



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ISOLAMENTO DE ALCALOIDES E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE LAURACEAE DA
AMAZÔNIA**

MANAUS – 2014

ALCILENE DIAS DE SOUZA

**ISOLAMENTO DE ALCALOIDES E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE LAURACEAE DA
AMAZÔNIA**

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

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

MANAUS - 2014

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729i Souza, Alcilene Dias de
Isolamento de alcaloides e atividades biológicas de espécies de Lauraceae da Amazônia / Alcilene Dias de Souza. 2014
187 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

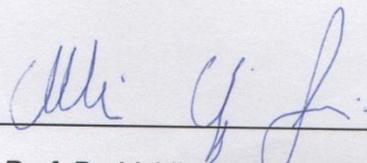
1. Fitoquímica. 2. Isolamento de alcaloides. 3. Atividades biológicas. 4. Estruturas químicas. I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ALCILENE DIAS DE SOUZA

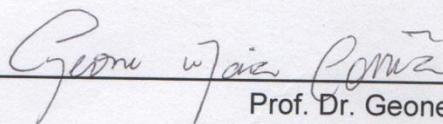
**“ISOLAMENTO DE ALCALOIDES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES
DE LAURACEAE DA AMAZÔNIA”**

Aprovada em 18 de Dezembro de 2014

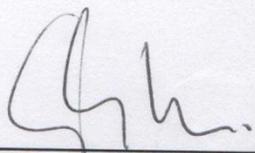
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof. Dr. Geone Maia Côrrea
Universidade Federal do Amazonas



Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Belém Pinheiro – Membro (UFAM)
Universidade Federal do Amazonas

Manaus - 2014

Dedicatória

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
meus irmãos e em especial a meu
amado esposo Aristeu e a meu querido
filho Felipe por todo amor, incentivo,
apoio e confiança.*

Agradecimentos

À Deus, o meu agradecimento maior, porque têm sido tudo em minha vida e que me dá força pra manter a minha fé pra continuar persistindo.

À meu esposo Aristeu de Freitas pelo amor, respeito, companheirismo e por sempre me incentivar nos desafios a serem enfrentados. Obrigada por você existir e fazer meus dias tão felizes.

À meu querido filho Felipe por alegrar minha vida. Agradeço a Deus todos os dias por ter me dado à felicidade de ser mãe. Minha vida é plena porque você existe meu amado filho.

Aos meus pais Maria Dias e Raimundo Rodrigues por me abençoarem e desejarem sempre a minha felicidade.

À meus irmãos Maria, Evaldo, Evandro e em especial a minha irmã **Acimar** pelo apoio e incentivo e por sempre está presente nas minhas conquistas.

À minha querida sobrinha Gisele por ter me acolhido em seu canto e por sempre ter me tratado com carinho e atenção e a meu sobrinho **Gênner José** pela companhia, amizade e parceria. Vocês são muito especiais em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior pela oportunidade de poder fazer parte do seu grupo de pesquisa. Foi um momento único. Sou grata pela confiança que em mim depositou e pelo apoio incondicional que muito elevaram meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer sempre saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor.

Aos meus inesquecíveis amigos do Q-Bioma pela amizade, colaboração e companheirismo. Obrigada aos queridos pesquisadores de iniciação científica: **Yasmim, Isadora, Virlane, Felipe, Allane, Larissa, Leandro...** Aos bolsistas **Erick e Suiane**. Aos mestrandos **Orlando e Jéssika**. Vocês são muito especiais.

Aos doutorandos: **Rosilene, Nilma, Klenicy, Lamarão e Roseane** e aos pós-doc **Fred e Olinda**. Pessoas maravilhosas! Aprendi muito com vocês!

Aos colegas agora mestres Igor, Carol e Milena. Obrigada pela amizade e por terem me ajudado tanto.

Aos colegas Andreza Ramos, Reniêr, Samirimi e Sidney pela colaboração e incentivo.

Aos colaboradores da Central Analítica (Professores **Afonso e Lúcia Belém** e mestrados e doutorandos **Felipe Moura, Richardson, Euzalina e Bruna**), do CBA (**Dácio e Raimundo Júnior**), da FIOCRUZ (Professora **Patrícia Orlandi** e mestranda **Ivanilde**) e da Faculdade de Farmácia (Professora **Marne** e doutoranda **Patrícia**) pela ajuda preciosa em nossas análises.

A **todos os amigos** que de alguma forma me apoiaram e torceram por mim e embora seus nomes não sejam citados não são menos importantes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (**FAPEAM**) pela bolsa concedida.

*A glória da amizade não é a mão
estendida, nem o sorriso carinhoso, nem
mesmo a delícia da companhia. É a
inspiração espiritual que vem quando
você descobre que alguém acredita e
confia em você!*

(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

Lauraceae é uma família botânica que apresenta expressivo número de espécies com distribuição pantropical concentrada em florestas fluviais da Ásia e Américas. Quimicamente, é caracterizada pela presença de metabólitos com atividades biológicas pronunciadas, como flavonoides, lignoides e, em especial, os alcaloides, que apresentam grande diversidade de estruturas químicas. Este estudo teve como objetivo o isolamento de alcaloides de espécies de Lauraceae utilizando uma estratégia de varredura espectrométrica associada aos experimentos fitoquímicos clássicos e realização de ensaios químicos e biológicos com extratos, frações alcaloídicas e alcaloides isolados. Na análise preliminar desta pesquisa foram prospectados folhas e galhos de 16 espécies pertencentes a 09 gêneros distintos dessa família. Destas, 07 foram selecionadas por apresentarem perfil favorável à presença de alcaloides: *Aniba ferrea*, *Aniba panurensis*, *Aniba guianensis*, *Aniba parviflora*, *Licaria martiniana*, *Licaria canella angustata* e *Ocotea leucoxylon*. O material botânico foi extraído em etanol. Foram testadas 03 metodologias para extração de alcaloides. Foram isolados cinco alcaloides inéditos nessas espécies: ocockyptina (a partir de *O. leucoxylon*), laurotetanina e reticulina (a partir de *A. ferrea*) e dois alcaloides indólicos proveniente de *A. panurensis*. Suas estruturas foram identificadas por um conjunto de dados de espectrometria (EM) e espectroscopia (RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais). Para o sequestro dos radicais livres utilizaram-se os métodos DPPH $^{\bullet}$ e ABTS $^{\bullet+}$. Os extratos dos galhos da espécie *A. ferrea*, *A. martiniana* e *A. parviflora* demonstraram alta capacidade sequestrante do radical DPPH $^{\bullet}$ (CI $_{50}$ 12,18 $\mu\text{g/mL}$, 13,23 $\mu\text{g/mL}$ e 14,09 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Para o cátion radical ABTS $^{\bullet+}$, os extratos dos galhos de *L. martiniana*, *A. panurensis* e *A. ferrea* foram os que mais se destacaram (CI $_{50}$ 9,45 $\mu\text{g/mL}$, 11,05 $\mu\text{g/mL}$ e 14,14 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Na atividade antimicrobiana por difusão em ágar verificou-se que tanto o extrato das folhas quanto dos galhos de *A. panurensis* expressaram atividade significativa com CIM variando de 2,5 a 0,6 mg/mL. O maior percentual de inibição no ensaio de citotoxicidade foi observado para o extrato dos galhos da espécie *A. panurensis* que reduziu 94,65% das células pertencentes à linhagem MRC5. Das frações alcaloídicas testadas para as três atividades, a proveniente dos galhos de *A. panurensis* apresentou atividade relevante no sequestro do ABTS $^{\bullet+}$ e no teste antimicrobiano frente às cepas de duas bactérias Gram-positivas. O alcaloide indólico de *m/z* 273 isolado de *A. panurensis* expressou considerável atividade antimicrobiana frente a 4 bactérias Gram-positivas com CIM 0,6 mg/mL confirmando a atividade observada nos extratos e frações alcaloídicas desta espécie. O perfil de atividade antioxidante, antimicrobiano e citotóxico envolvendo frações alcaloídicas está sendo relatado pela primeira vez neste trabalho.

Palavras-chave: Lauraceae, fitoquímica, associação de técnicas, isolamento de alcaloides, atividades biológicas.

ABSTRACT

Lauraceae is a plant family that has large number of species with pantropical distribution concentrated in river forests of Asia and the Americas. Chemically, it is characterized by the presence of metabolites with pronounced biological activities, such as flavonoids, lignoids and especially the alkaloids, which have great diversity of chemical structures. This study aimed at isolating Lauraceae species of alkaloids using a spectrometric scanning strategy associated with phytochemicals classic experiments and production of chemical and biological assays with extracts, fractions and isolated alkaloid alkaloids. In the preliminary analysis of this research were prospected leaves and branches of 16 species belonging to 09 different genera of this family. Of these, 07 were selected because they have favorable profile to the presence of alkaloids: *Aniba ferrea*, *Aniba panurensis*, *Aniba guianensis*, *Aniba parviflora*, *Licaria martiniana*, *Licaria canella angustata* and *Ocotea leucoxylon*. The botanical material was extracted in ethanol. Were tested 03 methodologies for alkaloids extraction. Five unpublished alkaloids have been isolated in these species: ocockyptina (from *O. leucoxylon*), laurotetanina and reticulín (from *A. ferrea*) and two indole alkaloids from *A. panurensis*. Their structures were identified by a set of spectral data (MS) and spectroscopy (1H-NMR, 13C and two-dimensional). For the kidnapping of free radicals we used the methods DPPH[•] and ABTS^{•+}. The extracts of the branches of *A. ferrea*, *A. parviflora* and *A. martiniana* demonstrated high capacity scavenger of DPPH[•] (IC₅₀ 12.18 mg/mL, 13.23 mg/mL and 14.09 mg/mL, respectively). For the cation radical ABTS^{•+}, the extracts of *L. martiniana* branches, *A. panurensis* and *A. ferrea* were the most outstanding (IC₅₀ 9.45 mg/mL, 11.05 mg/mL and 14.14 µg/mL, respectively). In the antimicrobial activity by agar diffusion was found that both the extract of the leaves of *A. panurensis* branches expressed significant activity with MIC ranging from 2.5 to 0.6 mg/mL. The highest percentage of inhibition in the cytotoxicity assay was observed for the extract of the stems of *A. panurensis* which reduced 94.65% of the cells belonging to the MRC5 line. The alkaloid fractions tested for the three activities, from the branches of *A. panurensis* showed relevant activity in the kidnapping of ABTS^{•+} and antimicrobial test facing the strains of two Gram-positive. The indole alkaloid m/z 273 isolated from *A. panurensis* expressed considerable antimicrobial activity against four Gram-positive bacteria with MIC 0.6 mg/mL confirming the activity observed in the extracts and alkaloid fractions of this species. The profile of antioxidant activity, antimicrobial and cytotoxic alkaloid involving fractions being reported for the first time in this work.

Keywords: Lauraceae, phytochemical, association techniques, isolation of alkaloids, biological activities.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - OCORRÊNCIA MUNDIAL DA FAMÍLIA LAURACEAE.....	7
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ocotea</i>	11
FIGURA 3 - ALCALOIDES ISOLADOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ocotea</i>	12
FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Aniba</i>	13
FIGURA 5 - ALCALOIDES ISOLADOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Aniba</i>	15
FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Licaria</i>	16
FIGURA 7 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Endlicheria</i>	17
FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Rhodostemonodaphne</i>	18
FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Pleurotyrium</i>	19
FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Sextonia</i>	20
FIGURA 11 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Mezilaurus</i>	21
FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Aiouea</i>	22
FIGURA 13 - ESQUEMA GERAL DA VIA BIOSINTÉTICA DOS METABÓLITOS ESPECIAIS.....	24
FIGURA 14 - EXEMPLOS DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA.....	25
FIGURA 15 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ALCALOIDES VERDADEIROS.....	27
FIGURA 16 -ESTRUTURAS QUÍMICAS DE PROTOALCALOIDES.....	28
FIGURA 17 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE PSEUDOALCALOIDES.....	29
FIGURA 18 - A-ESTRUTURA DO TROLOX®; B-ESTRUTURA DO CÁTION RADICAL ABTS+.....	32
FIGURA 19 - RADICAL LIVRE (DPPH) E SUA FORMA REDUZIDA.....	33
FIGURA 20 - FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	39
FIGURA 21 - ETAPAS DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS.....	41
FIGURA 22 - ETAPAS DA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS NA FASE PRELIMINAR..	42
FIGURA 23 ESQUEMA GERAL DAS ATIVIDADES METODOLÓGICAS DA FASE PRELIMINAR ...	44
FIGURA 24 - OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA (MÉTODO 2).....	46
FIGURA 25 - OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA (MÉTODO 3).....	47
FIGURA 26 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO DOS GALHOS <i>O. leucoxylo</i> n.....	50
FIGURA 27 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO DOS GALHOS DE <i>A. ferrea</i>	52
FIGURA 28 - FRACIONAMENTO DOS GALHOS DE <i>A. panurensis</i>	53
FIGURA 29 - ESQUEMA DO ENSAIO QUALITATIVO DE DPPH.....	56
FIGURA 30 - PLACAS CROMATOGRÁFICAS REVELADAS COM DRAGENDORFF.....	65
FIGURA 31 - ESPECTRO DE MASSAS DAS FOLHAS DE <i>O. leucoxylo</i> n.....	70
FIGURA 32 -ESPECTRO DE MASSAS DOS GALHOS DE <i>O. leucoxylo</i> n.....	71
FIGURA 33 - ESPECTRO DE MASSAS DAS FOLHAS DE <i>E. sericea</i>	73
FIGURA 34 - ESPECTRO DE MASSAS DOS GALHOS DE <i>E. sericea</i>	75
FIGURA 35 - ESPECTRO DE MASSAS FOLHAS DE <i>L. canella angustata</i>	77

FIGURA 36- ESPECTRO DE MASSAS DOS GALHOS DE <i>L. canella angustata</i>	78
FIGURA 37- ESPECTRO DE MASSAS DAS FOLHAS DE <i>L. martiniana</i>	80
FIGURA 38- ESPECTRO DE MASSAS DOS GALHOS DE <i>L. martiniana</i>	81
FIGURA 39- ESPECTRO DE MASSAS DOS GALHOS DE <i>R. recurva</i>	82
FIGURA 40- ESPECTRO DE MASSAS DOS GALHOS DE <i>P. parviflorum</i>	84
FIGURA 41- ESPECTRO DE MASSAS DOS GALHOS DE <i>A. guianensis</i>	86
FIGURA 42- ESPECTRO DE MASSAS DOS GALHOS DE <i>A. ferrea</i>	88
FIGURA 43- A: CCD DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DAS FOLHAS DE <i>A. panurensis</i>	89
FIGURA 44- ESPECTRO DE MASSAS DAS FOLHAS DE <i>A. panurensis</i>	90
FIGURA 45- ESPECTRO DE MASSAS DOS GALHOS DE <i>A. panurensis</i>	91
FIGURA 46- ESPECTRO DE MASSAS DOS GALHOS DE <i>A. parviflora</i>	92
FIGURA 47- PLACAS CROMATOGRÁFICAS EM SÍLICA GEL	100
FIGURA 48- ESI (+)-MS ¹ , MS ² , MS ³ , MS ⁴ , MS ⁵ E MS ⁶ DO ÍON M/Z 356	101
FIGURA 49- ALCALOIDE APORFÍNICO ISOLADO DOS GALHOS DE <i>O. leucoxylon</i>	103
FIGURA 50- FRAGMENTAÇÃO DO ÍON M/Z 356 BASEADA NA PROPOSTA DE STÉVIGNY <i>ET AL.</i> , (2004).....	103
FIGURA 51- PROPOSTA DE MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO PARA O ÍON DE M/Z 356	104
FIGURA 52- ESPECTRO DE RMN ¹ H DO ÍON DE M/Z 356 ISOLADO DOS GALHOS DE <i>O.</i> <i>leucoxylon</i>	105
FIGURA 53- PLACAS CROMATOGRÁFICAS EM SÍLICA GEL.	107
FIGURA 54- ESPECTROS DE MASSAS DAS FRAÇÕES 3 E 5.....	107
FIGURA 55- ESI (+)-MS ¹ , MS ² , MS ³ , MS ⁴ , MS ⁵ E MS ⁶ DO ÍON M/Z 328	108
FIGURA 56- ALCALOIDE APORFÍNICO ISOLADO DE <i>A. ferrea</i>	109
FIGURA 57- PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA O ALCALOIDE APORFÍNICO DE M/Z 328 ISOLADO DOS GALHOS DE <i>A. ferrea</i>	110
FIGURA 58- ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO ALCALOIDE DE M/Z 328 ISOLADO DE <i>Aniba ferrea</i>	111
FIGURA 59- ESI (+)-MS ¹ , MS ² , MS ³ , MS ⁴ , MS ⁵ E MS ⁶ DO ÍON M/Z 330.....	112
FIGURA 60- ALCALOIDE BENZILTETRAIDROISOQUINOLÍNICO DE M/Z 330 ISOLADO DE <i>A.</i> <i>ferrea</i>	113
FIGURA 61- PROPOSTA DE MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO PARA O ALCALOIDE DE M/Z 330 BASEADA NA PROPOSTA DE SCHMIDT <i>ET AL.</i> , (2005); CASTRO <i>ET AL.</i> , (1984)	114
FIGURA 62- ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA DE M/Z 330 ISOLADA DE <i>Aniba ferrea</i>	115
FIGURA 63- CCD DO PRÉ-FRACIONAMENTO DE <i>A. panurensis</i>	116
FIGURA 64- ESPECTROS DE MASSAS TOTAL DAS SUBSTÂNCIAS 4 E 5.	116
FIGURA 65- ESI (+)-MS ² DOS ÍONS: (A) 273 E (B) 289 DAS SUBSTÂNCIAS 4 E 5.	117
FIGURA 66- A: FÓRMULA MOLECULAR DOS ALCALOIDE 4 E ALCALOIDE 5.....	118
FIGURA 67- ESPECTRO DE RMN ¹ H DO ALCALOIDE 4 DE MASSA 272	119
FIGURA 68- ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR HMBC DO ALCALOIDE 4	120

