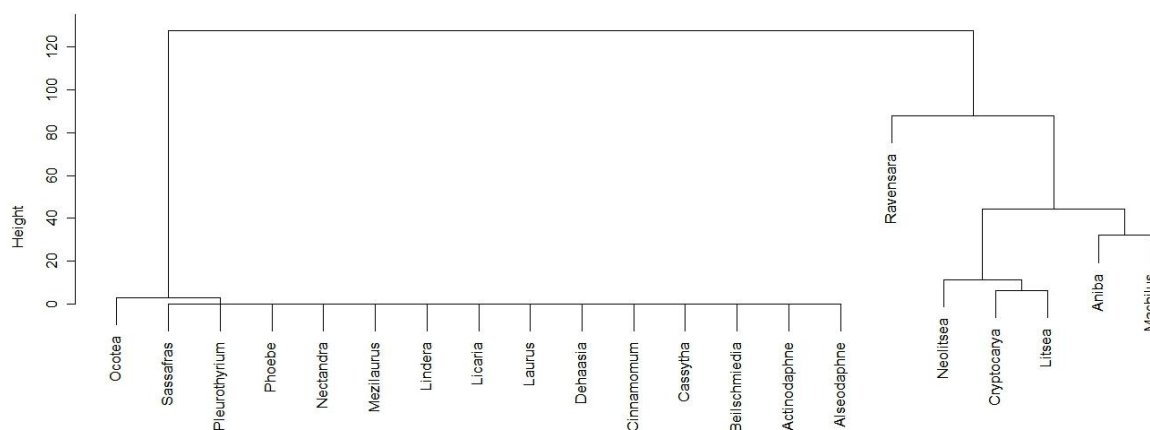


Fig. 44. HCA analysis of Lauraceae alkaloid classes.

The second largest group is formed by the genera that present other classes besides isoquinolines in their composition, such as *Ravensara*, which presents a glycoside tryptamine derivative. *Litsea* and *Cryptocarya* are grouped together due to the presence of dibenzopyrrolidine structures found in both genera. *Aniba* and *Machilus* are grouped together due the presence of exclusive alkaloid classes in their composition, since *Aniba* presents pyridine and benzoyltyramine structures, and *Machilus* contains glycoside triterpene alkaloids.

The structures reported in this review predominantly belong to the isoquinoline class, which is composed of 287 structures distributed in all genera mentioned. The isoquinoline alkaloids were separated into subclasses with 148 aporphines, 47 benzyloisoquinolines, 23 pavinines, 21 proaporphines, 21 bisbenzyloisoquinolines, 18 morphinandienones, five simple isoquinolines and four phenathrenes (Fig. 44). There are eight common isoquinoline structures, i.e. aporphine actinodaphnine (**8**), dicentrine (**9**), isoboldine (**10**), laurolitine (norboldine) (**11**), boldine (**12**), laurotetanine (**13**), N-methylaurotetanine (**14**) and isocorydine (**16**), and one benzyloisoquinoline, reticuline (**15**), that are present in several species of Lauraceae (Fig. 44).

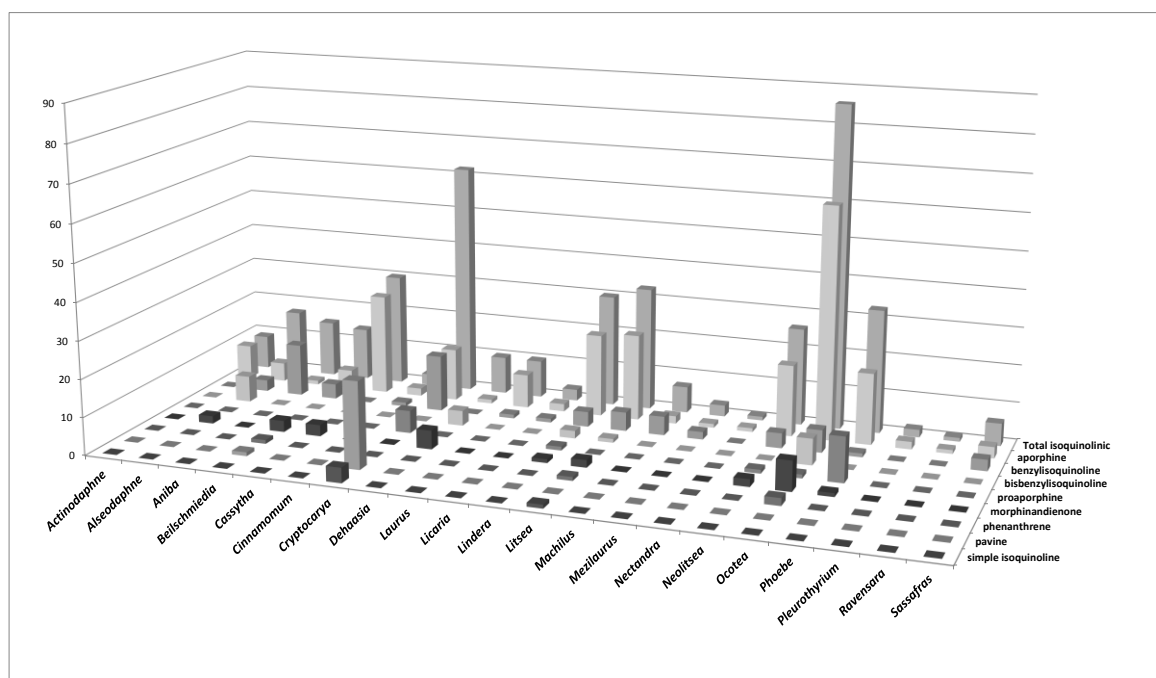


Fig. 45: Isoquinoline groups of alkaloids present in Lauraceae genera.

The genus *Ocotea* is the most studied, with 87 alkaloids described, including 86 isoquinolines and one indole. *Ocotea minarum* is the species with largest number of described isoquinoline structures, with 14 aporphine alkaloids. The *Ocotea* alkaloids are mostly aporphines, including 62 structures. Other genera rich in aporphine alkaloids are *Cassytha*, *Lindera*, *Litsea*, *Neolitsea* and *Phoebe* with 27, 22, 23 and 19 structures, respectively.

Another genus with many reported structures is *Cryptocarya*, with 68 alkaloids, including 62 isoquinolines, five dibenzopyrrolidines and one quinolizidine. *Cryptocarya chinensis* is the most studied species in this genus, with 39 structures described, among then 23 pavine skeletons, a subgroup of isoquinoline alkaloids almost restricted to the genus *Cryptocarya*. The pavine structure (-)-isocaryachine (**121**) has also been observed in *Beilschmiedia kunstleri*.

Benzyloisoquinoline alkaloids have been reported mainly in *Aniba* with 14 substances. This subclass is also present in *Cryptocarya* species with 15 alkaloids reported, while the proaporphines are mostly found in *Phoebe*, with 12 structures present in *Phoebe grandis* and

Phoebe scortechinii. The morphidianone structures are observed in more quantity in *Ocotea* and *Dehaasia* with eight and five structures, respectively, while the bisbenzylisoquinolines are described mainly in *Alseodaphne* and *Ocotea*, with seven structures in each genus. Small quantities of others isoquinoline subclasses have also been observed, among them four phenanthrenes, one in *Beilschmiedia*, one in *Litsea* and two in *Ocotea*. Simple isoquinolines have been detected in *Cryptocarya* and *Litsea* with four and one, respectively.

The pavine structures were observed in *Cryptocarya* and *Beilschmiedia*, while *Dehhasia* and *Alseodaphne* present bisbenzylisoquinoline alkaloids in high proportions when compared with the other genera that possess this type of alkaloid. The genera *Aniba*, *Machilus* and *Mezilaurus* contain a number of benzylisoquinoline structures. On the other hand, the genus *Phoebe* presents a great quantity of proaporphine alkaloids. Other genera with small quantities of proaporphine alkaloids are *Ocotea*, *Neolitsea* and *Lindera* with one structure each, and *Cryptocarya*, with six proaporphine alkaloids.

The genera *Ravensara*, *Pleurothyrium* and *Nectandra* have few aporphine alkaloids, while *Cassytha* and *Laurus* have mainly aporphines and a few structures belonging to the morphinandienone and benzylisoquinoline subclasses.

There are some genera with few alkaloids described, such as *Cinnamomum*, *Mezilaurus*, *Nectandra*, *Pleurothyrium* and *Ravensara*, which have one to three alkaloids each. Perhaps these genera do not possess the biosynthetic routes to alkaloids in their secondary metabolism, or are just less studied than other genera.

Some of these substances have restricted distribution, showing the possibility of their use as chemical markers, and thereby may play an important role in chemotaxonomy. Pharmacological properties have been observed, such as the cytotoxicity of actinodaphnine (**8**), dicentrine (**9**) and boldine (**12**) and the antiinflammatory effect of the latter, in addition to the potent central nervous system depressant effect observed for reticuline (**15**).