FIGURA 69- CORRELAÇÕES DO MAPA DE CONTORNO HMBC DO ALCALOIDE 4	120
FIGURA 70- ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR HMBC.....	121
FIGURA 71- ESPECTRO DE RMN ¹ H DO ALCALOIDE 5 DE MASSA 288	122
FIGURA 72- ALCALOIDES INDÓLICOS ISOLADOS DE GÊNEROS DE LAURACEAE.....	123
FIGURA 73- PLACA CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DAS FOLHAS E GALHOS DAS ESPÉCIES DE LAURACEAE E DO PADRÃO QUERCETINA APÓS A ADIÇÃO DA SOLUÇÃO DE DPPH.	124
FIGURA 74- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS E GALHOS DE <i>A. panurensis</i>	132
FIGURA 75- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA E SUBSTÂNCIA ISOLADA DOS GALHOS DE <i>A. panurensis</i>	132
FIGURA 76- INIBIÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE <i>A. panurensis</i>	142
FIGURA 77- INIBIÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE <i>A. guianensis</i>	143
FIGURA 78- INIBIÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE <i>A. ferrea</i>	144
FIGURA 79- INIBIÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE <i>A. parviflora</i>	145
FIGURA 80- INIBIÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS.....	146
FIGURA 81- INIBIÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE <i>L. canella angustata</i>	147
FIGURA 82- INIBIÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE <i>L. canella angustata</i>	148

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESPÉCIES DE <i>Ocotea</i> OCORRENTES NO BRASIL E SEUS USOS POPULARES.....	11
TABELA 2 - ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Aniba</i> UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR.	14
TABELA 3- REATIVOS GERAIS PARA ALCALOIDES.....	27
TABELA 4- PRINCIPAIS AGENTES DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	31
TABELA 5- ESPÉCIES VEGETAIS INVESTIGADAS.....	40
TABELA 6- BACTÉRIAS UTILIZADAS PARA TESTE ANTIMICROBIANO.....	59
TABELA 7- PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PARA ALCALÓIDES.	64
TABELA 8- CONDIÇÕES DE ANÁLISE DAS CCD DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS.....	66
TABELA 9- ÍONS INDICATIVOS DE ALCALOIDES DAS AMOSTRAS EM EM.....	69
TABELA 10- ÍONS INDICATIVOS DE ALCALÓIDES DE <i>O. leucoxylon</i>	72
TABELA 11- ÍONS INDICATIVOS DE ALCALÓIDES DAS FOLHAS E GALHOS DE <i>E. Sericea</i>	76
TABELA 12- ÍONS INDICATIVOS DE ALCALOIDES DOS GALHOS DE <i>L. canella angustata</i>	79
TABELA 13- ÍONS INDICATIVOS DE ALCALOIDES DOS GALHOS DE <i>L. canella angustata</i>	81
TABELA 14- ÍONS INDICATIVOS DE ALCALOIDES DOS GALHOS DE <i>R. recurva</i>	83
TABELA 15- ÍONS INDICATIVOS DE ALCALOIDES DOS GALHOS DE <i>P. parviflorum</i>	84
TABELA 16- ÍONS INDICATIVOS DE ALCALOIDES DOS GALHOS DE <i>A. guianensis</i>	86
TABELA 17- ÍONS INDICATIVOS DE ALCALÓIDES DA FRAÇÃO DOS GALHOS DE <i>A. ferrea</i>	88
TABELA 18- ÍONS INDICATIVOS DE ALCALÓIDES DA FRAÇÃO DOS GALHOS DE <i>A. panurensis</i>	91
TABELA 19- ÍONS DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DOS GALHOS DE <i>A. parviflora</i>	93
TABELA 20- RENDIMENTO DA PARTIÇÃO ÁCIDO-BASE.....	97
TABELA 21- RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE ESPÉCIES DE LAURACEAE.....	98
TABELA 22- EXPERIMENTO REALIZADO EM RMN.....	106
TABELA 23- DADOS EXPERIMENTAIS DE RMN ¹ H.....	111
TABELA 24- EXPERIMENTOS DE RMN ¹ H (500 MHZ, CDCL ₃).....	115
TABELA 25- DADOS DE RMN DE ¹ H E DE HMBC.....	121
TABELA 26- DADOS DE RMN DE ¹ H EXPERIMENTAL DO ALCALOIDE 5.....	122
TABELA 27- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE QUALITATIVA E QUANTITATIVA.....	125
TABELA 28- RESULTADO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE <i>A. panurensis</i>	133
TABELA 29- AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE <i>A. panurensis</i>	134
TABELA 30- PERCENTUAL DE INIBIÇÃO PARA EXTRATOS.....	140

LISTA DAS PRINCIPAIS E SIGLAS E ABREVIACÕES

Abs. - absorvância

ABTS ^{·+} - 2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato)

AcOEt - acetato de etila

CC- cromatografia em coluna

CCD- cromatografia em camada delgada

CHCl₂- dicloro metano

CI₅₀- concentração inibitória em 50%

CIM- concentração inibitória mínima

CDCl₃- clorofórmio deuterado

d- dubleto

DCM- diclorometano

DCM- diclorometano

dd- duplo dubleto

DMSO- dimetilsulfóxido

DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EM- espectro de massas

EROs- espécies reativas de oxigênio

ESI- Ionização por eletrospray

ESI/MS- Espectrometria de massas por Ionização por eletrospray

EtOH:-a etanol

FIOCRUZ- Fundação Instituto Oswaldo Cruz

Hex- Hexano

HMBC- Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC- Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

Hz- hertz

INPA- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

J- Constante de acoplamento em Hertz

m - Mutlipleto

Me- Metila

MeOH- metanol

mL- mililitro

OMe- metoxila

RMN ¹³C-Ressonância Magnética Nuclear de Carbono ¹³C

RMN ¹H-Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s-Singleto

sl- Singleto largo

t- Tripleto;

TMS- Tetrametilsilano.

δ - deslocamento químico

μg -Microgramas

μL - microlitro

$\mu\text{g/mL}$ - micrograma por mililitro

1D- unidimensional

2D- **bidimensiona**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Geral.....	4
2.2 Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Fitoquímica clássica <i>versus</i> fitoquímica moderna; ou fitoquímica clássica mais fitoquímica moderna?	5
3.2. Família Lauraceae Jussieu	6
3.3. Gêneros pertencentes à família Lauraceae abordados nesse estudo	10
3.3.1. O gênero <i>Ocotea</i> Aublet.....	10
3.3.2. O gênero <i>Aniba</i> Aublet.....	13
3.3.3. O gênero <i>Licaria</i> Aublet.....	15
3.3.4. O gênero <i>Endlicheria</i> Nees.....	17
3.3.5. O gênero <i>Rhodostemonodaphne</i>	18
3.3.6. O gênero <i>Pleurotyrium</i>	19
3.3.7. O gênero <i>Sextonia</i>	20
3.3.8. O gênero <i>Mezilaurus</i>	21
3.3.9. O gênero <i>Aiouea</i>	22
3.4. A química de produtos naturais vegetais	23
3.4.1. Alcaloides	26
3.5. Testes químico-biológicos.....	30
3.5.1. Antioxidantes.....	30
3.5.2. Antimicrobianos	34
3.5.3. Citotoxicidade em células tumorais.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Delineamento experimental	39
4.2. FASE 1: Prospecção preliminar.....	40
4.2.1. Coleta do material botânico.....	40
4.2.2. Obtenção dos extratos e frações alcaloídicas	41
4.2.3. Análise das frações alcaloídicas por CCD.....	43
4.2.4. Análise das frações alcaloídicas por espectrometria de massas	43
4.3. FASE 2: Escolha da metodologia para obtenção das frações alcaloídicas.....	44
4.3.1. Recoleta das espécies selecionadas	44
4.3.2. Metodologias de extrações de alcaloides.....	45
4.3.3. Detecção dos alcaloides.....	48
4.4. FASE 3: Isolamento, identificação e bioensaios	49
4.4.1. Isolamento - Cromatografia em coluna aberta em fase normal (CC).....	49

4.4.2. Identificação – Espectrometria de Massas e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	54
4.4.3. Ensaios químicos/biológicos	55
4.4.3.1. Varredura de radicais livres.....	55
4.4.3.1. Citotoxicidade em células tumorais.....	57
4.4.3.3. Atividade antimicrobiana	58
5. RESULTADOS	64
5.1. FASE 1: Prospecção preliminar.....	64
5.1.1. Análise das frações alcaloídicas por CCD.....	64
5.1.2. Análise das frações alcaloídicas por espectrometria de massas	67
5.1.3. Escolhas das espécies de interesse.....	93
5.2. FASE 2: Escolha da metodologia para a obtenção das frações alcaloídicas	97
5.2.1. Rendimento das extrações de frações alcaloídicas	97
5.2.2. Rendimento dos extratos etanólicos das espécies recoletadas.....	98
5.3. FASE 3: Isolamento, identificação e bioensaios.....	99
5.3.1. Identificação estrutural dos metabólitos secundários isolados	99
5.3.1.1. Substância 1	100
5.3.1.2. Substâncias 2 e 3.....	106
5.3.1.3. Substância 4 e 5	116
5.8. BIOENSAIOS.....	124
5.8.1 Atividade antioxidante.....	124
5.8.2 Atividade antimicrobiana	130
5.8.3 Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais	138
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	150
7. REFERÊNCIAS	152

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a estimativa realizada no estudo de Joppa et al. (2011), o número de espécies descritas no território brasileiro chega a 8,09% do total de organismos existentes no mundo. Nesse cenário, o Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais (PINTO, 2002).

Entre as famílias botânicas que compõem a flora brasileira destaca-se a família Lauraceae Jussieu. É uma família botânica com distribuição tropical e subtropical, concentrada em florestas fluviais da Ásia e Américas (SOUZA, 2008). Suas 2500 espécies são distribuídas em 50 gêneros com um número expressivo destas apresentando grande diversidade de usos, merecendo destaque por serem economicamente utilizada na forma de óleos essenciais (QUINET; ANDREATA, 2002), na culinária, fabricação de papel, marcenaria e construção civil, indústria química e medicina popular (MARQUES, 2001).

Quimicamente, é muito rica em metabólitos secundários, como alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos, neolignanas e lignanas, flavonoides, sesquiterpenos e pironas (GARCEZ *et al.* 2011), encontrados nas frações de média e baixa polaridade. Entre as propriedades comprovadas nos extratos de suas espécies, destacam-se as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica (SOUZA *et al.*, 2004, ANTUNES *et al.*, 2006, SILVEIRA *et al.*, 2011, ALCÂNTARA *et al.*, 2010; YAMAGUCHI *et al.* 2012) frente à necessidade de encontrar substâncias no combate a patologias que representam um desafio no tratamento de inúmeras doenças que não apresentam tratamento eficaz.

As espécies da família Lauraceae que ocorrem na Amazônia ainda são pouco estudadas. Por outro lado, há relatos na literatura do isolamento e atividades biológicas de

metabólitos que são característicos dessa família, como é o caso dos alcaloides isoquinolínicos. Destes, os aporfínoídes representam um grupo grande e ainda em expansão, com mais de 500 isolados de mais de 90 gêneros de plantas e/ou sintetizados (ZANIN & LORDELLO, 2007).

A caracterização estrutural, a avaliação de propriedades e as investigações biossintéticas dessas classes de biomoléculas são os objetivos centrais da química de produtos naturais de vegetais, a fitoquímica, como é concebida atualmente (TORSSEL *apud* FILHO, 2010). Para tanto, as metodologias modernas de isolamento e identificação de compostos de fontes naturais têm propiciado o aumento do conhecimento sobre novas estruturas químicas bioativas para diversas indicações terapêuticas (BRANDÃO, 2010).

Para subsidiar o avanço dessas pesquisas é importante obter um perfil fitoquímico prévio dos extratos brutos em busca de frações com classes químicas específicas por meio da associação de técnicas clássicas de pré-fractionamento e concentração das classes de substâncias de interesse, com as técnicas analíticas modernas. Esse tipo de abordagem pode ser utilizado para a seleção de espécies e posterior isolamento de substâncias bioativas, marcadores ou simplesmente para evitar que o exaustivo trabalho da fitoquímica clássica leve ao isolamento de substâncias muito conhecidas ou sem interesse prático.

Dessa forma, é possível selecionar de forma rápida e eficiente as espécies vegetais mais promissoras a fornecer substâncias inéditas na família ou gênero em meio a dezenas de espécies potenciais concomitantemente. A análise de misturas complexas de multicomponentes, como são os óleos essenciais e os extratos vegetais se tornou mais viável com a possibilidade de se utilizar combinações de técnicas que possibilitam uma avaliação mais rápida e segura em relação às técnicas tradicionais (PINTO, 2002).

Considerando a importância de se investigar a composição química e as atividades biológicas promissoras de espécies de Lauraceae da Amazônia, realizou-se um estudo que teve como objetivo o isolamento de alcaloides, bem como avaliar o sequestro dos radicais livres DPPH[•] e ABTS[•] dos extratos brutos, frações alcaloídicas e substâncias isoladas e testar atividade citotóxica contra sete linhagens de células tumorais e atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Isolar alcaloides de espécies de Lauraceae da Amazônia por meio de uma estratégia de varredura espectrométrica associada aos experimentos fitoquímicos clássicos e realizar ensaios químicos e biológicos.

2.2 Específicos

- Selecionar as espécies com maior potencial de isolamento de alcaloides;
- Avaliar diferentes metodologias para a obtenção de frações alcaloídicas;
- Caracterizar frações alcaloídicas por meio de métodos cromatográficos e espectrométricos;
- Isolar e purificar alcaloides das espécies selecionadas;
- Identificar as estruturas químicas dos alcaloides utilizando métodos espectrométricos (EM) e espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H uni e bidimensional;
- Avaliar o sequestro dos radicais livres DPPH $^{\bullet}$ e ABTS $^{+\bullet}$ dos extratos brutos, frações alcaloídicas e substâncias isoladas e testar atividade citotóxica contra sete linhagens de células tumorais e atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fitoquímica clássica *versus* fitoquímica moderna; ou fitoquímica clássica mais fitoquímica moderna?

A evolução científica da Química de Produtos Naturais no Brasil teve seu marco histórico na fitoquímica clássica, implantada e estruturada pelos pesquisadores de excelência, de onde surgiram os grupos consolidados e atuantes na área por todo o país (PINTO, 2002).

A fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais. Isso é possível por meio da utilização de métodos clássicos usados para a extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos dos extratos e óleos essenciais como as técnicas de cromatografia líquida e a gás (FILHO, 1998).

Diante de misturas complexas de diferentes metabólitos como são os óleos e extratos vegetais, muitas vezes não é necessário realizar fracionamentos para a total caracterização química do material em estudo graças ao avanço de técnicas analíticas, sobretudo das técnicas hífenadas. Essas proporcionaram um papel importante na elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com níveis de sensibilidade e seletividade impensáveis até poucos anos atrás (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Isso possibilitou o estudo de extratos brutos vegetais utilizando estratégias de triagem química que são desenvolvidas por meio do uso de técnicas hífenadas sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, muitas vezes, leva a compostos já conhecidos. No entanto, a utilização das técnicas tradicionais não deve ser vista com menos importância, uma vez que os pré-fracionamentos e concentrações das classes de substâncias

de interesse ajudam a subsidiar a triagem fitoquímica tornando tal processo direcionado e, conseqüentemente, mais eficiente.

Dessa forma, pode-se entender que entre a fitoquímica clássica, com suas demoradas marchas de isolamento e que utilizam grandes quantidades de extratos vegetais, e os métodos analíticos desenvolvidos recentemente, em que extratos ou frações podem ser inseridos diretamente em espectrômetros, existem muitas alternativas para a realização de uma fitoquímica mais eficaz. Nesse sentido, a associação dessas técnicas pode resultar em uma triagem fitoquímica de diversas amostras concomitantemente onde é possível selecionar de forma rápida e eficiente as espécies vegetais mais promissoras a fornecer substâncias inéditas na família ou gênero em meio a dezenas de espécies potenciais.

3.2. Família Lauraceae Jussieu

Lauraceae é uma família botânica com distribuição tropical e subtropical, concentrada em florestas fluviais da Ásia e Américas. A família inclui cerca de 50 gêneros e 2500 espécies (SOUZA, 2008), sendo que no Brasil existem cerca de 400 espécies distribuídas em 25 gêneros, contribuindo assim com aproximadamente 16% do total dessas espécies (BARROSO *et al.*, 2002).

É uma das famílias botânicas de maior destaque na composição florística de grande parte dos ecossistemas florestais do país, em especial da Mata Atlântica e em florestas da região sul. Nestes ecossistemas, é frequentemente uma das famílias mais representadas tanto em número de espécies quanto de indivíduos. Nas Américas, ocorrem aproximadamente 29 gêneros e 900 espécies. A família é frequente em florestas tropicais, com algumas espécies habitando grandes altitudes, mas a vasta diversidade ocorre em terras

baixas da Amazônia e América Central (ROHWER, 1993). A ocorrência mundial da referida família pode ser observada na figura 1.

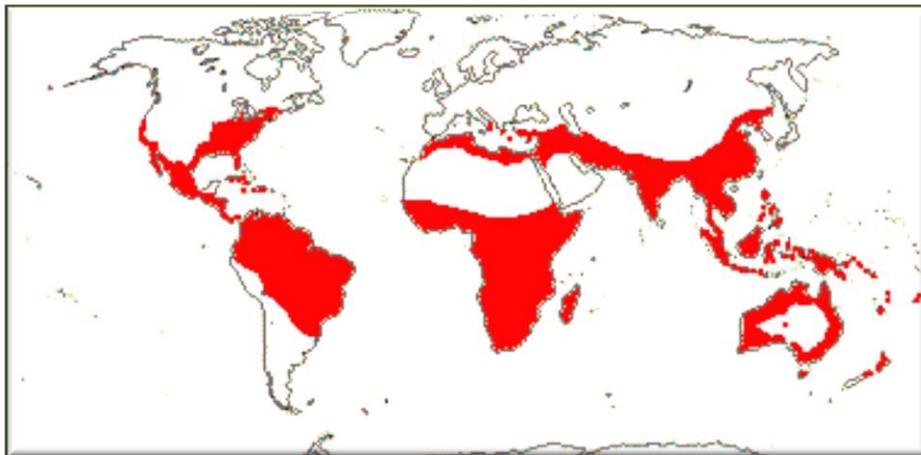


Figura 1 - Ocorrência mundial da família Lauraceae.

Na floresta Amazônica também é uma família muito comum (SOUZA, 2008), apesar de ser um dos grupos de Angiospermas de maior dificuldade para a caracterização de suas espécies, principalmente pela significativa uniformidade morfológica existente entre os táxons (CASTIGLIONI *apud* COUTINHO, 2006).

Segundo Souza & Lorenzi (2005), foram registrados 25 gêneros nativos: *Aiouea*, *Anaueria*, *Aniba*, *Beilschmiedia*, *Cassytha*, *Cinnamomum*, *Cryptocaria*, *Dicypellium*, *Endlicheria*, *Kubitzkia*, *Licaria*, *Mezilaurus*, *Misanteca*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Paraia*, *Persea*, *Phoebe*, *Phyllostemonodaphne*, *Pleurothyrium*, *Rhodostemonodaphne*, *Sextonia*, *Systemonodaphne*, *Urbanodendron* e *Williamdendron*, além de outros dois que foram introduzidos no Brasil devido à sua importância econômica: *Laurus* e *Litsea*.

Dos vinte e cinco gêneros citados, treze estão presentes na Reserva Florestal Ducke, em Manaus-AM: *Ocotea* com 41 espécies, *Licaria* com 15, *Aniba* com 13, *Endlicheria* com 11, *Rhodostemonodaphne* com 8, *Aiouea* e *Mezilaurus* com 3 espécies

cada uma. Os demais são representados por apenas uma espécie. Marques (2001) destaca que a família Lauraceae revela um número expressivo de espécies que apresentam uma grande diversidade de usos e é considerada uma das mais importantes por se destacar economicamente na culinária, na fabricação de papel, marcenaria e construção civil, na indústria de perfumaria, na indústria química e, na medicina popular, mas que a maioria delas tem seu uso restrito às comunidades tradicionais, que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas.

Segundo Ribeiro *et al.*, (1999) as espécies de Lauraceae utilizadas em larga escala são o abacate (*Persea americana*), a canela (*Cinnamomum verum*) e o louro (*Laurus nobilis*); as demais têm grande importância econômica em suas áreas de ocorrência. A casca ou o fruto de algumas espécies são usados como condimentos (*Dicypellium caryophyllaceum*) ou para fazer chá (*Licaria puchury-major* e *Aniba canelilla*). Substâncias aromáticas para perfumaria são extraídas de algumas espécies, como a canela-sassafrás (*Ocotea odorifera*) e o pau-rosa (*Aniba rosaeodora*). Esta última foi muito explorada na Amazônia Central e Oriental. Outras têm usos na medicina popular ou industrial, como a cânfora (*Cinnamomum camphora*).

A madeira de Lauraceae é amplamente explorada em diversas regiões. Na Amazônia, a itaúba (*Mezilaurus* spp.) é a madeira preferida para construção de embarcações devido à sua alta durabilidade e resistência. Diversas outras espécies constituem o principal produto madeireiro vendido nas lojas de Manaus sob o nome de "louro". Algumas espécies aparecem no mercado mundial em quantidade significativa, como *Chlorocardium rodiaei*, na Guiana, constituindo um de seus principais produtos de exportação, e a imbuia (*Ocotea porosa*) no Sul do Brasil, que foi explorada até o esgotamento de suas reservas naturais (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Quinete & Andreato (2002) relatam a importância econômica dessa família em virtude da boa qualidade de sua madeira e do alto valor que alcançam seus óleos essenciais no comércio, mas chamam a atenção para o risco da extinção de suas espécies frente à intensa exploração desordenada ao longo dos anos. Frente a essa problemática são necessárias políticas que garantam a exploração dessas plantas de forma racional diante do potencial da biodiversidade brasileira encarada como fonte de produtos de alto valor agregado (PINTO *et al.*, 2002).

Do ponto de vista químico, se trata de uma família muito rica em metabólitos secundários. São relatados na literatura estudos que apontam para a presença de neolignananas e lignanas, alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos, flavonoides, sesquiterpenos e pironas (BARBOSA FILHO *et al.*, 1999; GIANG *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2005; GARCEZ *et al.*, 1995; GARCEZ *et al.*, 2011; GOTTLIEB & YOSHIDA, 1978). Muitos desses compostos isolados são importantes por apresentarem pronunciadas atividades biológicas, entre as quais se destacam as atividades antioxidante e antimicrobiana (SOUZA *et al.* 2004, ANTUNES *et al.* 2006, SILVEIRA *et al.* 2011, YAMAGUCHI *et al.* 2012). Algumas espécies merecem destaque por serem ricas em óleo essencial que também apresentam propriedades biológicas variadas (DIAZ *et al.*, 1980; BRUNI *et al.*, 20004; ALCÂNTARA *et al.*, 2010a; ALCÂNTARA *et al.*, 2010b).

3.3. Gêneros pertencentes à família Lauraceae abordados nesse estudo

3.3.1. O gênero *Ocotea* Aublet

Ocotea é um dos gêneros da família Lauraceae que tem sido amplamente estudado (WARD, 1999; COUTINHO *et al.*, 2006; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2008; COY & CUCA, 2009; PABON & CUCA, 2010; CHAVERRI *et al.*, 2011) tanto em relação aos componentes dos extratos quanto dos óleos essenciais. É um gênero que desperta grande interesse econômico, pois suas espécies são muito utilizadas no comércio madeireiro, como *Ocotea porosa*, conhecida popularmente como imbuia, e *Ocotea odorífera*, o sassafrás, e também na indústria de cosméticos e perfumaria por algumas espécies como *O. cymbarum*, *O. caudata*, *O. pretiosae* e *O. usambarensis* por serem produtoras de óleos essenciais (LORENZI, 2002).

Segundo Silveira (2011), é o maior gênero da família Lauraceae na região Neotropical com cerca de 350 espécies, a maioria nas Américas tropical e subtropical, desde o México até a Argentina, em uma estimativa de que no Brasil ocorram entre 120 a 160 espécies. Tais espécies estão distribuídas também em Madagascar, na África e nas Ilhas Canárias (RHOWER, 1993), como pode ser observado na distribuição desse gênero no mundo na figura 2.

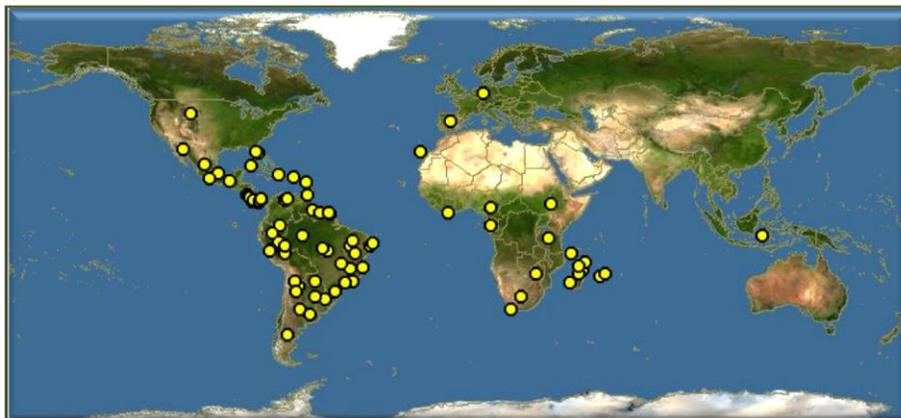


Figura 2 - Distribuição das espécies do gênero *Ocotea*.

Fonte: <http://www.discoverlife.org>

Marques (2001) relaciona as espécies mais comumente encontradas no Brasil, os nomes populares e forma de uso na indústria madeireira (tabela 1).

Nome científico	Nome popular	Utilização
<i>O. barcellensis</i>	Louro mamori; pau-de- querosene	Marcenaria e construções em geral
<i>O. catharinensis</i>	Canela preta	Construção civil; ripas e vigas; móveis
<i>O. cymbarum</i>	Canela	Marcenaria e construções em geral
<i>O. diospyrifolia</i>	Canela	Postes e tábuas de assoalho
<i>O. divaricata</i>	Canela soqueira	Marcenaria e construções em geral
<i>O. elegans</i>	Canela ferro	Marcenaria e construção em geral
<i>O. guianensis</i>	Louro branco	Fabricação de papel
<i>O. organensis</i>	Canela goiaba	Obras de carpintaria
<i>O. porosa</i>	Imbuia	Marcenaria e construções em geral
<i>O. pretiosa</i>	Sassafrás	Não utilizada em obras devido às células secretoras de óleo essencial
<i>O. puberula</i>	Louro abacate, canela barbosa	Fabricação de papel e caixotaria
<i>O. pulchella</i>	Canelinha, canela preta	Marcenaria e construções em geral
<i>O. spectabilis</i>	Canela amarela, louro-preto	Marcenaria e construções em geral

Tabela 1 - Espécies de *Ocotea* ocorrentes no Brasil e seus usos populares

Adaptado de Marques (2001).

Nos estudos químicos sobre esse gênero observa-se uma variedade de substâncias com destaque para os alcaloides isoquinolínicos, lignanas, neolignanas e óleos essenciais

(BARBOSA-FILHO *et al.*, 1999; DIAS *et al.*, 2003; PABON & CUCA, 2010; GARCEZ *et al.*, 2011; MONTRUCCHIO *et al.*, 2012; YAMAGUCHI *et al.*, 2012). Segundo Marques (2001) é o gênero que apresenta o maior número de espécies medicinais e um dos mais expressivos da família Lauraceae no isolamento de alcaloides, muitos deles apresentando pronunciadas atividades biológicas. Na figura 3 são mostrados alguns alcaloides isolados no gênero *Ocotea* relatados na revisão de Zanin & Lordello, 2007 como dicentrina (*O. brachybotra*, *O. macropoda*, *O. minarum*, *O. macrophylla*, *O. puberula* e *O. vellosiana*), isoboldina (*O. caesia*), boldina (*O. perula*), reticulina (*O. vellosiana* e *O. duckei*), isocridina (*O. macrophylla* e *O. vellosiana*), ococriptina (*O. macropoda*), leucoxina (*O. perula*).

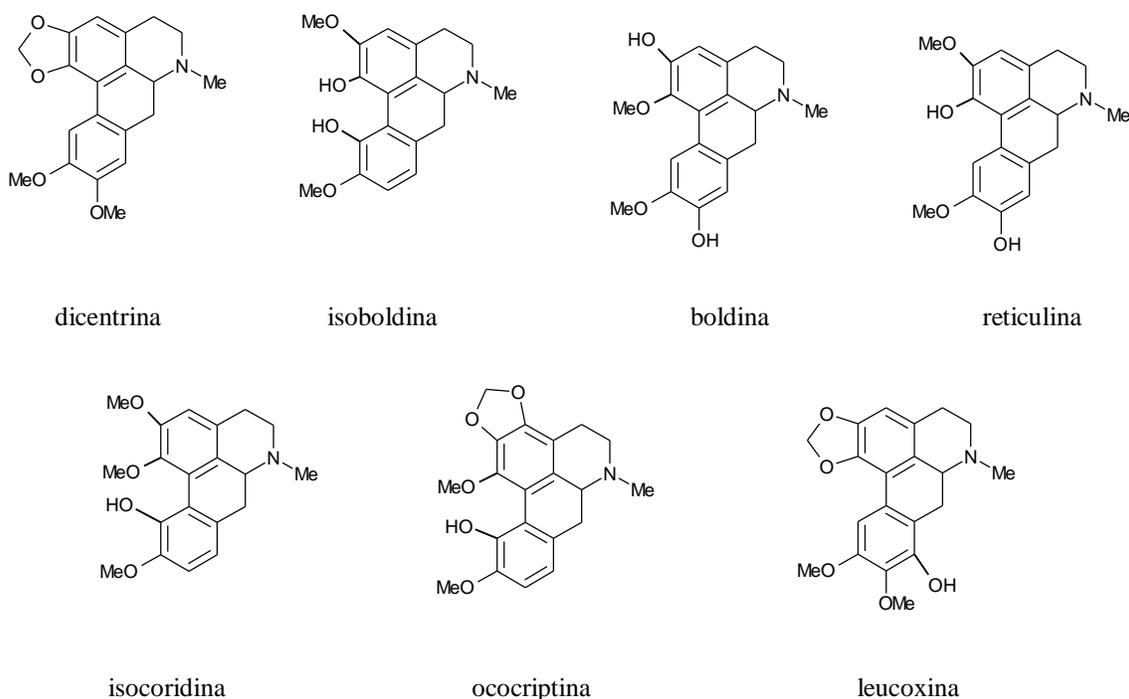


Figura 3 - Alcaloides isolados de espécies do gênero *Ocotea*

3.3.2. O gênero *Aniba* Aublet

Segundo Richter (1981), o gênero *Aniba* foi estabelecido por Aublet (1775), baseado em uma única espécie (*A. guianensis*). *Aniba* é restrito aos neotrópicos e compreende 41 espécies de alguns arbustos e principalmente árvores de pequeno à grande porte. O centro de distribuição situa-se na Amazônia Central, Guiana e regiões com espécies individuais irradiando para os Andes, norte da Venezuela, Pequenas Antilhas e no leste do sul do Brasil (RICHTER, 1981).