7 References

1. V. C. Souza and H. Lorenzi, *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.*, Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2005.
2. The Plant List. Version 1., <http://www.theplantlist.org/>, Accessed 08/03/2013, 2013.
3. S. M. W. Zanin and A. L. L. Lordello, *Química Nova*, 2007, **30**, 92-98.
4. P. T. B. Sampaio, I. D. K. Ferraz and I. L. C. Camargo, *Manual de Sementes da Amazônia*, 2003, 1-6.
5. L. d. F. S. Sampaio, J. G. S. Maia, A. M. de Parijós, R. Z. de Souza and L. E. S. Barata, *Phytotherapy Research*, 2012, **26**, 73-77.
6. J. G. S. Maia, E. H. A. Andrade, H. A. R. Couto, A. C. M. Silva, F. Marx and C. Henke, *Química Nova*, 2007, **30**, 1906-1910.
7. C. A. Marques, *Floresta e Ambiente*, 2001, **8**, 195-206.
8. S. Apers, A. Vlietinck and L. Pieters, *Phytochemistry Reviews*, 2003, **2**, 201-217.
9. O. R. Gottlieb, *Phytochemistry*, 1972, **11**, 1537-1570.
10. A. T. Henriques, V. A. Kerber and P. R. H. Moreno, in *Farmacognosia: da planta ao medicamento.*, eds. C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosman, J. C. P. Mello, L. A. Mentz and P. Petrovick, Ed. Universidade UFRS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis 1999, pp. 641 - 656.
11. W. J. Houlihan, *Part One. In: The chemistry of heterocycle compounds: a series of monographs.* Wiley-Interscience, Taylor, 1972.
12. P. M. Dewick, *Medicinal natural products: a biosynthetic approach.* John Wiley & Sons, Chichester, 2009.
13. H. Uprety, D. S. Bhakuni and M. M. Dhar, *Phytochemistry*, 1972, **11**, 3057-3059.
14. M. P. Cava, K. V. Rao, B. Douglas and J. A. Weisbach, *Journal of Organic Chemistry*, 1968, **33**, 2443-2446.
15. W. Yang-Chang, C. Ya-Chieh, C. Fang-Rong and C. Yuan-Yng, *Phytochemistry*, 1997, **46**, 181-184.
16. C. Stevigny, S. Block, M. C. De Pauw-Gillet, E. de Hoffmann, G. Llabres, V. Adjakidje and J. Quetin-Leclercq, *Planta Medica*, 2002, **68**, 1042-1044.
17. T.-H. Tsai, G.-J. Wang and L.-C. Lin, *Journal of Natural Products*, 2008, **71**, 289-291.
18. T.-J. Hsieh, T.-Z. Liu, F.-J. Lu, P.-Y. Hsieh and C.-H. Chen, *Food and Chemical Toxicology*, 2006, **44**, 344-354.
19. B. Pech and J. Bruneton, *Journal of Natural Products*, 1982, **45**, 560-563.
20. M. Leboeuf, A. Cave, J. Provost and P. Forgacs, *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, 1979, **13**, 262-267.
21. T. Nakasato, S. Asada and Y. Koezuka, *Yakugaku Zasshi*, 1966, **86**, 129-134.
22. S.-S. Lee, Y.-C. Lai, C.-K. Chen, L.-H. Tseng and C.-Y. Wang, *Journal of Natural Products*, 2007, **70**, 637-642.
23. F.-R. Chang, T.-J. Hsieh, T.-L. Huang, C.-Y. Chen, R.-Y. Kuo, Y.-C. Chang, H.-F. Chiu and Y.-C. Wu, *Journal of Natural Products*, 2002, **65**, 255-258.
24. L. B. Din, A. H. A. Hadi and A. Latiff, *ACGC Chemical Research Communications*, 1994, **2**, 5-6.
25. R. L. Huang, C. C. Chen, Y. L. Huang, J. C. Ou, C. P. Hu, C. F. Chen and C. M. Chang, *Planta Medica*, 1998, **64**, 212-215.
26. V. Vecchiatti, C. Casagrande and G. Ferrari, *Farmaco Sci*, 1977, **32**, 767-769.
27. V. Vecchiatti, C. Casagrande, G. Ferrari and G. Severini Ricca, *Farmaco Sci*, 1979, **34**, 829-840.

28. E. D. C. Barrera and L. E. C. Suárez, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2009, **37**, 522-524.
29. S. M. W. Zanin, O. G. Miguel, D. P. Montrucchio, C. K. Costa, J. B. Lagos and A. L. L. Lordello, *Mudas de ocotea puberula (Lauraceae): Identificação e monitoramento de alcaloides aporfinoides*, 2011, **34**, 743-747.
30. D. P. Montrucchio, O. G. Miguel, S. M. W. Zanin, G. A. Da Silva, A. M. Cardozo and A. R. S. Santos, *Planta Medica*, 2012, **78**, 1543-1548.
31. W. S. Garcez, M. Yoshida and O. R. Gottlieb, *Phytochemistry*, 1995, **39**, 815-816.
32. J. A. Bravo, M. Sauvain, L. Balderrama, C. Moretti, P. Richomme and J. Bruneton, *Revista Boliviana de Química*, 1996, **13**, 19-22.
33. S. R. Johns, J. A. Lamberton and A. A. Sioumis, *Australian Journal of Chemistry*, 1966, **19**, 2331-2338.
34. F.-W. Lin, P.-L. Wu and T.-S. Wu, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2001, **49**, 1292-1294.
35. Q. Z. Zhao, Y. M. Zhao and K. J. Wang, *Yao Xue Xue Bao*, 2005, **40**, 931-934.
36. H. Omar, M. A. Nafiah, M. R. Mukhtar, K. Awang and A. H. A. Hadi, *Malaysian Journal of Science*, 2010, **29**, 269-280.
37. J. H. Yariwake Vilegas, O. R. Gottlieb, M. A. C. Kaplan and H. E. Gottlieb, *Phytochemistry*, 1989, **28**, 3577-3578.
38. B. K. Chowdhury, M. L. Sethi, H. A. Lloyd and G. J. Kapadia, *Phytochemistry*, 1976, **15**, 1803-1804.
39. S. R. Johns, J. A. Lamberton and A. A. Sioumis, *Australian Journal of Chemistry*, 1969, **22**, 2257.
40. T. Rachmatiah, M. R. Mukhtar, M. A. Nafiah, M. Hanafi, S. Kosela, H. Morita, M. Litaudon, K. Awang, H. Omar and A. H. A. Hadi, *Molecules*, 2009, **14**, 2850-2856.
41. M. A. Nafiah, M. R. Mukhtar, H. Omar, K. Ahmad, H. Morita, M. Litaudon, K. Awang and A. H. A. Hadi, *Molecules*, 2011, **16**, 3402-3409.
42. M. Tomita and M. Kozuka, *Yakugaku Zasshi*, 1964, **84**, 365-367.
43. G. X. Chou, N. Nakamura, C. M. Ma, Z. T. Wang and M. Hattori, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2005, **3**, 272-275.
44. C. Zhang, Nakamura, N., Tewtrakul, S., Hattori, M., Sun, Q., Wang, Z., Fujiwara, T., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2002, **50**, 1195-1200.
45. J. A. Lamberton and V. N. Vashist, *Australian Journal of Chemistry*, 1972, **25**, 2737-2738.
46. V. H. Nguyen and V. T. Nguyen, *Tap Chi Hoa Hoc*, 2004, **42**, 205-209.
47. S.-T. Lu and T.-L. Su, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 1973, **20**, 87-93.
48. M. R. Mukhtar, M.-T. Martin, M. Domansky, M. Pais, A. Hamid, A. Hadi and K. Awang, *Phytochemistry*, 1997, **45**, 1543-1546.
49. M. R. Mukhtar, A. H. Hadi, D. Rondeau, P. Richomme, M. Litaudon, M. R. Mustafa and K. Awang, *Natural Product Research, Part A: Structure and Synthesis*, 2008, **22**, 921-926.
50. A. Mollataghi, A. H. A. Hadi and S.-C. Cheah, *Molecules*, 2012, **17**, 4197-4208.
51. I. R. C. Bick, N. W. Preston and P. Potier, *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 1972, **12**, 4596-4597.
52. P. A. Babcock and A. B. Segelman, *J Pharm Sci*, 1974, **63**, 1495-1496.
53. M. Tomita, S.-T. Lu, P.-K. Lan and F.-M. Lin, *Yakugaku Zasshi*, 1965, **85**, 593-596.
54. N. H. Lajis, A. M. Sharif, R. Kiew, M. N. Khan and Z. Samadi, *Pertanika*, 1992, **15**, 175-177.
55. S.-T. Lu and F.-M. Lin, *Yakugaku Zasshi*, 1967, **87**, 878-879.