No Brasil ocorrem praticamente todas as espécies de *Aniba*, sendo bastante abundante em toda região amazônica e muitas de suas espécies têm larga utilidade comercial nas indústrias madeireiras para a fabricação de móveis, decorações e construções permanentes. Na figura 4, pode-se observar a distribuição desse gênero no mundo e perceber sua predominância no território brasileiro.

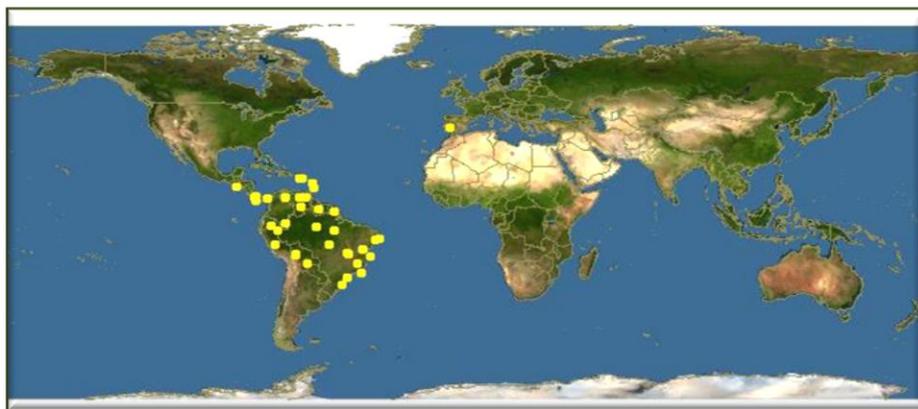


Figura 4 - Distribuição das espécies do gênero *Aniba*

Fonte: <http://www.discoverlife.org>

De acordo com Goulart *et al.* (1975), certas espécies são ditas medicinais como é o caso de *A. canellila* (H.B.K) Mez, *A. duckei* Kosterm. e *A. hastmanniana* (Nees) Mez, que tiveram suas atividades experimentalmente comprovadas contra o ancilostomídeo humano.

No caso de *A. riparia* (Nees) Mez, típica da região amazônica, apresentou atividade antimicrobiana (BARBOSA *et al.*, 1988). Algumas espécies do gênero *Aniba* utilizadas na medicina popular estão relacionadas na tabela 2, bem como as partes utilizadas da planta e forma de uso (MARQUES, 2001).

Nome científico	Parte utilizada	Forma de uso
<i>A. canellita</i>	Lenho, casca	Extrato (coobação)
<i>A. duckei</i>	Lenho, casca	Extrato (coobação)
<i>A. hastmanniana</i>	Lenho, casca	Extrato (coobação)
<i>A. riparia</i>	Fruto, cálices persistentes	Extrato hidroalcoólicos

Tabela 2 - Espécies do gênero *Aniba* utilizadas na medicina popular.

Fonte: Marques, 2001.

Segundo Moraes (1972), as espécies deste gênero são importantes produtoras de óleos voláteis, valiosos na indústria química, como é o caso da *Aniba rosaeodora* Ducke, que produz óleo rico em linalol de alto valor na indústria de perfumaria. O óleo essencial de *Aniba firmula* é usado popularmente na região amazônica como perfume, sendo a espécie vulgarmente chamada de “louro-rosa” por apresentar odor semelhante ao do “pau-rosa” (*Aniba rosaeodora*). *Aniba* s espécies de *Aniba*. No Brasil ocorrem praticamente todas as espécies de *Aniba*, sendo bastante abundante em toda região amazônica e muitas de suas espécies têm larga utilidade comercial nas indústrias madeireiras para a fabricação de móveis, decorações e construções permanentes.

Há registros de alcaloides isolados para o gênero *Aniba* como N-metilcoclaurina, isoboldina e reticulina (BRAVO *et al.*, 1996) isolados de *Aniba muca*, 6,8-dideco-(1Z)-eni-5,7-dimetil-2,3-diidro-1H-indolizidina (Klausmeyer *et al.*, 2004) isolado de *Aniba*

panurensis; cecilin (Aguiar *et al.*, 1980) isolado de *Aniba santalodora*. Em *Aniba rosaeodora* pode-se citar o isolamento dos alcaloides anibina (LACERDA, 2013) e duckein (CORRÊA, 1975). Na figura 5 pode ser observada a estrutura química desses alcaloides.

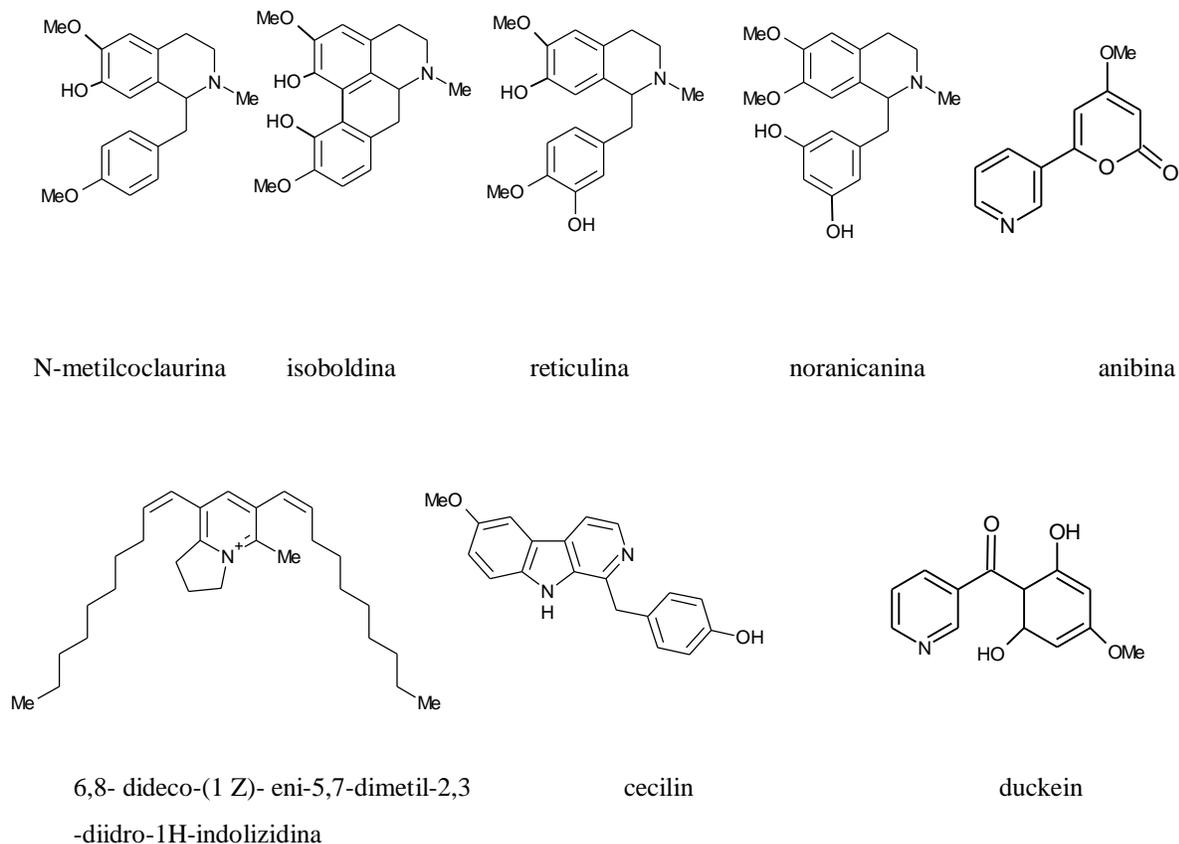


Figura 5 - Alcaloides isolados de espécies do gênero *Aniba*.

3.3.3. O gênero *Licaria* Aublet

Esse gênero possui distribuição neotropical e compreende 38 espécies distribuídas desde o sul da Flórida e México até o sudoeste do Brasil e Bolívia. No Brasil, é registrada a ocorrência de 20 espécies e duas subespécies, a maioria na região Amazônica (KURZ, 2000), como pode ser observado na figura 6.



Figura 6 - Distribuição das espécies do gênero *Licaria*.

Fonte: <http://www.discoverlife.org>

Há vários relatos na literatura sobre a composição química das espécies desse gênero, nos quais são relatados a presença de lignanas furofurânicas (ALEGRIO *et al.*, 1981), alcaloides oxoaporfínicos (ALEGRIO *et al.*, 1981), 6,7-dimetoxicoumarina (AIBA *et al.*, 1978; ALEGRIIO *et al.*, 1981), arilpropanoides (MAIA; RAMOS; LUZ, 1985; SILVA; MAIA, 1973), sitosterol, monoterpenos, sesquiterpenos (FRANCA; GOTTLIEB, 1974; GOTTLIEB *et al.*, 1981; MAIA; RAMOS; LUZ, 1985; SILVA *et al.*, 1973) e o fenilpropanoide dilapiol (GIESBRECHT; FRANCA; GOTTLIEB, 1974).

Uma classe metabólica muito estudada nesse gênero é a das neolignanas. É possível encontrar trabalhos que abordam as neolignanas do tipo biciclo [3.2.1] octanoide, benzofuranoides, benzodioxano, diariltetrahidrofurano e β -ariloxiarilpropano (AIBA; CORRÊA; GOTTLIEB, 1973; AIBA *et al.*, 1978; ALEGRIIO *et al.*, 1981; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1989; BARBOSA-FILHO; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1987; BRAZ-FILHO *et al.*, 1981; FRANCA; GOTTLIEB, 1974). Sobre as espécies *Licaria cannella angustata* e *Licaria canella tenuicarpa*, não foram encontrados estudos na literatura a respeito da composição química e atividades biológicas dessas espécies.

3.3.4. O gênero *Endlicheria* Nees

Endlicheria é um gênero neotropical com centro de diversidade na América do Sul e que ocorre também na Costa Rica, Guadalupe e Ilhas do Caribe. Possui cerca de 60 espécies das quais 40 ocorrem no Brasil (CHANDERBALI, 2004). Na figura 7 é possível observar a distribuição desse gênero.

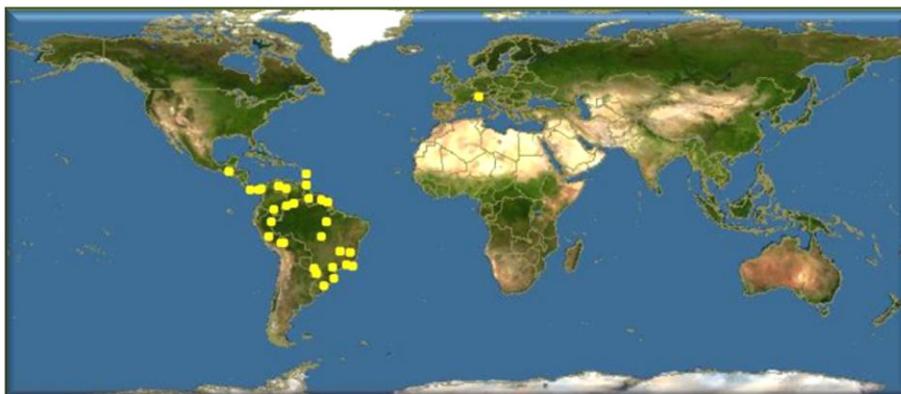


Figura 7 - Distribuição das espécies do gênero *Endlicheria*.

Fonte: <http://www.discoverlife.org>

Poucos relatos são descritos na literatura sobre classes químicas relacionadas com espécies deste gênero. Entre os poucos relatos, quatro neolignanas hexahidrobenzofuranoides foram isoladas nas espécies desse gênero: disodantina A, disodantina B, acetato de megafone e burchelina. Todas elas mostraram atividade no ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina* e as três primeiras inibiram o crescimento de células tumorais de vesícula biliar humana (MA; KOZLOWSKI; MCLAUGHLIN, 1991).

Rodriguez (2008) relata que o extrato etanólico de *Endlicheria anomala* apresentou atividade antioxidante por meio do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-

picrilhidrazil (DPPH). Sobre as espécies *E. sericeae* e *E. verticillata* não foram encontrados estudos fitoquímicos e/ou biológicos na literatura.

3.3.5. O gênero *Rhodostemonodaphne*

O gênero *Rhodostemonodaphne* possui aproximadamente 41 espécies distribuídas nas Américas do Sul e Central e também na Ásia menor (MADRINÑÁN, 2004), como pode ser observado na figura 8.

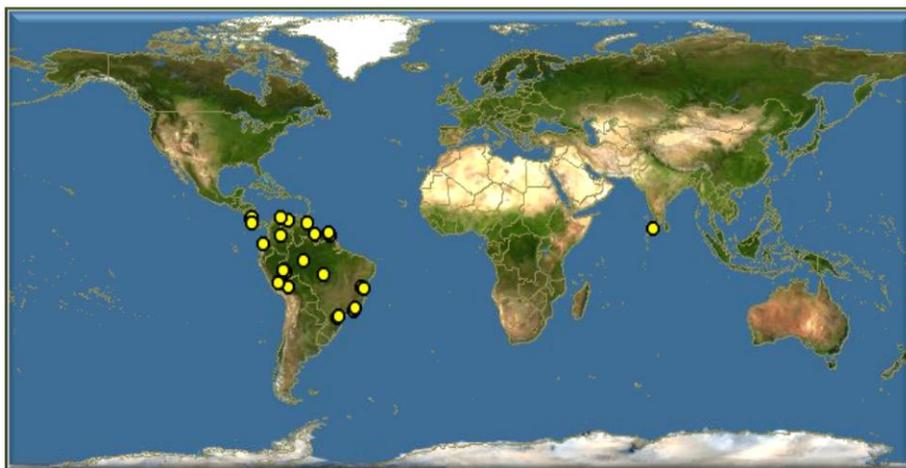


Figura 8 - Distribuição das espécies do gênero *Rhodostemonodaphne*.

Fonte: <http://www.discoverlife.org>

Rhodostemonodaphne é um gênero de Lauraceae que apresenta pouquíssimos estudos químicos e/ou biológicos. O único estudo disponível nas referências consultadas foi a respeito do óleo essencial das folhas de *Rhodostemonodaphne kunthiara* que apresentou atividade citotóxica *in vitro* contra linhagem de células tumorais humanas, apresentando 91,9% de hidrocarbonetos sesquiterpenos sendo os componentes majoritários o germacreno D (64,4%) e o biciclogermacreno (17,6%) (PALAZZO, 2009). Sobre as

espécies *R. crenaticupula* e *R. recurva* não foram localizados registros abordando estudos fitoquímicos e/ ou atividades biológicas.

3.3.6. O gênero *Pleurotyrium*

Pleurotyrium (Lauraceae) é composto por 40 espécies de distribuição neotropical, ocorrendo no Panamá, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Bolívia e no Brasil (figura 9), onde é representado por 13 espécies (WERFF, 1993).



Figura 9 - Distribuição das espécies do gênero *Pleurotyrium*.

Fonte: <http://www.discoverlife.org>

Como acontece com grande parte das espécies de Lauraceae que ocorrem na Amazônia, há poucas investigações sobre o gênero *Pleurotyrium*, como a neolignana do tipo biciclo [3.2.1] octanoide- macrofilina isolada da espécie *P. cinereum* (COY; CUCA; SEFKOW, 2009b).

O estudo de Blanco *et al.*, (2005), mostrou que o extrato bruto de *P. bahiense* testado em orelhas de camundongos, exerce algum tipo de atividade analgésica com ação

anti-inflamatória, sem impedir a formação do edema. Para as espécies *Pleurotyrium vasquezii* e *Pleurotyrium parviflorum* não foram observados estudos químicos ou farmacológicos.

3.3.7. O gênero *Sextonia*

Raros são os registros de estudos em literatura especializada sobre este gênero. A espécie mais conhecida é *Sextonia rubra*, encontrada em alguns estados no norte do Brasil, como o Amazonas, Pará, Amapá e Rondônia. A madeira é utilizada principalmente na construção civil. *Sextonia rubra* (Mez) van der Werff não possui registro de estudos químicos ou farmacológicos. Na figura 10, pode ser visto a restrita distribuição desse gênero.



Figura 10 - Distribuição das espécies do gênero *Sextonia*.

Fonte: <http://www.discoverlife.org>

3.3.8. O gênero *Mezilaurus*

Mezilaurus é um gênero neotropical que consiste de 18 espécies que ocorrem desde a Costa Rica até o sudeste do Brasil, como pode ser observado na figura 11 (WERFF, 1987). No Brasil, são encontradas nove espécies arbóreas em áreas de boa drenagem do rio Amazonas e poucas espécies ocorrem em outros ecossistemas (YANEZ; DIAZ; 1986).

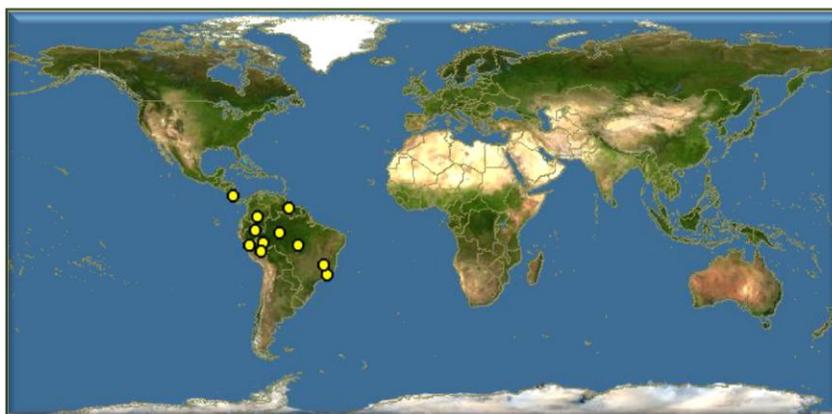


Figura 11- Distribuição das espécies do gênero *Mezilaurus*.

Fonte: <http://www.discoverlife.org>

São limitadas as espécies estudadas quimicamente para este gênero, porém destacam-se os estudos realizados com *M. itauba*, de onde foram isoladas de suas cascas neolignanas benzofuranoides e neolignanas biciclo [3.2.1] octanoides (YANEZ; DIAZ; DIAZ, 1986). As neolignanas *cis*- e *trans*-burchelina têm mostrado efeitos significativos na alimentação, excreção e também na produção de ecdise em larvas do inseto hematófago *Rhodnius prolixus*, o vetor mais importante de *Trypanosoma cruzi*, que é o responsável pela Doença de Chagas na América Latina (GARCIA *et al.*, 2000).

Também foi registrado o isolamento dos alcaloides isoquinolínicos coclaurina e norcinamolaurina, e do alcaloide aporfínico corituberina na madeira de *M. synandra* (SILVA *et al.* 1983). Não foram encontrados estudos químicos ou farmacológicos sobre a espécie *Mezilaurus duckei* van der Werff.

3.3.9. O gênero *Aiouea*

O gênero *Aiouea* é constituído por 19 espécies distribuídas nas Américas do Sul e Central (Kubitzki & Renner 1982) (figura 12). No Brasil, é registrada a ocorrência de 14 espécies, distribuídas principalmente na Região Sudeste. Na Reserva Florestal Ducke são reconhecidas três espécies: *Aiouea grandifolia* van der Werff, *Aiouea myristicoides* Mez e *Aiouea maguireana* (C.K. Allen) S.S. Renner. Nenhuma das espécies citadas apresenta estudos químicos descritos na literatura.

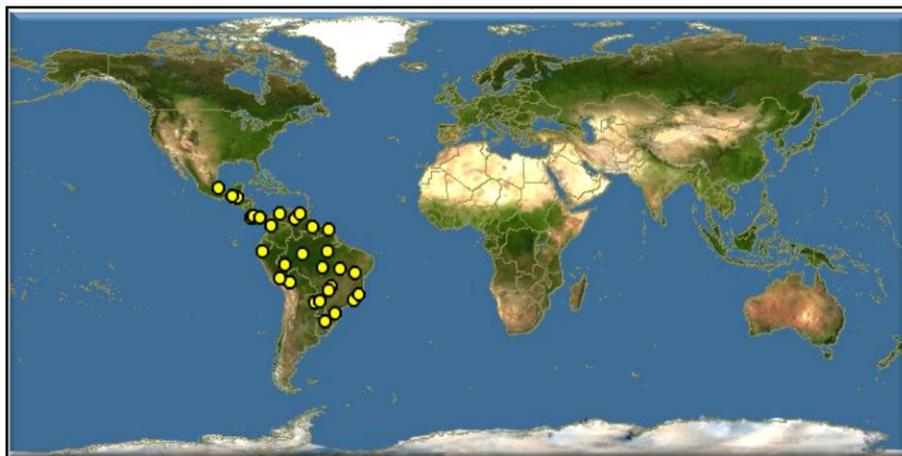


Figura 12- Distribuição das espécies do gênero *Aiouea*.

Fonte: <http://www.discoverlife.org>

3.4. A química de produtos naturais vegetais

Os metabólitos secundários são conhecidos como metabólitos especiais, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (SANTOS, 2004).

Durante muito tempo, a importância adaptativa da maioria dos metabólitos secundários vegetais era desconhecida. Tais produtos eram considerados como produtos finais do metabolismo sem função aparente ou mesmo resíduos (TAIZ & ZEIGER, 2004). Hoje, sabe-se que essas substâncias contribuem significativamente com o desempenho da planta frente às condições ambientais a que estas estão submetidas e que apresentam importantes atividades antifúngicas, antibióticas, antivirais entre outros, e, portanto, capazes de proteger as plantas contra patógenos (fitoalexinas) e também com efeito anti-germinativo ou tóxico para outras plantas (alelopáticos) (BOURGAUD *et al.* 2001).

Dewick (2002) ressalta que mesmo havendo uma classificação distinta dos metabólitos em primário e secundário, as reações bioquímicas não ocorrem independentemente em um mesmo produtor, sendo que alterações no primeiro podem afetar profundamente o segundo, mesmo que o contrário não ocorra.

Além disso, muitos metabólitos especiais são formados por sequência de reações análogas àquelas do metabolismo primário ficando difícil estabelecer uma linha divisória entre metabolismo primário e secundário. A origem de todos esses metabólitos pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. Santos (2004) propõe um esquema (figura 13) onde se pode observar de forma geral a origem de todos os metabólitos especiais a partir do metabolismo

da glicose em reações envolvendo o ácido chiquímico e o acetato como principais intermediários.

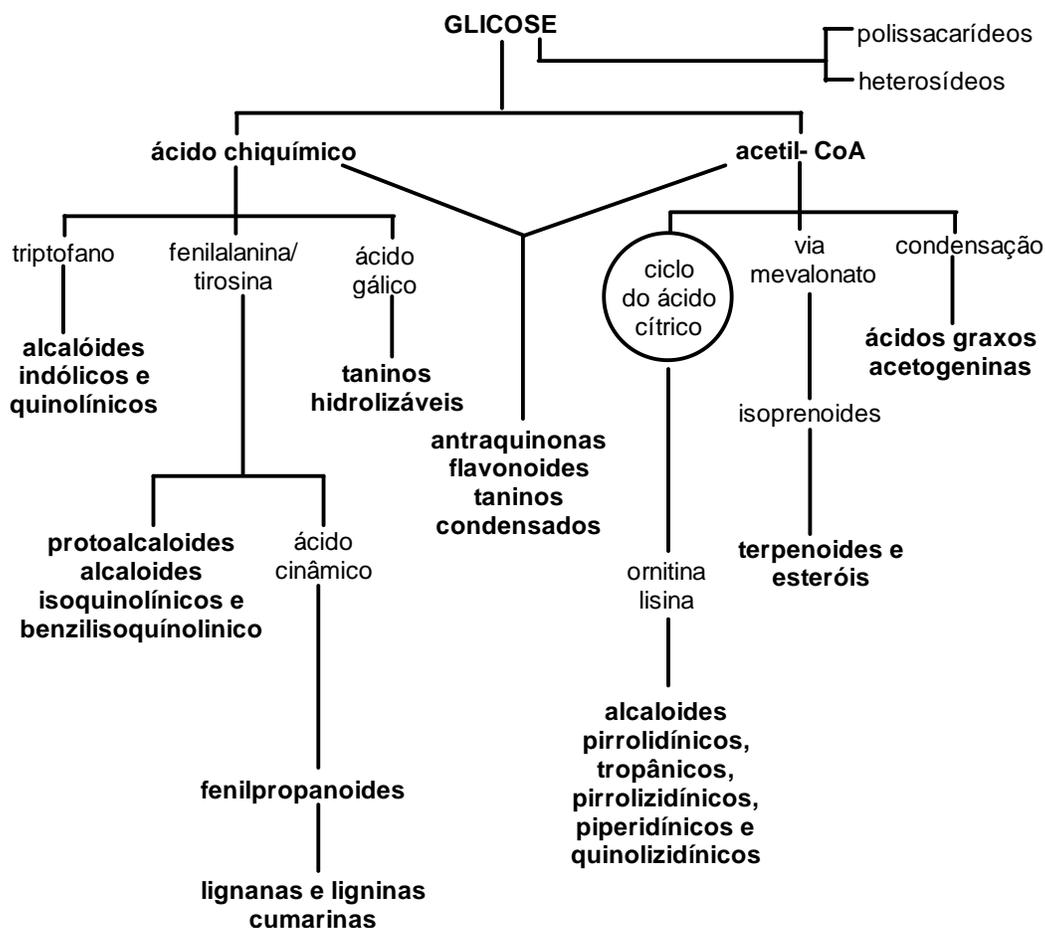


Figura 13- Esquema geral da via biossintética dos metabólitos especiais

A utilização dos metabólitos secundários para diversas finalidades tem sido relatada por séculos, devido às atividades biológicas que promovem usos medicinais importantes. O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal iniciou-se no século XVIII. Esse século, juntamente com o XIX, caracteriza-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides (PINTO, 2002). Atualmente,

segundo Hartmann (2007), já foram descritos mais de 200 mil estruturas de metabólitos especiais.

Nesse sentido, a Química de Produtos Naturais tem contribuído de forma significativa no fornecimento de moléculas com aplicação na indústria farmacêutica, de cosméticos, higiene pessoal, agroquímicos e alimentos. Muitas dessas substâncias (figura 14) se constituem, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, tais como procaína e cloroquina, ou de fármacos antitumorais imprescindíveis, como vimblastina, vincristina e taxol (PINTO, 2002).

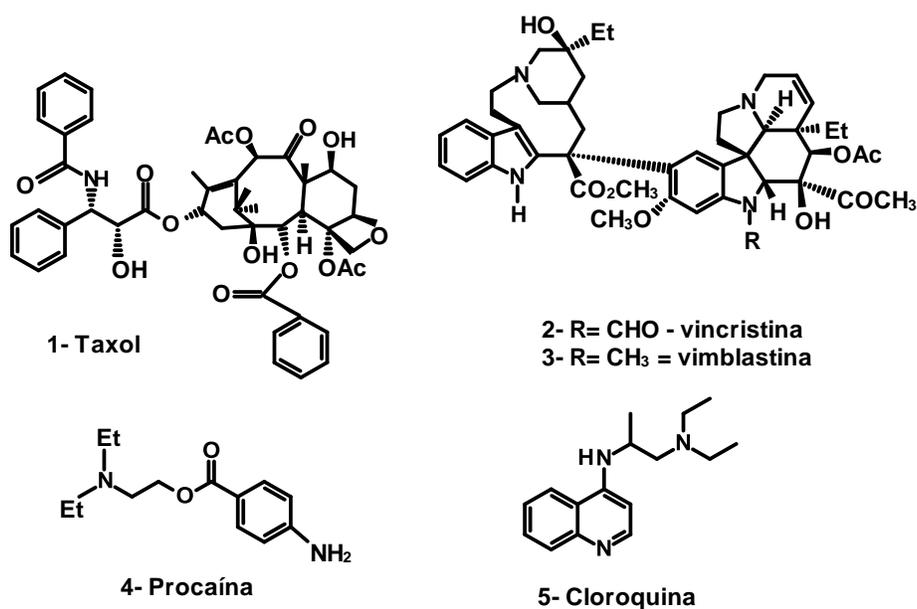


Figura 14- Exemplos de produtos naturais (1-3) e derivados de produtos naturais (4 e 5) utilizados na indústria farmacêutica.

As classes metabólicas mais investigadas são os terpenoides, alcaloides, substâncias nitrogenadas relacionadas à fenilpropanoides e as substâncias fenólicas relacionadas aos flavonoides. Estas classes funcionam como reguladoras de rotas biossintéticas específicas e outras são conhecidas como reguladoras pleiotrópicas que

interferem no controle da biossíntese de antibióticos e de outros processos biológicos (DEWICK, 2002). Mesmo não sendo considerado um dos mais importantes, o grupo dos lignoides destaca-se pela distribuição no reino vegetal e pelas suas propriedades biológicas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento do próprio vegetal e ao controle do mesmo. Os lignoides são indicadores do processo evolutivo em angiospermas e desempenham papel na adaptação ecológica (GOTTLIEB & YOSHIDA, 1984).

3.4.1. Alcaloides

Os alcaloides constituem um grande grupo com mais de 15.000 metabólitos secundários nitrogenados, encontrados em aproximadamente 20% das espécies de plantas vasculares. Via de regra, são sintetizados a partir de um ou poucos aminoácidos comuns (sobretudo a lisina, tirosina e triptofano). Contudo, o esqueleto de carbono de alguns alcaloides apresenta um componente derivado da rota dos terpenos (TAIZ & ZEIGER, 2004).

São compostos nitrogenados que têm na sua estrutura, além de carbono e hidrogênio, usualmente também oxigênio. Sua basicidade típica é, no entanto, muito variável, pois depende dos agrupamentos adjacentes ao nitrogênio. Quando o nitrogênio pertence a uma amida, por exemplo, a estabilização da carbonila torna o alcaloide praticamente neutro (DEWICK, 2002; HENRIQUES *et al.*, 2004).

Os alcaloides, assim como outras aminas, formam sais duplos com compostos de mercúrio, ouro, platina e outros metais pesados. Esses sais duplos em geral são obtidos como precipitados, e muitos deles são característicos em microcristalografia. Os reagentes alcaloídicos comuns são o de Wagner (iodo em iodeto de potássio), de Mayer (cloro-iodo mercurato de potássio) e Dragendorff (iodo bismutato de potássio) (HENRIQUES *et al.*,

2004). Na tabela 3 pode se observar os reativos gerais de alcaloides e a coloração correspondente.