56. Z. S. Ferreira, O. R. Gottlieb and N. F. Roque, *Biochemical Systematics and Ecology*, 1980, **8**, 51-54.
57. J. M. Barbosa-Filho, M. R. W. Vargas, I. G. Silva, I. S. Franca, L. C. S. L. Morais, E. V. L. Da Cunha, M. S. Da Silva, M. F. V. Souza, M. C. O. Chaves, R. N. Almeida and M. F. Agra, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 1999, **71**, 231-238.
58. M. A. Medeiros, X. P. Nunes, J. M. Barbosa-Filho, V. S. Lemos, J. F. Pinho, D. Roman-Campos, I. A. de Medeiros, D. A. Araujo and J. S. Cruz, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009, **379**, 115-125.
59. C. Oscar Castro, V. José López and G. Armando Vergara, *Phytochemistry*, 1985, **24**, 203-204.
60. S. T. Lu and E. C. Wang, *Taiwan Yaoxue Zazhi*, 1977, **29**, 49-53.
61. N. C. Franca, A. M. Giesbrecht, O. R. Gottlieb, A. F. Magalhães, E. G. Magalhães and J. G. S. Maia, *Phytochemistry*, 1975, **14**, 1671-1672.
62. S. Hoet, C. Stévigny, S. Block, F. Opperdoes, P. Colson, B. Baldeyrou, A. Lansiaux, C. Bailly and J. Quetin-Leclercq, *Planta Medica*, 2004, **70**, 407-413.
63. H. Omar, B. Elya, M. A. Nafiah, K. Awang, M. R. Mukhtar and A. H. A. Hadi, presented in part at the *Kamphaengsaen Internationa Natural Products Symposium: The Relationship between Living Organisms and Enviroment, Bangkok, Thailand*, 2010.
64. J. M. Barbosa-Filho, M. R. Piuvezam, M. D. Moura, M. S. Silva, K. V. B. Lima, E. V. L. da-Cunha, I. M. Fechine and O. S. Takemura, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2006, **16**, 109-139.
65. Q. Zhao, Y. Zhao and K. Wang, *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, **106**, 408-413.
66. P. Rahman, I. Muhammad, H. C. M. and A. Jabbar, *Bangladesh Journal of Botany*, 1988, **17**, 25-31.
67. L. C. S. L. Morais, J. M. Barbosa-Filho and R. N. Almeida, *Journal of Ethnopharmacology*, 1998, **62**, 57-61.
68. K. L. G. Dias, C. da Silva Dias, J. M. Barbosa-Filho, R. N. Almeida, N. de Azevedo Correia and I. A. Medeiros, *Planta Medica*, 2004, **70**, 328-333.
69. M. P. Cava, Y. Watanabe, K. Bessho, M. J. Mitchell, A. I. daRocha, B. Hwang, B. Douglas and J. A. Weisbach, *Tetrahedron Letters*, 1968, **9**, 2437-2442.
70. M. P. Cava and A. Venkateswarlu, *Tetrahedron*, 1971, **27**, 2639-2643.
71. L. C. Pabon and L. E. Cuca, *Química Nova*, 2010, **33**, 875-879.
72. R. d. A. Ribeiro, L. Garcez do Carmo, I. Vladimirova, N. H. Jurkiewicz and A. Jurkiewicz, *European Journal of Pharmacology*, 2003, **470**, 37-43.
73. C. Botega, F. M. Pagliosa, V. d. S. Bolzani, M. Yoshida and O. R. Gottlieb, *Phytochemistry*, 1993, **32**, 1331-1333.
74. I. G. da Silva, J. M. Barbosa-Filho, M. S. da Silva, C. D. G. de Lacerda and E. V. L. da-Cunha, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2002, **30**, 881-883.
75. B. Gilbert, M. E. A. Gilbert, M. M. De Oliveira, O. Ribeiro, E. Wenkert, B. Wickberg, U. Hollstein and H. Rapoport, *Journal of the American Chemical Society*, 1964, **86**, 694-696.
76. M. P. Cava, M. Behforouz and M. J. Mitchell, *Tetrahedron Letters*, 1972, **13**, 4647-4649.
77. H. Guinaudeau, M. Leboeuf and A. Cavé, *Journal of Natural Products*, 1983, **46**, 761-835.
78. H. Guinaudeau, M. Leboeuf and A. Cavé, *Journal of Natural Products*, 1979, **42**, 325-360.
79. F. Baralle, N. Schvarzberg, M. J. Vernengo, G. Y. Moltrasio and D. Giapello, *Phytochemistry*, 1973, **12**, 948-949.

80. F. Baralle, N. Schwarzberg, M. Vernengo and J. Comin, *Experientia*, 1972, **28**, 875-876.
81. D. P. Montrucchio, O. G. Miguel, S. M. W. Zanin, G. A. da Silva, A. M. Cardozo and A. R. S. Santos, *Planta Medica*, 2012, **78**, 1543-1548.
82. B.-N. Zhou, R. K. Johnson, M. R. Mattern, X. Wang, S. M. Hecht, H. T. Beck, A. Ortiz and D. G. I. Kingston, *Journal of Natural Products*, 2000, **63**, 217-221.
83. O. Castro and I. Ruiz, *International Journal of Pharmacognosy*, 1994, **32**, 406-408.
84. J. A. Lopez, W. Barillas, J. Gomez-Laurito, F. T. Lin, A. J. Al-Rehaily, M. H. M. Sharaf and P. L. Schiff Jr, *International Journal of Pharmacognosy*, 1996, **34**, 145-147.
85. V. Vecchietti, C. Casagrande, G. Ferrari, B. Danieli and G. Palmisano, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1981, **0**, 578-581.
86. P. J. Hearst, *The Journal of Organic Chemistry*, 1964, **29**, 466-470.
87. H. Guinaudeau, M. Leboeuf and A. Cavé, *Journal of Natural Products*, 1988, **51**, 389-474.
88. H. Guinaudeau, M. Leboeuf and A. Cavé, *Journal of Natural Products*, 1994, **57**, 1033-1135.
89. F. R. Garcez, A. G. Francisca da Silva, W. S. Garcez, G. Linck, M. C. de Fatima Matos, E. C. S. Santos and L. M. M. Queiroz, *Planta Medica*, 2011, **77**, 383-387.
90. S. R. Johns, J. A. Lambertson and H. J. Tweeddale, *Australian Journal of Chemistry*, 1969, **22**, 1.
91. N. Borthakur, P. K. Mahanta and R. C. Rastogi, *Phytochemistry*, 1981, **20**, 501-504.
92. M. Leboeuf, A. Ranaivo, A. Cavé and H. Moskowitz, *Journal of Natural Products*, 1989, **52**, 516-521.
93. S.-S. Lee, Y.-J. Lin, C.-K. Chen, K. C. S. Liu and C.-H. Chen, *Journal of Natural Products*, 1993, **56**, 1971-1976.
94. L. D. Juliawaty, M. Kitajima, H. Takayama, S. A. Achmad and N. Aimi, *Phytochemistry*, 2000, **54**, 989-993.
95. A. Cavé, M. Leboeuf, H. Moskowitz, A. Ranaivo, I. Ralph, C. Bick, W. Sinchai, M. Nieto, T. Sévenet and P. Cabalion, *Australian Journal of Chemistry*, 1989, **42**, 2243-2263.
96. N. Saidi, A. H. A. Hadi, K. Awang and M. R. Mukhtar, *Indonesian Journal of Chemistry*, 2009, **9**, 461-465.
97. N. Saidi, H. Morita, M. Litaudon, M. R. Mukhtar, K. Awang and A. H. A. Hadi, *Indonesian Journal of Chemistry*, 2011, **11**, 59-66.
98. S.-S. Lee, C.-H. Chen and Y.-C. Liu, *Journal of Natural Products*, 1993, **56**, 227-232.
99. T.-S. Wu and F.-W. Lin, *Journal of Natural Products*, 2001, **64**, 1404-1407.
100. S.-S. Lee, Y.-C. Liu and C.-H. Chen, *Journal of Natural Products*, 1990, **53**, 1267-1271.
101. F.-W. Lin, J.-J. Wang and T.-S. Wu, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, **50**, 157-159.
102. C. Wen-Te, L. Shoen-Sheng, C. Fu-Shin and K. C. S. Liu, *Phytochemistry*, 1998, **48**, 119-124.
103. C.-h. Chen, S.-s. Lee, C.-f. Lai, J. Wu and J. L. Beal, *Journal of Natural Products*, 1979, **42**, 163-167.
104. J. M. Oger, O. Duval, P. Richomme, J. Bruneton, H. Guinaudeau and A. Fournet, *Heterocycles*, 1992, **34**, 17-20.
105. J.-M. Oger, A. Fardeau, P. Richomme, H. Guinaudeau and A. Fournet, *Canadian Journal of Chemistry*, 1993, **71**, 1128-1135.