RGA	Composição	Coloração do precipitado
Dragendorff	Iodo bismutato de potássio	Alaranjado
Mayer	Cloro-iodo mercurato de potássio	Branco
Bertrand	Ácido silico-túngstico	Branco
Bouchardat/ Wagner	Iodo iodeto de potássio	Marrom
Sonnenschein	Ácido fosfomolibdico	Branco
	Ácido tânico	Bege
Hager	Ácido pícrico	Amarelo

Tabela 3- Reativos gerais para alcaloides e a respectiva coloração do precipitado

Segundo Henriques *et al.*, (2004), os alcaloides são classificados em três grupos amplamente aceitos: alcaloides verdadeiros, protoalcaloides e pseudoalcaloides. Os alcaloides verdadeiros derivam de aminoácidos, e possuem um anel heterocíclico com um átomo de nitrogênio. Podem ocorrer em plantas no estado livre, como sais e como N-óxidos e em número limitado de espécies e famílias. Os precursores primários dos alcaloides verdadeiros são aminoácidos como a L-ornitina, L-lisina, L-fenilalanina / L-tirosina, L-triptofano e L-histidina. Exemplos de alcalóides verdadeiros incluem substâncias como a cocaína, quinina, dopamina e morfina (figura 15).

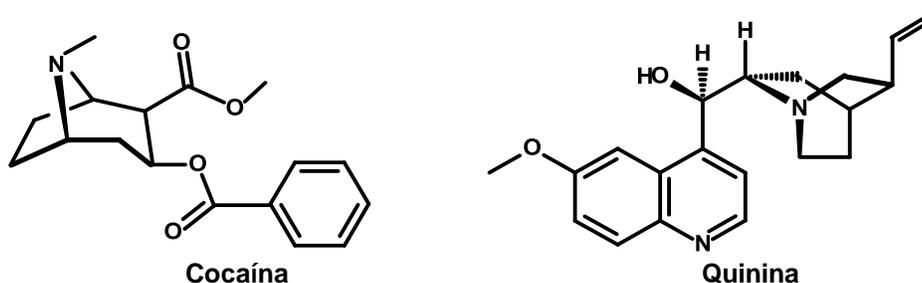


Figura 15- Estruturas químicas de alcaloides verdadeiros

Os protoalcaloides são compostos em que o átomo de nitrogênio derivado do aminoácido não faz parte do anel heterocíclico. Alguns deste tipo de alcaloides incluem compostos derivados da L-tirosina e L-triptofano. Possuem um anel, sendo uma minoria do grande conjunto de alcaloides. Efedrina e mescalina são exemplos de protoalcaloides (figura 16).

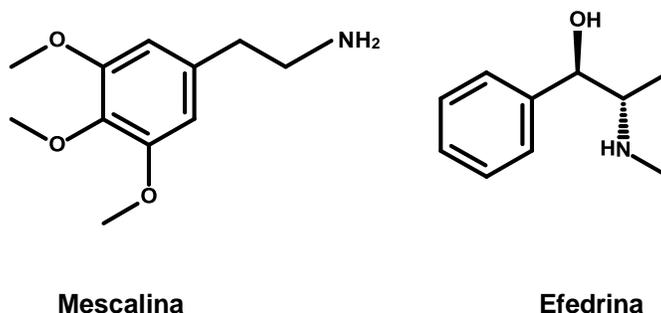


Figura 16-Estruturas químicas de protoalcaloides

Os pseudoalcaloides são compostos em que o esqueleto base de carbono não deriva de aminoácidos. São derivados de precursores da biodegradação de aminoácidos. Podem também resultar de reações de aminação e transaminação de diferentes precursores de aminoácidos, ou de outros precursores que não de aminoácidos. O nitrogênio inserido na molécula deriva de diferentes terpenos e esteroides. Os pseudoalcaloides podem ser derivados do acetato, da fenilalanina ou terpenos, assim como, de esteroides. A gentianina e a tomatidina (figura 17) são exemplos de pseudoalcaloides.

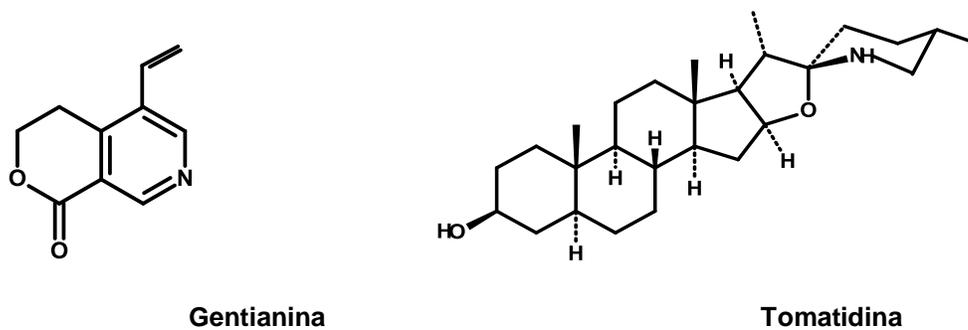


Figura 17- Estruturas químicas de pseudoalcaloides

Dewick (2002) mostra que a classificação desses compostos pode ocorrer de acordo com a sua origem biossintética, ou seja, de acordo com a estrutura que contém nitrogênio em pirrolidino, piperidino, quinolino, indol, etc., embora a complexidade estrutural de alguns rapidamente expanda o número de subdivisões. Devido aos alcaloides apresentarem funções relacionadas à defesa nas plantas, esses metabólitos são de grande interesse farmacológico e muitos alcaloides de origem vegetal têm sido utilizados como modelos para drogas sintéticas, como a atropina, que é modelo para a tropicamida, fármaco utilizado para dilatação das pupilas durante exames oftalmológicos e a quinina, que é um alcaloide com propriedades antitérmicas, antimaláricas e analgésicas, utilizada como modelo para a cloroquinina (CROTEAU *et al.*, 2000).

3.5. Testes químico-biológicos

3.5.1. Antioxidantes

Os radicais livres são espécies químicas altamente reativas que possuem elétrons desemparelhados localizados no átomo de oxigênio ou no nitrogênio. São formados no próprio organismo por processos naturais relacionados ao metabolismo, ou podem ser formados por alguma disfunção biológica, ou ainda, pela exposição a fatores exógenos, sendo responsáveis por desenvolver funções importantes relacionadas com a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS *et al.*, 2006). No entanto, o efeito cumulativo desses radicais está implicado em doenças, tais como câncer, ateroscleroses, isquemia cerebral e envelhecimento (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos pelos antioxidantes que são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000). Quando os antioxidantes produzidos pelo corpo são insuficientes para combater os radicais livres produzidos pelo organismo, este sofre ações degenerativas através do distúrbio conhecido como estresse oxidativo. Esta é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ERO/ERN que causa danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízos das funções vitais, em diversos tecidos e órgãos, tais como músculos, fígados, tecido adiposo, vascular e cerebral (DRÖGE, 2002; DUARTE *et al.*, 1993; HALLIWELL, 1994).

Estas substâncias podem ter origem endógena ou exógena. Os de origem endógena estão relacionados ao sistema de defesa do próprio corpo que pode atuar em duas linhas:

uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão que é linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px), e a outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSHPx, entre outros (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os de origem exógena são aqueles adquiridos na dieta alimentar e de fontes sintéticas. Na tabela 4 estão relacionados os principais antioxidantes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres classificados em enzimáticos ou não-enzimáticos (SIES *apud* BIANCHE; ANTUNES, 1999).

Não-enzimático	Enzimático
α -tocoferol (vitamina E)	Superóxido dismutase
β -caroteno	Catalase
Ácido ascórbico (vitamina C)	NADPH-quinona oxidoreductase
Flavonóides	Glutathiona peroxidase
Proteínas do plasma	Enzimas de reparo
Selênio	
Glutathiona	
Clorofilina	
L-cisteína	

Tabela 4- Principais agentes de defesa antioxidante

Em função dos possíveis problemas que podem ser causados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, o uso de antioxidantes naturais tem aumentado com as descobertas das propriedades dos componentes produzidos pelo metabolismo secundário das plantas. Esses componentes podem atuar, dependendo do mecanismo de ação dos antioxidantes, como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, quelantes e metais ou desativadores do oxigênio sigleto e/ ou exibir simultaneamente, mais de uma dessas funções (CANTERLE, 2005; HALLIWELL *et al.*, 1995).

Os ensaios mais utilizados para caracterizar a atividade antioxidante *in vitro* são os sequestradores de radicais que se baseiam na medição da capacidade de uma substância (pressupostamente antioxidante) em sequestrar os radicais livres. Entre estes, podem ser citados os métodos de DPPH[•] e ABTS^{•+} que empregam radicais estáveis em solução colorida. Após a adição do antioxidante com capacidade de sequestrar esses radicais que foram produzidos, ocorre mudança de coloração da solução. Análises espectrofotométricas e colorimétricas permitem comparar os resultados quantitativamente com padrões de antioxidantes comerciais e/ou naturais (ARNAO, 2000; ARTS *et al.*, 2004).

Segundo Arts *et al.*, (2004) e Obón *et al.*, (2005), no método utilizando cátion radical [2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato)], a solução de ABTS^{•+} tem a função de formar um radical colorido; seguidamente, adiciona-se a essa solução um antioxidante (extrato que se pretende testar), e, em tempos determinados, dosa-se por espectrofotometria a concentração de radicais formados do ABTS^{•+} restante na solução, medindo-se a absorbância em comprimento de onda de 734 nm. Então se faz o mesmo com uma amostra padrão de TROLOX[®] e comparam-se os resultados.

Dessa forma, uma curva similar da dose-resposta pode ser obtida com ambos os cromógenos quando estes antioxidantes são usados como padrão. Na figura 18 é possível observar a estrutura química do radical ABTS^{•+} e do TROLOX[®].

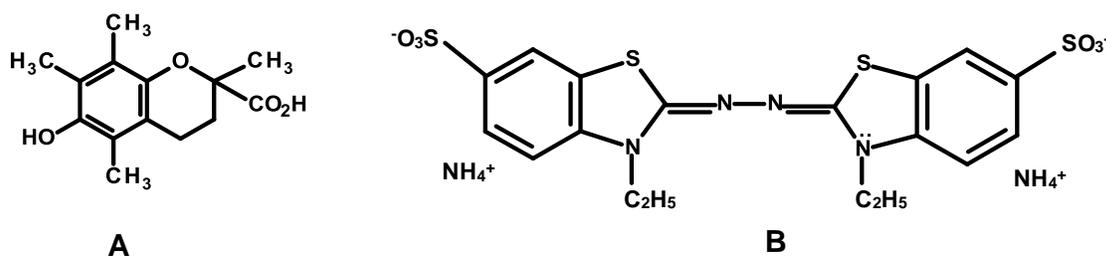


Figura 18- A-Estrutura do TROLOX[®]; B-Estrutura do cátion radical ABTS^{•+}.

Princípio similar é adotado para o método DPPH. Segundo Molyneux (2004), o radical livre 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazila ou DPPH· é um radical estável. Mas, quando em contato com substâncias antioxidantes há o sequestro do radical DPPH, o que é evidenciado pela perda da coloração violeta, o que é característico da reação de redução (figura 19).

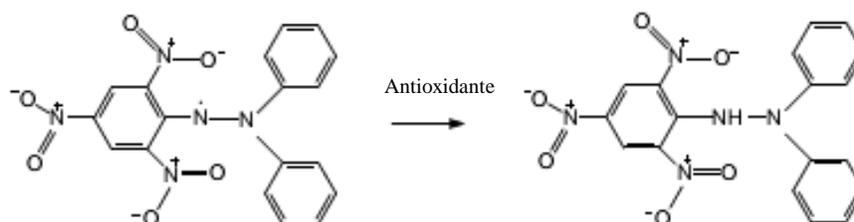


Figura 19- Radical livre 1,1- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e sua forma reduzida

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de oxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} .

Como dito anteriormente, as espécies da família Lauracea ocorrentes na Amazônia são pouco investigadas do ponto de vista fitoquímico. Alcântara *et al.*, (2010) verificaram uma pronunciada atividade antioxidante nos óleos voláteis de duas espécies pertencentes a dois gêneros de Lauraceae (*Licaria* e *Aniba*).

Yamaguchi *et al.*, (2012), investigaram os extratos de galhos e folhas de 20 espécies de Lauraceae distribuídas em 9 gêneros (*Aniba*, *Dicypellium*, *Endlicheria*, *Licaria*, *Mezilaurus*, *Ocotea*, *Pleurothyrium*, *Rhodostemonodaphne* e *Sextonia*) também quanto às

atividades antioxidantes frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila(DPPH). O resultado revelou que os extratos etanólicos dos galhos de *Licaria martiniana* e de *Ocotea minor* apresentaram notável atividade antioxidante.

3.5.2. Antimicrobianos

Antimicrobianos ou antibióticos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que em pequenas concentrações devem possuir, além de outras características, atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas. Além de prevenir o desenvolvimento de microrganismos resistentes, devem apresentar ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro e estabilidade química (COWAN, 1999).

O crescente aumento de microrganismos resistentes às drogas antimicrobianas convencionais vem desafiando a ciência e causando sérios riscos à saúde pública em todo o mundo. Frente a essa problemática, observa-se a dificuldade para se produzir novas drogas eficazes no combate microbiano usando a metodologia tradicional de triagens a partir de fungos e bactérias, o que tornam esses produtos cada vez mais escassos e caros (FERRONATTO *et al.*, 2007). Assim, a necessidade de encontrar novas drogas eficazes no combate microbiano tem aumentado a cada dia o que estimula a busca de novos compostos naturais com atividades biológicas.

Os vegetais são excelentes fontes de novas drogas antimicrobianas, visto que na tentativa de se adaptarem às agressões do ambiente e por terem diversidade molecular muito superior àquela derivada de produtos sintéticos, produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano. Vale destacar que extratos naturais

podem apresentar diferentes atividades sobre as espécies bacterianas, em consequência da possibilidade de existência de mais de um componente ativo presente no extrato. Neste caso é aconselhável realizar o fracionamento dos extratos para identificação do composto realmente ativo (AL-HEBSHI *et al.*, 2006).

Para avaliar a atividade antibacteriana de extratos vegetais existem vários métodos. Os principais métodos utilizados para avaliação da ação antimicrobiana de compostos naturais são: difusão em ágar, diluição em placa, teste de dosagem e citotoxicidade (SOUZA *et al.*, 2003). Os ensaios de difusão são testes qualitativos utilizados para medir a atividade *in vitro* (CLSI, 2009) e pode ser realizado pelas técnicas do poço, disco e template. O ensaio de difusão fundamenta-se na difusão da substância por meio de cultura sólido (ALVES *et al.*, 2008).

A técnica de difusão em ágar é bastante utilizada, com pequenas modificações na metodologia, sendo considerada de fácil execução, reproduzível e permite a experimentação de diversas concentrações das substâncias-teste em uma mesma placa (CLSI, 2009; COWAN, 1999; NETO *et al.*, 2002; MORAIS, 2006). Devem ser realizados de forma padronizada, levando em consideração diversos fatores que podem interferir formação do halo de inibição, entre eles a concentração do inóculo, a distribuição do mesmo na placa, o tempo de incubação, qualidade dos orifícios, o pH do substrato em placas, a taxa de difusão (apresenta problemas com substâncias que não difundem no meio de cultura) e a concentração da substância teste (KRUGER *et al.*, 2003; CARNEIRO *et al.*, 2008).

Métodos de diluição seriada são ensaios quantitativos e são utilizados para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar estes microorganismos (ALVES *et al.* 2008). O método de poços se baseia na difusão radial das substâncias e a possível presença de partículas em suspensão na amostra a ser testada não

interfere na difusão da substância antimicrobiana no ágar, o que torna este método adequado para testar por difusão a ação antimicrobiana de substâncias em extratos de plantas.