106. A. K. Kiang and K. Y. Sim, *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 1967, 282-283.
107. S. T. Lu and I. S. Chen, *Heterocycles*, 1976, **4**, 1073-1076.
108. Z. Han, Y. Zheng, N. Chen, L. Luan, C. Zhou, L. Gan and Y. Wu, *Journal of Chromatography A*, 2008, **1212**, 76-81.
109. Y. Luo, M. Liu, Y. Dai, X. Yao, Y. Xia, G. Chou and Z. Wang, *Inflammation*, 2010, **33**, 389-397.
110. Y.-C. Wu, J.-Y. Liou, C.-Y. Duh, S.-S. Lee and S.-T. Lu, *Tetrahedron Letters*, 1991, **32**, 4169-4170.
111. W. Zhang, J.-F. Hu, W.-W. Lv, Q.-C. Zhao and G.-B. Shi, *Molecules*, 2012, **17**, 11.
112. N. K. Hart, S. R. Johns, J. A. Lamberton, J. W. Loder, A. Moorhouse, A. A. Sioumis and T. K. Smith, *Australian Journal of Chemistry*, 1969, **22**, 2259-2262.
113. N. Borthakur and R. C. Rastogi, *Phytochemistry*, 1979, **18**, 910-911.
114. R. C. Rastogi and N. Borthakur, *Phytochemistry*, 1980, **19**, 998-999.
115. S. N. Sulaiman, M. R. Mukhtar, A. H. A. Hadi, K. Awang, H. Hazni, A. Zahari, M. Litaudon, K. Zaima and H. Morita, *Molecules*, 2011, **16**, 3119-3127.
116. T. Nakasato and S. Nomura, *Yakugaku Zasshi*, 1957, **77**, 816-817.
117. T. Nakasato and S. Nomura, *Yakugaku Zasshi*, 1959, **79**, 1267-1272.
118. T. Nakasato and S. Nomura, *Yakugaku Zasshi*, 1958, **78**, 540-542.
119. T. Nakasato and S. Asada, *Yakugaku Zasshi*, 1966, **86**, 134-139.
120. S.-W. Sun, S.-S. Lee and H.-M. Huang, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1996, **14**, 1383-1387.
121. S. T. Lu and T. L. Su, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 1973, **20**, 75-81.
122. C.-C. Chen, Y.-L. Huang, S.-S. Lee and J.-C. Ou, *Journal of Natural Products*, 1997, **60**, 826-827.
123. F. R. Stermitz and O. Castro C, *Journal of Natural Products*, 1983, **46**, 913-916.
124. O. Castro-Castilho and L. Muñoz, *Ingeniería y Ciencia Química*, 1982, **6**, 198-199.
125. M. R. Mukhtar, A. H. A. Hadi, T. Sévenet, M.-T. Martin and K. Awang, *Natural Product Research*, 2004, **18**, 163-167.
126. K. Awang, M. R. Mukhtar, A. H. A. Hadi, M. Litaudon, J. Latip and N. R. Abdullah, *Natural Product Research*, 2006, **20**, 567-572.
127. M. R. Mukhtar, A. N. Aziz, N. F. Thomas, A. H. Hadi, M. Litaudon and K. Awang, *Molecules*, 2009, **14**, 1227-1233.
128. D. K. Semwal and U. Rawat, *Oriental Journal of Chemistry*, 2007, **23**, 771-772.
129. D. K. Semwal, U. Rawat and G. J. P. Singh, *Molbank*, 2008, **2008**.
130. K. Awang, M. R. Mukhtar, M. R. Mustafa, M. Litaudon, K. shaari, K. Mohamad and A. H. A. Hadi, *Natural Product Research*, 2007, **21**, 704-709.
131. S.-W. Sun, C.-H. Kuo, S.-S. Lee and C.-K. Chen, *Journal of Chromatography A*, 2000, **891**, 189-194.
132. C.-H. Kuo and S.-W. Sun, *Phytochemical Analysis*, 2002, **13**, 63-68.
133. M. R. Mukhtar, A. H. A. Hadi, M. Litaudon and K. Awang, *Fitoterapia*, 2004, **75**, 792-794.
134. F. Tillequin, M. Koch, J. Pusset and G. Chauviere, *Heterocycles*, 1985, **23**, 1357-1361.
135. P. Pudjiastuti, M. R. Mukhtar, A. H. A. Hadi, N. Saidi, H. Morita, M. Litaudon and K. Awang, *Molecules*, 2010, **15**, 2339-2346.
136. A. Mollataghi, A. H. Hadi, K. Awang, J. Mohamad, M. Litaudon and M. R. Mukhtar, in *Molecules*, Switzerland 2011, vol. 16, pp. 6582-6590.
137. M. Tomita, T.-H. Yang and S.-T. Lu, *Yakugaku Zasshi*, 1963, **83**, 15-18.
138. S.-T. Lu, *Yakugaku Zasshi*, 1963, **83**, 19-21.

139. S. T. Lu, *Japanese Journal of Pharmacology*, 1963, **83**, 214-216.
140. M. Tomita and M. Kozuka, *Yakugaku Zasshi*, 1964, **84**, 362-365.
141. M. Tomita, S.-T. Lu and P.-K. Lan, *Yakugaku Zasshi*, 1965, **85**, 588-593.
142. M. Tomita, T.-H. Yang, K. N. Gai and S. K. Baveja, *Yakugaku Zasshi*, 1963, **83**, 218-218.
143. B. Talapatra, S. Goswami, A. Ghosh and S. K. Talapatra, *Journal of the Indian Chemical Society*, 1982, **59**, 1364-1368.
144. S. R. Johns, J. A. Lambertson and A. A. Sioumis, *Australian Journal of Chemistry*, 1967, **20**, 1729-1735.
145. W. D. Smolnycki, J. L. Moniot, D. M. Hindenlang, G. A. Miana and M. Shamma, *Tetrahedron Letters*, 1978, **19**, 4617-4620.
146. M. R. Mukhtar, A. Zahari, M. A. Nafiah, A. H. A. Hadi, N. F. Thomas, H. Arai, H. Morita, M. Litaudon and K. Awang, *Heterocycles*, 2009, **78**, 2571-2578.
147. M. A. Nafiah, M. R. Mukhtar, H. Morita, K. Ahmad, K. Awang and A. H. A. Hadi, *Malaysian Journal of Science*, 2010, **29**, 281-284.
148. N. H. Lajis, Z. Mahmud, L. Bin Din and R. F. Toia, *Pertanika*, 1989, **12**, 421-424.
149. N. H. Lajis, Z. Mahmud and R. F. Toia, *Journal of Natural Products*, 1991, **54**, 612-614.
150. M. R. Mukhtar, M. A. Nafiah, K. Awang, N. F. Thomas, K. Zaima, H. Morita, M. Litaudon and A. H. A. Hadi, *Heterocycles*, 2009, **78**, 2085-2092.
151. R. Silva, T. J. Nagem, A. A. L. Mesquita and O. R. Gottlieb, *Phytochemistry*, 1983, **22**, 772-773.
152. P. W. Le Quesne, J. F. Larrahondo and R. F. Raffauf, *Journal of Natural Products*, 1980, **43**, 353-359.
153. A. Groebel, D. Lenoir and R. Pernet, *Planta Medica*, 1969, **18**, 66-72.
154. C. Ericsson D and L. E. Cuca, *Revista Colombiana de Química*, 2008, **37**, 127-134.
155. M. A. Abdel-Hafiz, D. J. Slatkin and P. Schiff, *Bulletin of Pharmaceutical Sciences, Assiut University*, 1985, **8**, 28-40.
156. L. M. G. Aguiar, R. Braz Filho, O. R. Gottlieb, J. Guilherme, S. Maia, S. L. V. Pinho and J. R. De Sousa, *Phytochemistry*, 1980, **19**, 1859-1860.
157. W. S. Garcez, F. R. Garcez, L. M. G. E. d. Silva and A. A. Shimabukuro, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005, **16**, 1382-1386.
158. S.-L. Wong, H.-S. Chang, G.-J. Wang, M. Y. Chiang, H.-Y. Huang, C.-H. Chen, S.-C. Tsai, C.-H. Lin and I.-S. Chen, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 2489-2496.
159. W. B. Mors, O. R. Gottlieb and C. Djerassi, *Journal of the American Chemical Society*, 1957, **79**, 4507-4511.
160. D. De Barros Corrêa and O. R. Gottlieb, *Phytochemistry*, 1975, **14**, 271-272.
161. W. B. Mors, M. T. Magalhães and O. R. Gottlieb, *Anais de Associação Brasileira de Química*, 1960, **19**, 193-197.
162. N. B. Goncalves, J. C. Correa Fo and O. R. Gottlieb, *Nature*, 1958, **182**, 938-939.
163. J. J. Hoffmann, D. J. Luzbetak, S. J. Torrance and J. R. Cole, *Phytochemistry*, 1978, **17**, 1448.
164. P. Klausmeyer, G. N. Chmurny, T. G. McCloud, K. D. Tucker and R. H. Shoemaker, *Journal of Natural Products*, 2004, **67**, 1732-1735.
165. H. Jayasuriya, K. B. Herath, J. G. Ondeyka, J. D. Polishook, G. F. Bills, A. W. Dombrowski, M. S. Springer, S. Siciliano, L. Malkowitz, M. Sanchez, Z. Guan, S. Tiwari, D. W. Stevenson, R. P. Borris and S. B. Singh, *Journal of Natural Products*, 2004, **67**, 1036-1038.
166. M. Lebœuf, A. Cavé, A. Ranaivo and H. Moskowitz, *Canadian Journal of Chemistry*, 1989, **67**, 947-952.

167. S.-S. Lee, C.-K. Chen, F.-M. Huang and C.-H. Chen, *Journal of Natural Products*, 1996, **59**, 80-82.
168. J. O. Andrianaivoravelona, C. Terreaux, S. Sahpaz, J. Rasolondramanitra and K. Hostettmann, *Phytochemistry*, 1999, **52**, 1145-1148.
169. J. M. Barbosa-Filho, M. Yoshida, O. R. Gottlieb, R. de C.S.B.C. Barbosa, A. M. Giesbrecht and M. Claudia M. Young, *Phytochemistry*, 1987, **26**, 2615-2617.
170. R. M. R. Catão, J. M. Barbosa-Filho, S. J. C. Gutierrez, E. O. L. Lima, M. S. V. Pereira, T. A. Arruda and R. M. P. Antunes, *Revista brasileira de Análises clínicas*, 2005, **37**, 247-249.
171. F. L. Araujo, C. T. Melo, N. F. Rocha, B. A. Moura, C. P. Leite, J. F. Amaral, J. M. Barbosa-Filho, S. J. Gutierrez, S. M. Vasconcelos, G. S. Viana and F. C. de Sousa, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009, **380**, 337-344.
172. F. C. Sousa, C. T. Melo, A. P. Monteiro, V. T. Lima, S. J. Gutierrez, B. A. Pereira, J. M. Barbosa-Filho, S. M. Vasconcelos, M. F. Fonteles and G. S. Viana, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2004, **78**, 27-33.
173. F. C. de Sousa, C. P. Leite, C. T. de Melo, F. L. de Araujo, S. J. Gutierrez, J. M. Barbosa-Filho, M. M. Fonteles, S. M. de Vasconcelos and G. S. de Barros Viana, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, **30**, 1212-1216.
174. C. T. de Melo, A. P. Monteiro, C. P. Leite, F. L. de Araujo, V. T. Lima, J. M. Barbosa-Filho, M. M. de Franca Fonteles, S. M. de Vasconcelos, G. S. de Barros Viana and F. C. de Sousa, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, **29**, 451-454.
175. C. T. V. Melo, A. M. R. de Carvalho, B. A. Moura, C. P. L. Teixeira, L. F. Vasconcelos, M. L. Feitosa, G. V. de Oliveira, J. M. Barbosa-Filho, S. J. Chavez Gutierrez, M. M. de França Fonteles, S. M. M. Vasconcelos and F. C. F. de Sousa, *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 2013, **27**, 104-112.
176. U. V. Castelo-Branco, U. J. V. Castelo-Branco, G. Thomas, C. C. Araújo and J. M. Barbosa-Filho, *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 2000, **19**, 197-202.
177. M.-T. Liu, S. Lin, Y.-H. Wang, W.-Y. He, S. Li, S.-J. Wang, Y.-C. Yang and J.-G. Shi, *Organic Letters*, 2007, **9**, 129-132.

ANEXO 3

Tendências na extração de alcaloides.

Dayana Lacerda Custódio e Valdir Florêncio da Veiga Junior

Os alcaloides constituem uma das classes de produtos naturais de maior diversidade e bioatividade. Encontrados em vegetais, animais e também em microrganismos, sua propriedade básica tem sido empregada há décadas na elaboração de metodologias e para sua purificação de forma mais direta e levando em consideração suas propriedades e a interação com a matriz.

Apesar da extração ácido-base ser a técnica tradicional de obtenção de alcaloides, seu uso pode levar à degradação e geração de artefatos durante a extração, com perda nos rendimentos das frações alcaloídicas e geração de moléculas que não estão presentes na matriz extraída. Com a simplificação e o barateamento das tecnologias de purificação utilizando principalmente o HPLC, tem-se observado uma tendência de análise direta dos extratos, sem o uso de solventes ativos. O desenvolvimento recente de detectores de espectrometria de massas e a melhoria dos bancos de dados de espectros popularizaram ainda mais essa metodologia em detrimento aos métodos clássicos e de planejamento racional orientado pela matriz de origem dos alcaloides.

Ao realizarmos uma pesquisa no motor de busca Scopus com a palavra “alkaloid” foram encontradas mais de 80.000 referências. Restringindo esse resultado aos trabalhos publicados nos anos de 2011 e 2012 nos periódicos *Journal of Natural Products*, *Phytochemistry* e *Phytochemical Analysis*, de grande renome em estudos de produtos naturais, esse universo se resumiu a 128 artigos. Dentre essas, 15% não abordam o método de extração dos alcaloides estudados e, portanto não serão abordadas no presente estudo. As demais foram analisadas com o intuito de se obter o panorama de metodologias empregadas atualmente na extração de alcaloides. Considerando os estudos apresentaram o método de extração,

observou-se que apesar dos estudos utilizando extração direta serem a maioria, estudos empregando a extração ácido-base foram relatados em 40% do total. Isso indica que apesar dos avanços tecnológicos, essa metodologia clássica continua sendo bastante utilizada.

O método de extração a ser aplicado também depende da origem do material a ser analisado. Nos estudos recentemente publicados, uma pequena minoria abordava espécies pertencentes a animais, realizados com espécies de besouro ¹ e esponja ², enquanto que a maioria estudo espécies vegetais. Ainda nesse contexto, nenhum dos estudos realizados com microrganismos utilizou a extração ácido-base na obtenção de seus alcaloides. Isso sugere que o tipo de extração esteja associado ao tipo de matriz, com esse tipo de extração sendo melhor aplicado aos vegetais. Dentre os órgãos vegetais, o mais estudado é a folha, seguido do caule. Esses órgãos estão localizados na parte aérea da planta, são mais acessíveis e podem ser obtidos em maior quantidade, o que explica seu maior número de estudos. Os demais órgãos são menos acessíveis, como a raiz; ou sua disponibilidade depende do ciclo reprodutivo da espécie.

Por outro lado a extração direta com solvente, observada de forma majoritária nos estudos recentes, parece ser mais versátil, considerando que são observadas espécies de reinos diferentes sendo extraídas desta forma. O preparo de extratos brutos complexos é aplicável a vários grupos de organismos, sendo observados estudos com maior porcentagem de espécies animais, além de estudos com espécies de fungos e microrganismos. Nos estudos publicados recentemente observou-se um número maior de estudos feitos com a raiz, situação inversa a ocorrida na extração ácido-base. Isso pode estar relacionado à pouca quantidade de material necessário para extratos a serem analisados por técnicas hifenadas (Fig. 1).

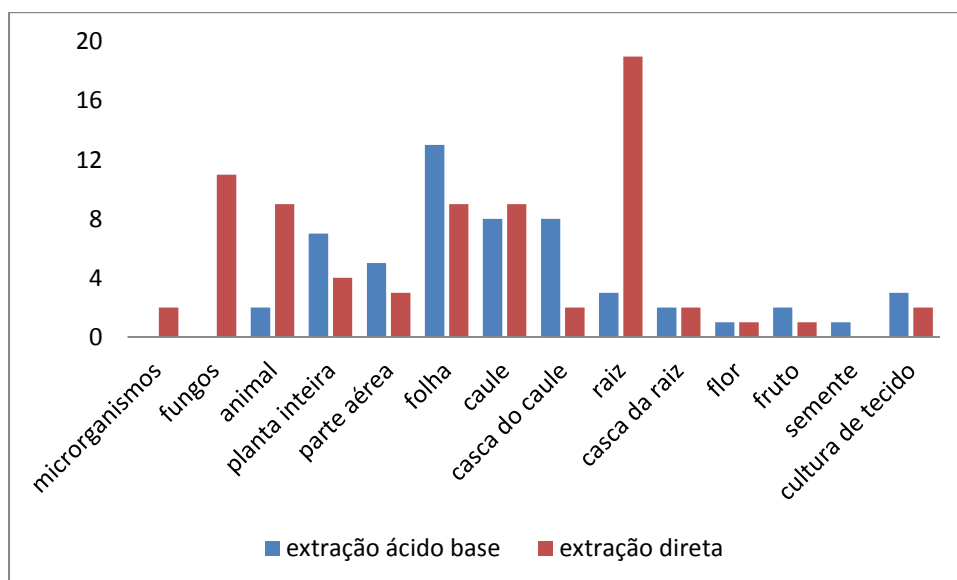


Figura 1: Comparação entre as matrizes utilizadas empregadas na extração ácido-base e na extração direta.

Dentre as etapas envolvidas na extração de alcaloides, podem ser enumeradas quatro etapas distintas (Fig. 2):

1. pré-tratamento, que inclui a alcalinização do material vegetal e desengraxamento do material vegetal;
2. obtenção do extrato orgânico;
3. acidificação e retirada das substâncias orgânicas não básicas;
4. alcalinização e obtenção dos alcaloides em meio orgânico ou aquoso (quaternários).