Neste método, a substância pesquisada é colocada em orifícios cilíndricos em contato com meio de cultura sólido, permitindo a difusão. Após o período de incubação se obtém uma resposta qualitativa e quantitativa medindo-se o halo de inibição (zona clara onde não houve crescimento microbiano, ao redor da substância em pesquisa). É um método útil para estabelecer a sensibilidade do microorganismo, estabelecendo uma comparação da potência antimicrobiana da amostra e dos antibióticos. Uma zona de inibição de um determinado tamanho indica suscetibilidade, zonas de tamanhos menores indicam resistência ao antibiótico testado (BARRY, 1991; MURRAY *et al.*, 1995; ZACCHINO, 2001).

Segundo a normativa CLSI (2009) não são aceitáveis testes baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de difusão que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionadas às concentrações inibitórias mínimas.

O ensaio de obtenção da Concentração Mínima Inibitória (CMI) é um método que foi validado em 1992 e constitui uma técnica que emprega placas de 96 poços com a transferência seriada da substância a ser testada. A microplaca é incubada durante 24-72 horas em temperatura adequada ao crescimento dos micro-organismos utilizados. Depois deste período, é analisada visualmente e/ou por espectometria, através da absorbância do meio de cultura. Também pode ser realizada leitura através do uso de um corante (KOLODZIEJ *et al.*, 1999).

A técnica de diluição em placa é usada para determinar a concentração inibitória mínima de um agente necessário para inibir ou matar um micro-organismo em um tempo específico outro aspecto é a possibilidade de se utilizar mais de uma substância-teste em diversas concentrações diferentes, bem como diferentes microorganismos em um mesmo ensaio. Esta técnica ainda possibilita demonstrar qual a menor concentração da substância a ser testada que é necessária para inibir o crescimento bacteriano (OPLUSTIL *et al.*, 2004, ALVES, 2006, ALMEIDA, 2007). A resazurina facilita a verificação da presença e ausência do crescimento bacteriano, sendo que a coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano, enquanto a cor vermelha ou rosa indica a presença de células viáveis em crescimento, principalmente por se tratar de um reagente de menor custo (PALOMINO, 2002; ALVES *et al.*, 2008).

Na literatura é possível encontrar uma variedade de estudos onde extratos vegetais, frações e compostos isolados apresentam excelentes resultados contra diversos tipos de microrganismos testados. Entre os inúmeros estudos envolvendo essa temática, vale ressaltar aqueles envolvendo os gêneros pertencentes à família Lauraceae, por serem alvos de investigações que revelam um grande potencial de constituintes antimicrobianos presentes em suas espécies (Souza *et al.*, 2004; Pabon & Cuca 2010; Omar *et al.*, 2013).

3.5.3. Citotoxicidade em células tumorais

Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células anormais. Existem aproximadamente 200 tipos de câncer que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam

pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (ALMEIDA *et al.*, 2005). Nesse contexto, a busca por medicamentos eficazes no combate a essa doença tem aumentado consideravelmente com o objetivo de se encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam seu avanço.

Nesse sentido, estudos demonstram os produtos naturais têm sido importante fonte de componentes antineoplásicos. Nos últimos 20 anos alguns quimioterápicos utilizados no combate ao câncer, como vimblastina e a vincristina (extraídas de *Catharrantus roseus*), o etoposídeo, o teniposídeo e o taxol, se tornaram fármacos imprescindíveis na terapêutica, além do renascimento de seu interesse nas indústrias farmacêuticas (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

As variações referentes à determinação da CMI (Concentração Mínima Inibitória) de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL *et al.*, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Na figura 20 estão descritos os procedimentos metodológicos utilizados para alcançar o objetivo desse estudo:

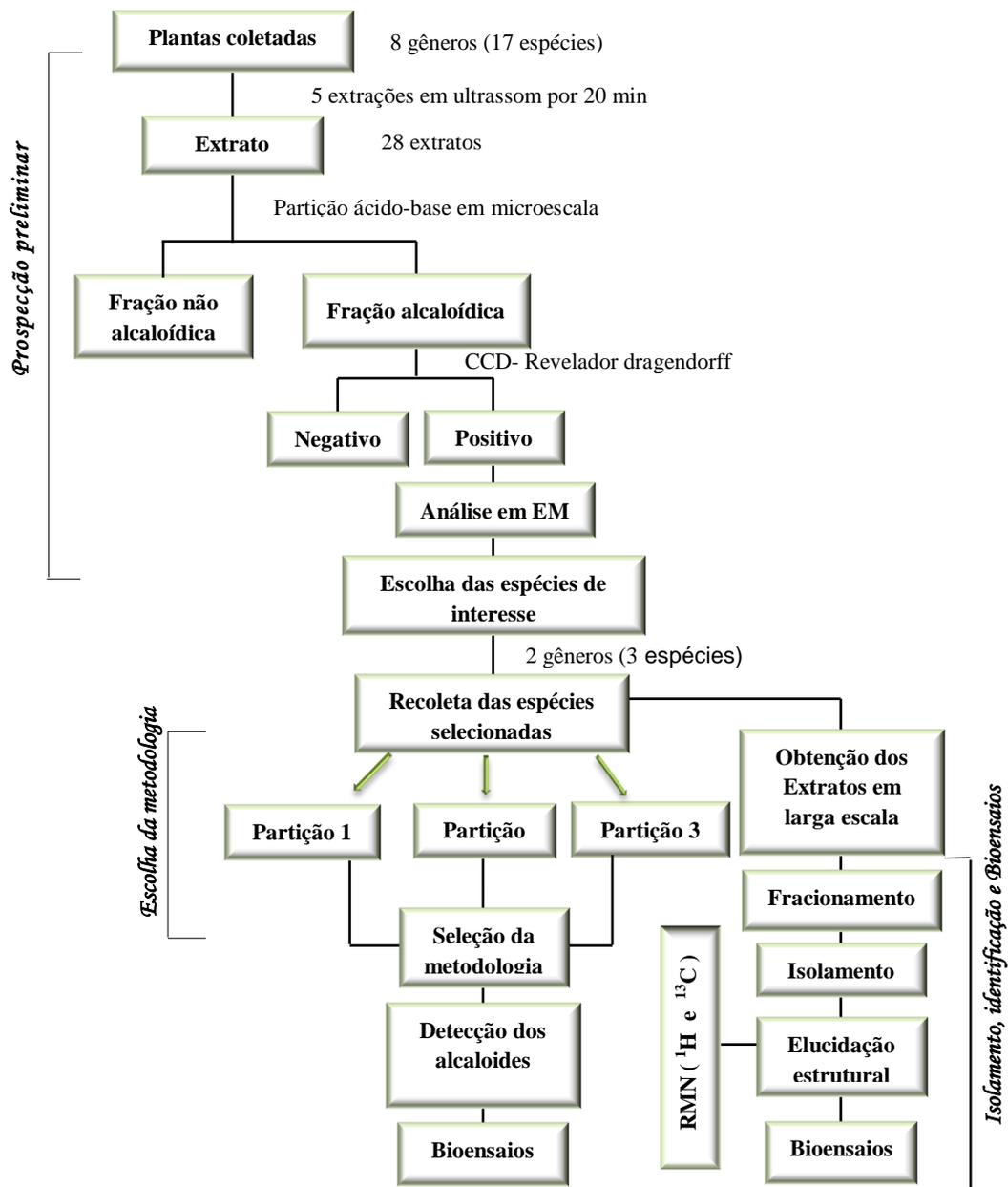


Figura 20- Fluxograma dos procedimentos metodológicos

4.2. FASE 1: Prospecção preliminar

4.2.1. Coleta do material botânico

As espécies de Lauraceae que foram investigadas nesse estudo pertencem a uma série de plantas selecionadas pelo grupo de pesquisa Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-BiomA) que visa o estudo do perfil de seus constituintes. Tais espécies pertencem à flora Amazônica e possuem pouco ou nenhum estudo químico ou biológico. A coleta dessas plantas foi realizada na Reserva Florestal Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus-AM, em março de 2007 e 2008 (tabela 5).

Espécie	Órgão vegetal
<i>Ocotea leucoxylon</i> (Sw.) Laness	Folhas
<i>Ocotea leucoxylon</i> (Sw.) Laness	Galhos
<i>Licaria canella</i> (Meissn.) Kosterman. <i>angustata</i> Kurzj	Folhas
<i>Licaria canella</i> (Meissn.) Kosterman. <i>angustata</i> Kurz	Galhos
<i>Licaria martiniana</i> (Mez) Kosterm	Folhas
<i>Licaria martiniana</i> (Mez) Kosterm	Galhos
<i>Endlicheria sericea</i> Nees	Folhas
<i>Endlicheria sericea</i> Nees	Galhos
<i>Aniba panurensis</i> (Meisn.) Mez	Folhas
<i>Aniba panurensis</i> (Meisn.) Mez	Galhos
<i>Aniba guianensis</i> Aublet	Galhos
<i>Aniba ferrea</i> Kubitzki	Galhos
<i>Aniba parviflora</i> Aublet	Galhos
<i>Pleurotyrium parviflorum</i> Ducke	Galhos
<i>Rhodostemonodaphne recurva</i> van der Werf	Galhos
<i>Aniba parviflora</i> Aublet	Folhas
<i>Aniba guianensis</i> Aublet	Folhas
<i>Endlicheria anomala</i> (Nees) Mez	Folhas
<i>Endlicheria anomala</i> (Nees) Mez	Galhos
<i>Mezilaurus duckei</i> van der Werf	Folhas
<i>Mezilaurus duckei</i> van der Werf	Galhos
<i>Pleurotyrium vasquezii</i> van der Werff	Folhas
<i>Pleurotyrium parviflorum</i> Ducke	Folhas
<i>Rhodostemonodaphne crenaticupula</i> Madriñan	Galhos
<i>Rhodostemonodaphne crenaticupula</i> Madriñan	Folhas
<i>Sextonia rubra</i> Mez	Folhas
<i>Aiouea maguireana</i> (C.K.Allen) S.S.Renner	Galhos

Tabela 5- Espécies vegetais investigadas

As exsiccatas das espécies encontram-se depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA) e foram identificadas no Projeto Flora da Reserva Ducke. Assim, com o objetivo de direcionar melhor a presente pesquisa, a fase inicial consistiu em uma caracterização alcaloídica de 27 partes de 16 espécies de Lauraceae pertencentes a 09 gêneros distintos, oriundas desse conjunto de plantas previamente coletadas e que se encontra devidamente armazenados no laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Amazonas.

4.2.2. Obtenção dos extratos e frações alcaloídicas

O material vegetal disponível (folhas e galhos) foi limpo, seco, triturado e passou pelo processo de extração de forma padronizada. Foram realizadas três extrações utilizando ultrassom por 20 minutos em etanol previamente destilado. Para concentração dos extratos se utilizou evaporador rotatório sob pressão reduzida (figura 21).



Figura 21- Etapas da obtenção dos extratos etanólicos das folhas e galhos

Depois de secos, os extratos foram submetidos à partição ácido-base de acordo com a metodologia proposta por Giordani *et al.* (2008), com algumas modificações. Assim, um grama de extrato etanólico, oriundo do material botânico triturado (galhos e folhas) foi solubilizado com solução de ácido clorídrico 3%. Para separar as substâncias apolares da mistura foi realizada uma partição com hexano. Na fração ácida adicionou-se diclorometano (4 vezes) para retirar as substâncias de média e baixa polaridade. Após a retirada do diclorometano a fração aquosa foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9-10 e extraída com o mesmo volume de diclorometano (4 vezes), gerando uma fração orgânica enriquecida em alcaloides. A fração foi seca sob ventilação forçada e teve sua massa medida para cálculo do rendimento. Na figura 22 é possível observar, a partir do extrato etanólico, um esquema das etapas para a obtenção das frações ricas em alcaloides.

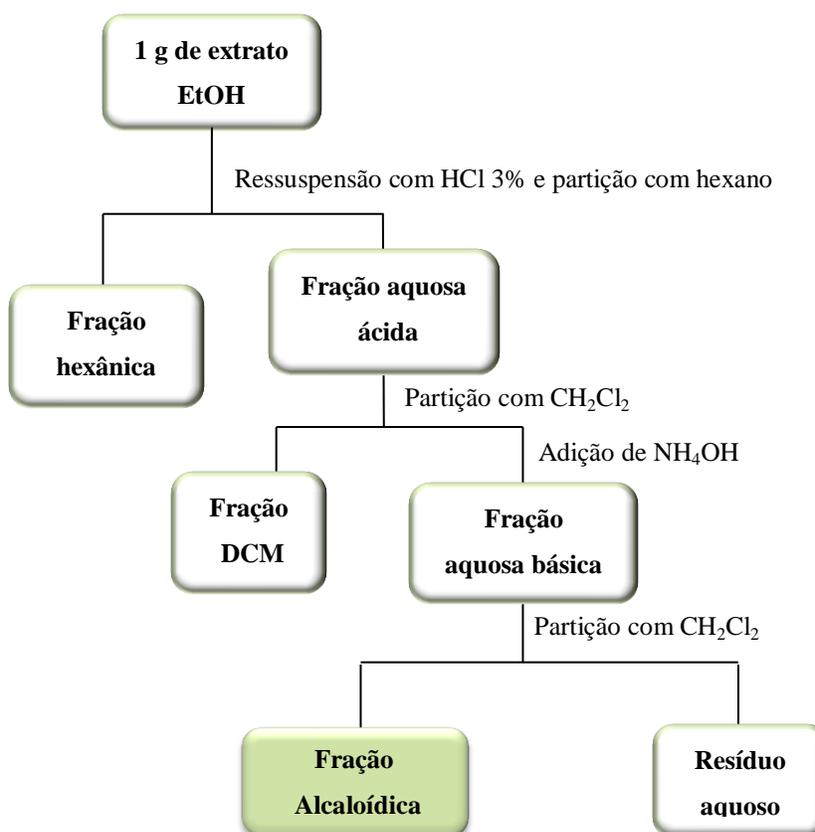


Figura 22- Etapas da obtenção das frações alcaloídicas na fase preliminar

4.2.3. Análise das frações alcaloídicas por CCD

A avaliação do comportamento cromatográfico de cada fração alcaloídica resultante das partições ácido-base foi avaliada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Assim, as frações alcaloídicas foram solubilizadas em diclorometano e aplicadas, com auxílio de capilar, em cromatofolhas de alumínio (AL TLC Silicagel 60 F254, Merck, 5 x 4 cm). O sistema foi mantido em câmara de saturação com eluente apropriado e revelado com revelador específico draggendorf.

4.2.4. Análise das frações alcaloídicas por espectrometria de massas

As amostras que apresentaram resultado positivo para o revelador dragendorff passaram por uma varredura em espectrômetro de massa o que sinalizou as investigações químicas a respeito da composição dos extratos. Dessa forma, para realizar o estudo do perfil alcaloídico em microescala nessa etapa preliminar foi utilizado espectrômetro de massa (EM) *ion trap* LCQ FleetTM (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de Eletrospray, operando no modo positivo e programado para monitorar a faixa de m/z 200-600 Da, adequado para alcaloides. As amostras foram solubilizadas para concentração de 5 ppm, usando metanol HPLC como solventes e injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas com fluxo de $30 \mu\text{L min}^{-1}$. As espécies investigadas nesse estudo foram selecionadas conforme a caracterização alcaloídica realizada por CCD e EM. Na figura 23 é possível observar um esquema geral das atividades metodológicas da fase preliminar desse estudo.



Figura 23 Esquema geral das atividades metodológicas da fase preliminar

4.3. FASE 2: Escolha da metodologia para obtenção das frações alcaloídicas

4.3.1. Recoleta das espécies selecionadas

Finalizada a etapa preliminar, referente à escolha das espécies de maior potencial para essa pesquisa, houve necessidade de se realizar uma nova coleta das espécies selecionadas em razão do material botânico presente no laboratório não ser suficiente para alcançar os objetivos desse estudo. Assim, no mês de agosto de 2013, folhas e galhos de três espécies selecionadas para isolamento de alcaloides pertencentes a dois gêneros distintos foram recoletadas no mesmo local e dos mesmos indivíduos de onde foram coletadas as espécies submetidas aos estudos preliminares.