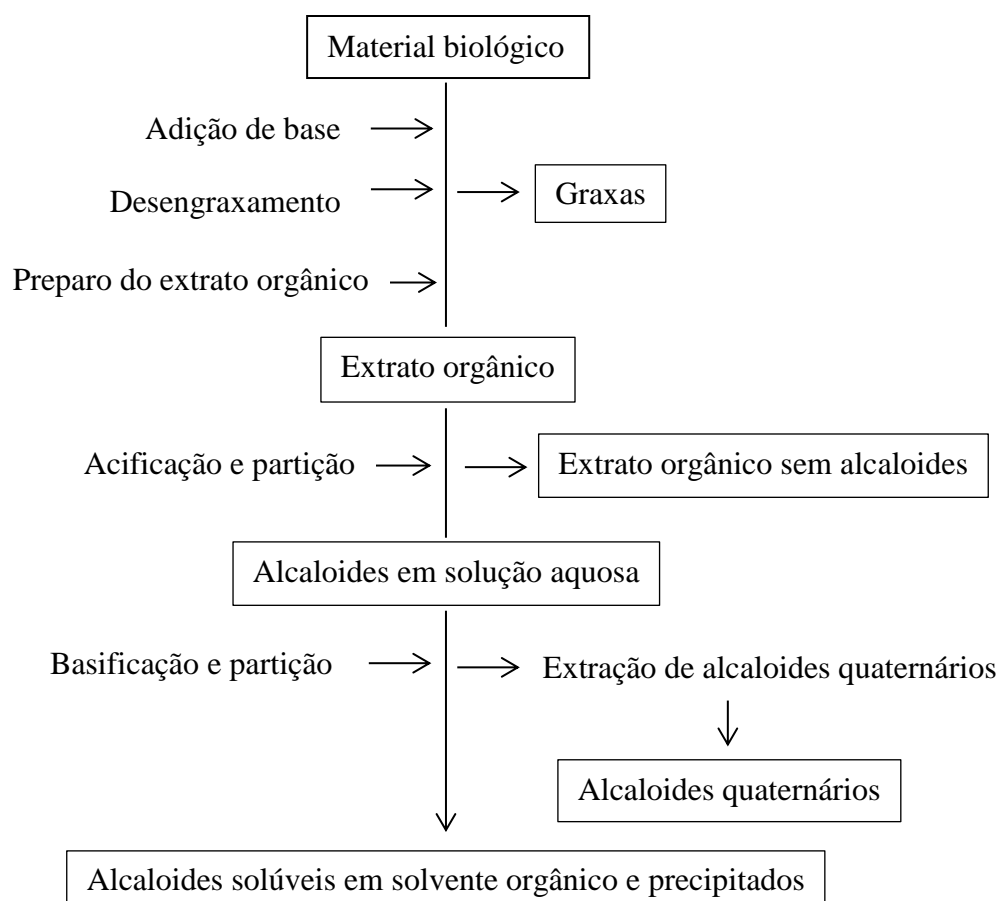


Figura 2: Etapas da extração ácido-base.

As etapas de pré-tratamento do material biológico eram muito utilizadas nos estudos mais antigos, em que agentes alcalinizantes eram empregados para liberar os alcaloides na solução de extração. O mais comumente utilizado é o hidróxido de amônio, devido à sua capacidade de liberar a maioria dos alcaloides sem levar a produção de artefatos³. Os sais básicos carbonatos de sódio, potássio e cálcio e o hidróxido de cálcio também são utilizados nesta etapa. Os agentes alcalinizantes, além de decomporem os sais de alcaloides no material biológico formando as bases livres para a extração, podem se combinar com os ácidos orgânicos, taninos e outros componentes, contribuindo para a obtenção de frações alcaloidicas com menos contaminantes³. Seu uso como alcalinizante é relatado em experimentos antigos como na extração de quinina a partir de *Cinchona*, por Kowanko e Leete⁴ até estudos

recentes, como a obtenção de alcaloides isoquinolínicos de *Beilschmiedia brevipes*⁵. Dentre os artigos analisados no presente estudo, apenas 7% mencionaram o uso de agente alcalinizante no material biológico, sendo o mesmo o hidróxido de amônio⁶⁻⁸.

O desengraxamento do material biológico pode facilitar bastante a extração em casos onde a espécie a ser estudada apresenta quantidade elevada de graxas ou mesmo outras substâncias apolares indesejadas na fração alcaloídica. Dentre os solventes empregados no desengraxamento da matriz são relatados o éter de petróleo^{9, 10} e o hexano^{5, 11, 12}. Considerando as referências analisadas, 12% fazem um desengraxamento prévio do material biológico utilizando os solventes hexano^{13, 14}, ciclohexano¹⁵, éter etílico⁸ e diclorometano¹⁶.

Independente da realização do pre-tratamento do material biológico, é imperativo que este seja extraído para a obtenção do extrato bruto, o qual será posteriormente particionado. Os exemplos da literatura mostram grande versatilidade nesta etapa e são encontrados estudos com extratos obtidos tanto de solventes apolares, quanto de média e alta polaridade. Os estudos que utilizaram solventes apolares na obtenção do extrato bruto, são encontrados em menor frequência mesmo entre os trabalhos mais antigos, e citam o uso do benzeno¹⁷ e éter de petróleo¹⁸, que estão em desuso, além do éter etílico¹⁹. Vários estudos relataram o uso de solventes de média polaridade na obtenção do extrato bruto como o diclorometano⁵, acetato de etila²⁰ e clorofórmio¹². É interessante observar que nos estudos mais antigos, comumente a obtenção do extrato bruto de média polaridade está associada à alcalinização prévia do material biológico. Ainda considerando os estudos mais antigos, são encontrados também trabalhos utilizando solventes polares como o etanol^{21, 22} e metanol^{23, 24}.

Por outro lado, nos estudos recentes observa-se uma maior tendência no uso destes dois solventes na obtenção dos extratos brutos, sendo o metanol utilizado em 43% das referências^{7, 8, 13-16, 25-36}, e etanol em 44%^{30, 37-54}. Foram ainda observados estudos utilizando

a acetonitrila ^{1, 2}. Dentre os solventes de média polaridade, foram empregados nos 13% restantes, sendo utilizados acetato de etila ^{1, 6}, diclorometano ^{7, 8, 16} e éter etílico ⁸.

O uso de solventes ativos na extração ácido-base, como o próprio nome diz, é obrigatório, sendo o primeiro, uma solução ácida, que quando particionada com o extrato bruto abrigará os alcaloides na forma de sais. Podem ser utilizados diversos ácidos durante a extração, sendo que a escolha deste dependerá da amostra. Ácidos mais fortes podem levar a degradação mais facilmente que os mais fracos. No caso da extração de alcaloides indólicos, o uso dos ácidos acético e clorídrico pode levar a formação de pares iônicos solúveis em clorofórmio, o que pode diminuir a eficiência da extração ⁵⁵. A literatura registra o uso de diversos ácidos na extração de alcaloides, mas com certeza, o mais utilizado é o ácido clorídrico, o qual tem sido amplamente utilizado na obtenção de classes variadas de alcaloides, ⁵⁶⁻⁵⁸. Assim como observado com o ácido clorídrico, o ácido sulfúrico é historicamente utilizado na extração de diferentes classes de alcalóides, ^{59, 60}. Ácidos fracos também são empregados na extração ácido-base, dentre eles o ácido acético ⁶¹, o ácido tartárico ^{23, 62} e ácido cítrico ¹⁸.

Nos estudos analisados neste trabalho, o ácido clorídrico foi o ácido mais utilizado, relatado em 51% dos estudos que fizeram extração ácido-base e quase cinco vezes mais empregado que os demais ^{8, 13, 14, 16, 25, 27, 29, 30, 32-35, 37, 39, 41, 43, 45, 51, 52}. O ácido sulfúrico, outro ácido forte, foi utilizado em 11% dos estudos abordados ^{6, 28, 31, 47}. Considerando os ácidos fracos, tartárico (14%) ^{38, 42, 46, 49, 54}, acético (14%) ^{2, 15, 26, 40, 63} e fórmico (11%) ^{1, 36, 53, 64} foram os utilizados.

De forma análoga ao material vegetal, a fração ácida também pode ser desengraxada. Embora essa etapa não seja obrigatória, ela pode contribuir significativamente com a qualidade da fração alcaloídica, uma vez que ajuda a eliminar desta, substâncias lipofílicas e outros contaminantes que tenham sido extraídos na fase aquosa ácida. Esta etapa é bem

documentada na literatura, onde foram empregados os solventes benzeno e hexano⁶⁵, éter de petróleo^{20, 21} e o éter etílico²³. Solventes de média polaridade também são relatados nesta etapa, dentre eles o diclorometano^{24, 60} e clorofórmio^{66, 67}. Atualmente, o desengraxamento da fase aquosa ácida continua sendo realizado, utilizando os mesmos solventes empregados nos estudos mais antigos, com exceção do benzeno que parece estar em desuso. Dentre os artigos analisados, 33% desengraxaram a fração ácida durante a extração ácido-base empregando éter de petróleo (Cao 2012; Giordani 2011; Fu, 2012), éter etílico (Caro, 2012, Pigni, 2012; Human, 2011), diclorometano (Creton, 2011; Giordani 2011), acetato de etila (Girardot 2012, Wang 2011; Liu 2012 li 2011; Francisco 2012).

Após o desengraxamento da fase aquosa, essa é alcalinizada, liberando os alcaloides que passam a aminas livres. Essa etapa é necessária para que estes possam ser extraídos posteriormente com um solvente orgânico. A literatura registra o uso de bases diversas, mas a empregada com maior frequência foi o hidróxido de amônio, provavelmente devido sua característica de base fraca. Seu uso tem sido reportado em estudos anteriores e recentes para classes variadas de alcaloides, como piridínicos⁵⁶, indólicos²³, pirrolidínicos⁵⁸, pirrolizidínicos²⁴ e isoquinolínicos^{5, 9}. Os estudos mais antigos também mostram o uso de soluções de sais básicos como o carbonato e o bicarbonato de sódio e da base forte hidróxido de sódio com frequências menores que a relatada para o hidróxido de amônio.

Os estudos atuais mostram que esta tendência se mantém, o hidróxido de amônio continua sendo amplamente utilizado na alcalinização das fases aquosas ácidas, relatado em 30% dos artigos^{25, 68}. Da mesma forma, soluções de sais básicos^{15, 42, 46, 54} continuam sendo empregadas com menor frequência, assim como o hidróxido de sódio^{30, 45, 47}.

Após a adição de uma base à fase aquosa ácida, os alcaloides, já desprotonados, passam a ter maior afinidade por solventes orgânicos. Então, a quarta etapa de extração é concluída particionando a fase aquosa alcalinizada com um solvente orgânico,

preferencialmente volátil. Nos relatos da literatura, os solventes mais utilizados foram diclorometano, acetato de etila e clorofórmio, ambos voláteis e, portanto, facilmente removidos da amostra. A fase orgânica é concentrada, resultando em um extrato rico em alcalóides, que é purificado através de técnicas cromatográficas ³.

Atualmente esses solventes continuam sendo igualmente empregados na obtenção da fração orgânica contendo os alcaloides. Dentre as frações alcaloídicas obtidas nos estudos avaliados, 39% foram obtidas em clorofórmio ^{6, 13, 30, 32, 41, 42, 45, 46, 54}, 30% em diclorometano ^{8, 14, 15, 43, 47, 51, 52}, 13% em acetato de etila ^{27, 28, 33}, 9% em éter etílico ^{25, 34} e 9% em butanol ^{15, 51}.

Apesar da extração ácido-base ser um método tradicional na obtenção de alcaloides, a maioria dos estudos analisados (60%) fez extração direta do material biológico, obtendo-se um extrato bruto, o qual é posteriormente purificado através de técnicas diversas. O preparo de extratos brutos complexos é aplicável a vários grupos de organismos sendo observadas porcentagens maiores de estudos com animais (13%), além de fungos (16%) e microrganismos (2%).

A maioria desses estudos utiliza solventes de alta polaridade no preparo de extratos brutos, sendo que 43% utilizaram metanol e 30% usaram etanol na extração do material biológico (Fig. 3). Outro solvente polar utilizado para a obtenção do extrato bruto foi a água, observado em 6% dos artigos analisados ⁶⁹⁻⁷².

Também foram empregados solventes de média polaridade, dentre eles o acetato de etila apresentou maior frequência, sendo utilizado em 18% das referências analisadas. A utilização de diclorometano e acetona também foi observada, sendo cada um deles empregados na extração em 5% dos estudos abordados. O uso de solventes de média polaridade na extração pode contribuir com a obtenção de extratos livres de açúcares e substâncias glicosiladas, que possam prejudicar a purificação das substâncias de média

polaridade a serem extraídas. Também foi observado o uso de sistemas de partição com solventes imiscíveis relatados em 39% das referências abordadas.

Houve estudos que utilizaram mais de um solvente na obtenção dos extratos brutos, sendo a matriz extraída inicialmente com um solvente de média polaridade (diclorometano e acetato de etila), e depois com um álcool (metanol ou etanol)⁷³⁻⁷⁹. Também foram observadas referências onde se utilizou uma mistura de solventes na obtenção do extrato bruto, como diclorometano/ metanol⁷⁴ e acetona/butanona.⁸⁰ Alguns estudos (10%) utilizaram solventes apolares hexano^{73, 75, 76, 78, 81, 82} e ciclohexano⁷⁹ para desengraxar material biológico e/ou extratos brutos antes de purificá-los.

Após analisarmos esse conjunto de artigos nota-se uma tendência na obtenção de extratos utilizando metanol e etanol, seguido pela purificação dos alcaloides por meio de técnicas cromatográficas, as quais tem apresentado grande desenvolvimento nas últimas décadas possibilitando a resolução de misturas complexas. A hifenização de técnicas cromatográficas com técnicas espectrométricas favorece esse modo de trabalho, pois permite a identificação de componentes mesmo em misturas complexas. Esta tendência é mais evidente com matrizes biológicas como raízes vegetais, fungos, microorganismos e invertebrados aquáticos, nas quais a extração ácido base foi raramente usada.

Considerando as etapas da extração ácido-base, a etapa de pré-tratamento, alcalinização e desengraxamento do material biológico, tem sido menos relatada. Não são observadas variações nos ácidos e bases empregados ao longo dos anos, mostrando a uniformidade da técnica tradicionalmente empregada para a obtenção de alcaloides. Ainda considerando o uso de solventes ativos na obtenção de alcaloides, no período de 2011-2012, foi observado que uma parcela significativa dos estudos publicados utiliza a extração ácido-base, evidenciando que este método clássico é ainda amplamente utilizado na obtenção de alcaloides.

Referências

1. A. Schierling, M. Schott, K. Dettner and K. Seifert, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 2231-2234.
2. E. P. Stout, B. I. Morinaka, Y. G. Wang, D. Romo and T. F. Molinski, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 527-530.
3. A. T. Henriques, V. A. Kerber and P. R. H. Moreno, in *Farmacognosia: da planta ao medicamento.*, eds. C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosman, J. C. P. Mello, L. A. Mentz and P. Petrovick, Ed. Universidade UFRS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis 1999, pp. 641 - 656.
4. N. Kowanko and E. Leete, *Journal of the American Chemical Society*, 1962, **84**, 4919-4921.
5. P. Pudjastuti, M. R. Mukhtar, A. H. A. Hadi, N. Saidi, H. Morita, M. Litaudon and K. Awang, *Molecules*, 2010, **15**, 2339-2346.
6. A. Alabdul Magid, N. Lalun, C. Long, N. Borie, H. Bobichon, C. Moretti and C. Lavaud, *Phytochemistry*, 2012, **77**, 268-274.
7. T. D. Phi, V. C. Pham, H. D. Thi Mai, M. Litaudon, F. Guéritte, V. H. Nguyen and V. M. Chau, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 1236-1240.
8. E. Kouloura, M. Halabalaki, M. C. Lallemand, S. Nam, R. Jove, M. Litaudon, K. Awang, H. A. Hadi and A. L. Skaltsounis, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 1270-1276.
9. B. Pech and J. Bruneton, *Journal of Natural Products*, 1982, **45**, 560-563.
10. S. Pummangura, J. L. McLaughlin, D. V. Davis and R. G. Cooks, *Journal of Natural Products*, 1982, **45**, 277-282.
11. J. M. Oger, O. Duval, P. Richomme, J. Bruneton, H. Guinaudeau and A. Fournet, *Heterocycles*, 1992, **34**, 17-20.
12. J.-M. Oger, A. Fardeau, P. Richomme, H. Guinaudeau and A. Fournet, *Canadian Journal of Chemistry*, 1993, **71**, 1128-1135.
13. M. Fragoso-Serrano, G. Figueroa-González, E. Castro-Carranza, F. Hernández-Solis, E. Linares, R. Bye and R. Pereda-Miranda, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 890-895.
14. M. Humam, T. Kehrli, D. Jeannerat, O. Munoz, K. Hostettmann and P. Christen, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 50-53.
15. M. Girardot, C. Deregnaucourt, A. Deville, L. Dubost, R. Joyeau, L. Allorge, P. Rasoanaivo and L. Mambu, *Phytochemistry*, 2012, **73**, 65-73.
16. J. J. Araya, H. Zhang, T. E. Prisinzano, L. A. Mitscher and B. N. Timmermann, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 935-941.
17. W. B. Mors, O. R. Gottlieb and C. Djerassi, *Journal of the American Chemical Society*, 1957, **79**, 4507-4511.
18. M. Matsui, Y. Yamamura, T. Takebayashi, K. Iwaki, Y. Takami, K. Kunitake, F. Koga, S. Urasaki and Y. Watanabe, *Journal of Natural Products*, 1984, **47**, 858-861.
19. H. J. Williams, A. C. Ray and H. L. Kim, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1987, **35**, 19-22.
20. A. Djilani, B. Legseir, R. Soulimani, A. Dicko and C. Younos, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2006, **17**, 518-520.
21. H. Uprety, D. S. Bhakuni and M. M. Dhar, *Phytochemistry*, 1972, **11**, 3057-3059.
22. W. H. Jiao, H. Gao, C. Y. Li, F. Zhao, R. W. Jiang, Y. Wang, G. X. Zhou and X. S. Yao, *J Nat Prod*, 2010, **73**, 167-171.

23. W. Wolter Filho, C. H. S. Andrade, R. Braz Filho and F. J. A. Matos, *Acta Amazonica*, 1985, **15**, 193-197.
24. F. Q. Alali, Y. R. Tahboub, E. S. Ibrahim, A. M. Qandil, K. Tawaha, J. P. Burgess, A. Sy, Y. Nakanishi, D. J. Kroll and N. H. Oberlies, *Phytochemistry*, 2008, **69**, 2341-2346.
25. M. S. B. Caro, L. H. De Oliveira, V. Ilha, R. A. Burrow, I. I. Dalcol and A. F. Morel, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 1220-1222.
26. D. R. Gardner and D. Cook, *Phytochemical Analysis*, 2011, **22**, 124-127.
27. X. H. Cai, Y. Li, Y. P. Liu, X. N. Li, M. F. Bao and X. D. Luo, *Phytochemistry*, 2012, **83**, 116-124.
28. N. B. Pigni, S. Ríos-Ruiz, V. Martínez-Francés, J. J. Nair, F. Viladomat, C. Codina and J. Bastida, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 1643-1647.
29. G. Maldaner, P. Marangon, V. Ilha, M. S. Balparida Caro, R. A. Burrow, I. I. Dalcol and A. F. Morel, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 804-809.
30. J. Han, C. J. Ji, W. J. He, Y. Shen, Y. Leng, W. Y. Xu, J. T. Fan, G. Z. Zeng, L. D. Kong and N. H. Tan, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 2571-2575.
31. M. T. Williams, B. J. Warnock, J. M. Betz, J. J. Beck, D. R. Gardner, S. T. Lee, R. J. Molyneux and S. M. Colegated, *Phytochemical Analysis*, 2011, **22**, 532-540.
32. K. Wang, X. Y. Zhou, Y. Y. Wang, M. M. Li, Y. S. Li, L. Y. Peng, X. Cheng, Y. Lie, Y. P. Wang and Q. S. Zhao, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 12-15.
33. Y. P. Liu, Y. Li, X. H. Cai, X. Y. Li, L. M. Kong, G. G. Cheng and X. D. Luo, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 220-224.
34. X. N. Li, X. H. Cai, T. Feng, Y. Li, Y. P. Liu and X. D. Luo, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 1073-1078.
35. K. D. Deboer, H. L. Dalton, F. J. Edward and J. D. Hamill, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 344-355.
36. S. C. Farrow, J. M. Hagel and P. J. Facchini, *Phytochemistry*, 2012, **77**, 79-88.
37. H. Y. Zhai, C. Zhao, N. Zhang, M. N. Jin, S. A. Tang, N. Qin, D. X. Kong and H. Q. Duan, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 1305-1311.
38. W. F. Ku, S. J. Tan, Y. Y. Low, K. Komiyama and T. S. Kam, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 2212-2218.
39. A. F. Marinho, J. M. Barbosa-Filho and E. J. Oliveira, *Phytochemical Analysis*, 2012, **23**, 426-432.
40. C. K. Chen, F. H. Lin, L. H. Tseng, C. L. Jiang and S. S. Lee, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 411-419.
41. Z. Luo, F. Wang, J. Zhang, X. Li, M. Zhang, X. Hao, Y. Xue, Y. Li, F. D. Horgen, G. Yao and Y. Zhang, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 2113-2120.
42. M. Cao, Y. Zhang, H. He, S. Li, S. Huang, D. Chen, G. Tang, Y. Di and X. Hao, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 1076-1082.
43. S. Cretton, T. A. Bartholomeusz, M. Humam, L. Marcourt, Y. Allenbach, D. Jeannerat, O. Muñoz and P. Christen, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 2388-2394.
44. W. S. Yap, C. Y. Gan, Y. Y. Low, Y. M. Choo, T. Etoh, M. Hayashi, K. Komiyama and T. S. Kam, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 1309-1312.
45. Z. D. Yang, Z. W. Song, J. Ren, M. J. Yang and S. Li, *Phytochemical Analysis*, 2011, **22**, 509-515.
46. L. L. Guo, H. P. He, Y. T. Di, S. F. Li, Y. Y. Cheng, W. Yang, Y. Li, J. P. Yu, Y. Zhang and X. J. Hao, *Phytochemistry*, 2012, **74**, 140-145.
47. M. Reina, W. Ruiz-Mesia, M. López-Rodríguez, L. Ruiz-Mesia, A. González-Coloma and R. Martínez-Díaz, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 928-934.

48. C. Ferreira, D. C. Soares, C. B. Barreto-Junior, M. T. Nascimento, L. Freire-De-Lima, J. C. Delorenzi, M. E. F. Lima, G. C. Atella, E. Folly, T. M. U. Carvalho, E. M. Saraiva and L. H. Pinto-Da-Silva, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 2155-2164.
49. S. H. Lim, Y. Y. Low, S. J. Tan, K. H. Lim, N. F. Thomas and T. S. Kam, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 942-950.
50. S. H. Lim, S. J. Tan, Y. Y. Low and T. S. Kam, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 2556-2562.
51. R. B. Giordani, P. De Brum Vieira, M. Weizenmann, D. B. Rosemberg, A. P. Souza, C. Bonorino, G. A. De Carli, M. R. Bogo, J. A. Zuanazzi and T. Tasca, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 645-650.
52. W. Francisco, M. Pivatto, A. Danuello, L. O. Regasini, L. R. Baccini, M. C. M. Young, N. P. Lopes, J. L. C. Lopes and V. S. Bolzani, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 408-413.
53. A. M. Mweetwa, D. Hunter, R. Poe, K. C. Harich, I. Ginzberg, R. E. Veilleux and J. G. Tokuhisa, *Phytochemistry*, 2012, **75**, 32-40.
54. Y. Fu, Y. Zhang, H. He, L. Hou, Y. Di, S. Li, X. Luo and X. Hao, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 1987-1990.
55. J. Schripsema, D. Dagnino and G. Gosmann, in *Farmacognosia: da planta ao medicamento.*, eds. C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosman, J. C. P. Mello, L. A. Mentz and P. R. Petrovick, Ed. Universidade UFRS / Ed. da UFSC, Porto Alegre / Florianópolis 1999, p. 821.
56. W. B. Mors and O. R. Gottlieb, *Anais da Associação Brasileira de Química*, 1959, **18**, 185-187.
57. L. C. Pabon and L. E. Cuca, *Química Nova*, 2010, **33**, 875-879.
58. A. A. Salim, M. J. Garson and D. J. Craik, *Journal of Natural Products*, 2003, **67**, 54-57.
59. S. W. Pelletier, Z. Djarmati, S. Lajsic and W. H. De Camp, *Journal of the American Chemical Society*, 1976, **98**, 2617-2625.
60. A. Ulubelen, H. K. Desai, S. K. Srivastava, B. P. Hart, J. C. Park, B. S. Joshi, S. W. Pelletier, A. H. Mericli, F. Mericli and R. Ilarslan, *J Nat Prod*, 1996, **59**, 360-366.
61. H. Guinaudeau, M. Shamma, B. Tantisewie and K. Pharadai, *Journal of Natural Products*, 1982, **45**, 355-357.
62. Y. Hirasawa, S. Miyama, T. Hosoya, K. Koyama, A. Rahman, I. Kusumawati, N. C. Zaini and H. Morita, *Organic Letters*, 2009, **11**, 5718-5721.
63. W. L. Morris, L. J. M. Ducreux, T. Shepherd, E. Lewinsohn, R. Davidovich-Rikanati, Y. Sitrit and M. A. Taylor, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 2288-2293.
64. L. Joosten, D. Cheng, P. P. J. Mulder, K. Vrieling, J. A. Van Veen and P. G. L. Klinkhamer, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 214-222.
65. D. dos Santos Filho and B. Gilbert, *Phytochemistry*, 1975, **14**, 821-822.
66. I. G. da Silva, J. M. Barbosa-Filho, M. S. da Silva, C. D. G. de Lacerda and E. V. L. da-Cunha, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2002, **30**, 881-883.
67. F. Meriçli, A. H. Meriçli, H. Becker, A. Ulubelen, S. Özden, N. Dürüst and M. Tanker, *Phytochemistry*, 1996, **42**, 1249-1251.
68. D. Cook, S. T. Lee, J. A. Pfister, C. A. Stonecipher, K. D. Welch, B. T. Green and K. E. Panter, *Phytochemical Analysis*, 2012, **23**, 278-284.
69. M. Chen, L. Gan, S. Lin, X. Wang, L. Li, Y. Li, C. Zhu, Y. Wang, B. Jiang, J. Jiang, Y. Yang and J. Shi, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 1167-1176.
70. L. Ding, H. M. Dahse and C. Hertweck, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 617-621.

71. B. Jiang, S. Lin, C. Zhu, S. Wang, Y. Wang, M. Chen, J. Zhang, J. Hu, N. Chen, Y. Yang and J. Shi, *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 1145-1159.
72. M. H. Al Balkhi, S. Schiltz, D. Lesur, A. Lanoue, A. Wadouachi and M. Boitel-Conti, *Phytochemistry*, 2012, **74**, 105-114.
73. F. Martin, T. Grkovic, M. L. Sykes, T. Shelper, V. M. Avery, D. Camp, R. J. Quinn and R. A. Davis, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 2425-2430.
74. N. Pérez, G. Culioli, T. Pérez, J. F. Briand, O. P. Thomas and Y. Blache, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 2304-2308.
75. T. Lhinhatrakool, S. Prabpai, P. Kongsaree and S. Sutthivaiyakit, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 1386-1391.
76. G. Bringmann, B. Hertlein-Amslinger, I. Kajahn, M. Dreyer, R. Brun, H. Moll, A. Stich, K. N. Ioset, W. Schmitz and L. H. Ngoc, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 89-93.
77. P. Panseeta, K. Lomchoey, S. Prabpai, P. Kongsaree, A. Suksamrarn, S. Ruchirawat and S. Suksamrarn, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 909-915.
78. U. Songsiang, T. Thongthoom, C. Boonyarat and C. Yenjai, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 208-212.
79. D. Lacroix, S. Prado, D. Kamoga, J. Kasenene and B. Bodo, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 2286-2289.
80. H. Huang, Y. Yao, Z. He, T. Yang, J. Ma, X. Tian, Y. Li, C. Huang, X. Chen, W. Li, S. Zhang, C. Zhang and J. Ju, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 2122-2127.
81. B. I. Morinaka and T. F. Molinski, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 430-440.
82. H. A. Junio, A. A. Sy-Cordero, K. A. Ettefagh, J. T. Burns, K. T. Micko, T. N. Graf, S. J. Richter, R. E. Cannon, N. H. Oberlies and N. B. Cech, *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 1621-1629.