Outras quatro espécies (duas pertencentes ao gênero *Aniba* e duas ao gênero *Licaria*), que apresentaram perfil favorável à presença de alcaloides, também foram

recoletadas com intenção de realizar testes biológicos com seus extratos e frações alcaloídicas, visto que de acordo com a literatura consultada, são espécies que apresentam potenciais antioxidantes e biológicos de interesse para essa pesquisa (YAMAGUCHI *et al.* 2012; ALCÂNTARA *et al.* 2010; KLAUSMEYER *et al.* 2004). Após a coleta, o material botânico foi separado, limpo, seco em estufa a 50 °C e triturado em moinho de quatro facas.

4.3.2. Metodologias de extrações de alcaloides

Foram testadas três metodologias de extração de alcaloides em microescala visando:

1- Realizar um monitoramento dos alcaloides presentes na matriz vegetal de cada espécie investigada;

2- Selecionar um método com melhor rendimento para a obtenção de maior quantidade de material para realização de testes biológicos utilizando frações alcaloídicas.

Para a realização de duas dessas metodologias foi necessário partir de extratos previamente preparados, enquanto que para a terceira metodologia essa etapa preliminar não foi necessária. Assim, para as duas primeiras metodologias foram feitos dois tipos de extrações de forma padronizada, similar à extração realizada na fase preliminar dessa pesquisa, utilizando solventes previamente destilados: extração em etanol com utilização de ultrassom por 20 minutos e extração Hex/MeOH também utilizando o mesmo equipamento, por 20 minutos. Os extratos resultantes das folhas e galhos foram secos em evaporador rotatório sob pressão reduzida e posteriormente submetida à partição ácido-base.

METODOLOGIA 1- A primeira metodologia utilizada para extração de alcaloides foi realizada a partir de 1 g de extrato bruto e seguiu a proposta de Giordani et al. (2008), descrita anteriormente na etapa preliminar dessa pesquisa.

METODOLOGIA 2- Para essa metodologia, adaptada da proposta de Costa *et al.* (2006), também se utilizou 1 g de extrato produzido a partir do material botânico triturado. Este foi solubilizado com DCM. Posteriormente, a mistura foi acidificada com solução de HCl 3% e particionada com DCM (4x). Após a retirada do solvente, a fração aquosa foi alcalinizada com NH_4OH até pH 9-10 e extraída com o mesmo volume de DCM (4x), gerando uma fração orgânica enriquecida em alcaloides. Para a secagem da amostra utilizou-se ventilação forçada. Depois de seco, o material teve sua massa medida para cálculo do rendimento (figura 24).

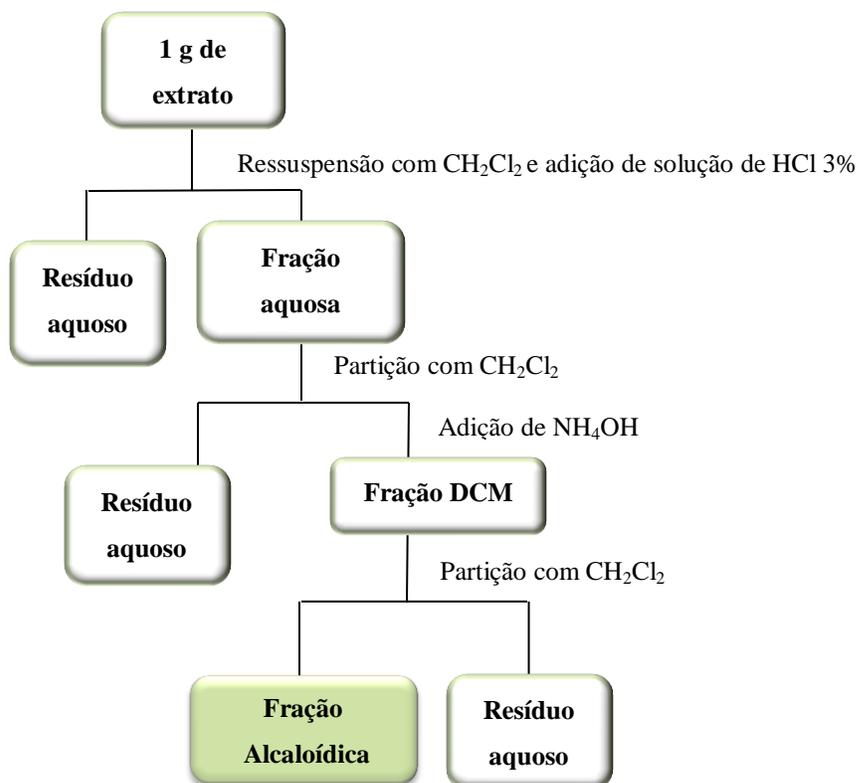


Figura 24- Obtenção da fração alcaloídica (método 2)

METODOLOGIA 3- A terceira metodologia testada, adaptada de Silva (2007), é mostrada na figura 25. A fração alcaloídica de cada espécie vegetal foi obtida a partir de 1g de material botânico triturado. A esse material foram adicionados 5 mL de solução de NH_4OH a 10%, seguida da adição de 5 mL de DCM. Procedeu-se a extração adicionando-se solução de ácido clorídrico 3% à fase DCM. Posteriormente, a camada ácida obtida foi ajustada até pH 9-10 e novamente extraída com DCM. A fase DCM rica em alcaloides foi levada à capela para secar e posteriormente teve sua massa medida e seu rendimento calculado.

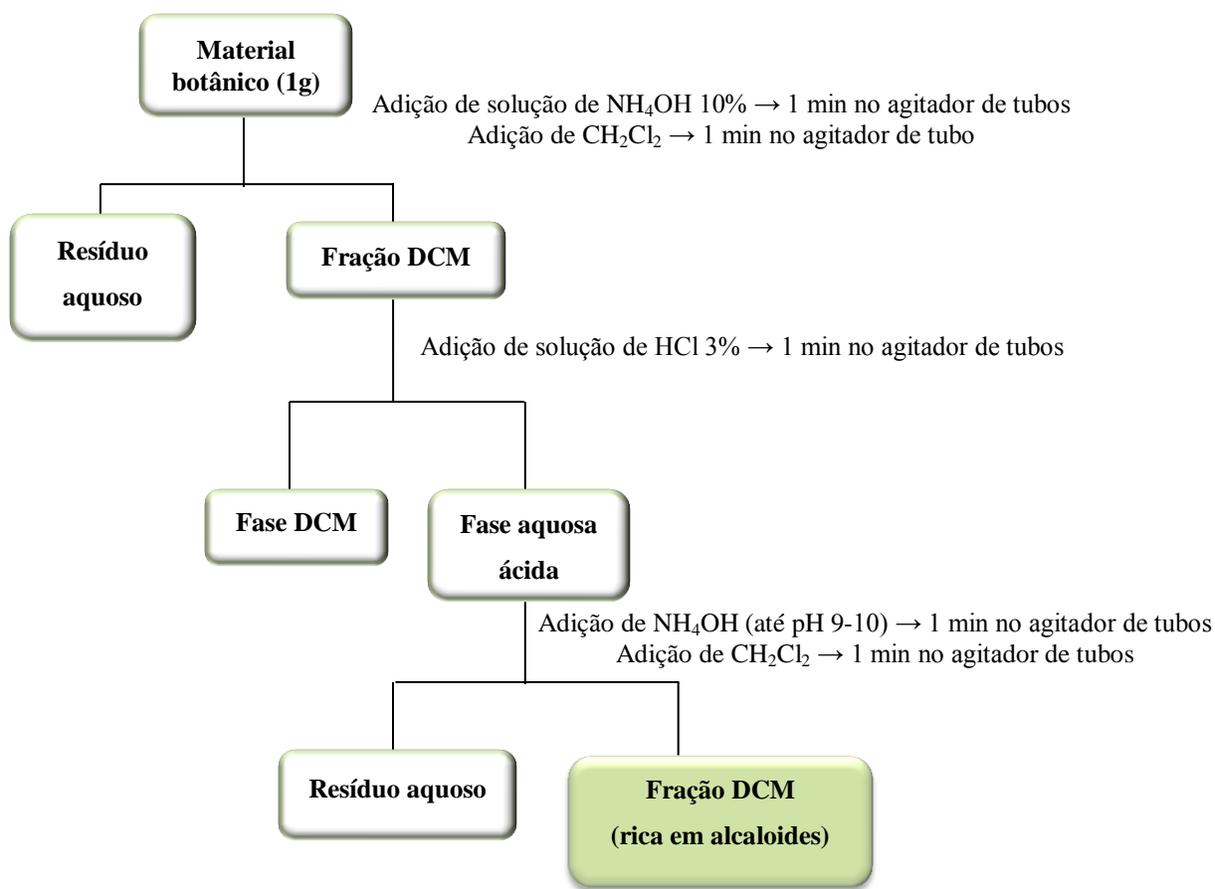


Figura 25- Obtenção da fração alcaloídica (método 3)

4.3.3. Detecção dos alcaloides

As separações foram observadas pelos reveladores físicos UV 254 nm, UV 365 nm, e pelos reveladores químicos vanilina sulfúrica e dragendorff. Eleita a metodologia que apresentou melhor rendimento, iniciou-se o processo de detecção dos alcaloides das espécies selecionadas. Para tanto, foi necessário preparar extrato em maior escala que seguiu o mesmo procedimento da fase preliminar. Posteriormente, foram realizadas partições também em maior escala e a avaliação do comportamento cromatográfico de cada amostra foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD).

4.4. FASE 3: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E BIOENSAIOS

4.4.1. Isolamento - Cromatografia em coluna aberta em fase normal (CC)

Para o isolamento dos alcaloides utilizou-se a cromatografia em coluna aberta em fase normal empacotada com gel de sílica Silicycle G60 (70-230 mesh). Os eluentes utilizados nos processos foram determinados por CCD. As CC foram realizadas em colunas de vidro com diâmetro interno ($\emptyset_{\text{int.}}$) de 1,5 cm e 2,0 cm e foram preparadas com uma base inferior de algodão (1,0 cm de altura). Seguem os procedimentos metodológicos realizados para o isolamento de alcaloides de cada uma das espécies investigadas.

Ocotea leucoxylon- Uma alíquota do extrato etanólico dos galhos de *O. leucoxylon* (5,0 g) foi solubilizada com a mistura de MeOH/ H₂O (8:2). Em seguida, foi feita partição líquido-líquido, utilizando hexano, com intuito de eliminar os constituintes apolares da mistura. A solução metanólica foi seca obtendo-se 3,3 g de extrato desengraxado. Com essa massa, foi realizado um pré-fracionamento cromatográfico em coluna aberta (3,0 cm de diâmetro e 75 cm de altura) tendo como fase móvel a mistura de acetato de etila, clorofórmio e metanol, determinados por CCD, em gradiente crescente de polaridade.

As frações foram coletadas em erlenmeyer de 125 ml e, depois do solvente evaporado, foram transferidas para frascos de 10 ml, obtendo-se 33 frações. As frações 8, 9, 9.1, 10, 11, 12, 13 e 14 foram reunidas (386,7 mg) conforme semelhança de perfis frente à CCD revelada com reagente dragendorff. Então, foi realizado um fracionamento que, de acordo com CCD, teve como fase móvel a mistura de acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade. Assim, 11 novas frações foram originadas e coletadas em erlenmeyer de 125 ml e depois do solvente evaporado, foram transferidas para frascos de

10 ml. As frações 6, 7, 8 e 9 (90,7 mg) apresentaram perfis semelhantes e foram reunidas e submetidas a processo de recristalização utilizando hexano, dicloro metano, acetato de etila e metanol. Na figura 26 é apresentado o esquema do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico dos galhos dessa espécie.

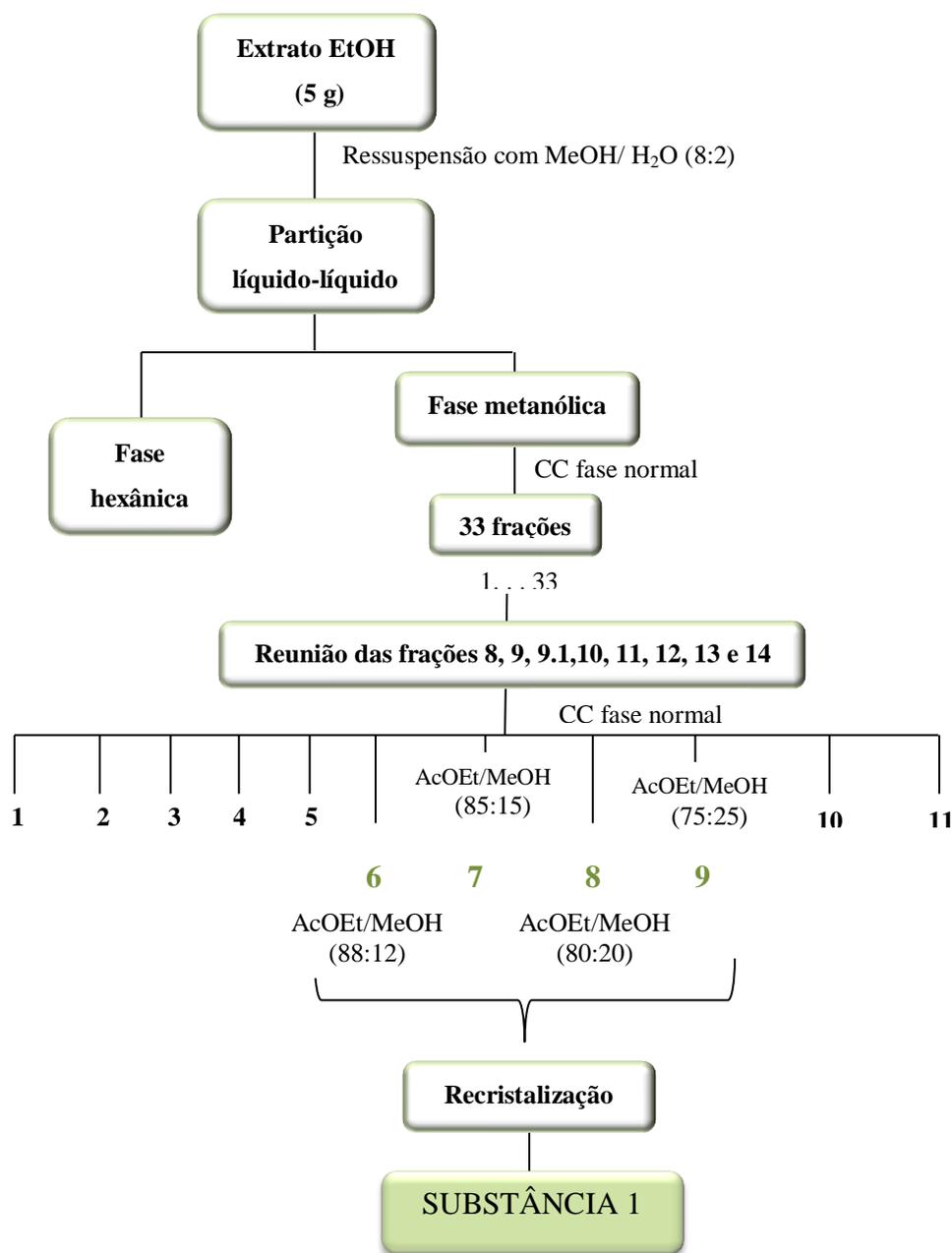


Figura 26- Fracionamento do extrato dos galhos *O. leucoxydon*

Aniba ferrea- Três gramas de extrato etanólico dos galhos de *A. ferrea* foram solubilizados em uma mistura de MeOH/H₂O (8:2). Em seguida, utilizando solvente hexano, foi feita uma partição líquido-líquido com intuito de eliminar os constituintes apolares da mistura. A solução metanólica resultante foi seca e posteriormente foi realizado um pré-fracionamento cromatográfico com 2,98 g de extrato desengraxado em coluna aberta em fase normal tendo como fase móvel a mistura de Hex, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade.

As frações foram coletadas em erlenmeyer de 125 ml e, depois do solvente evaporado, transferidas para frascos de 10 ml, obtendo-se 12 frações. As frações 11 e 12 foram reunidas (79,9 mg) conforme semelhança de perfis frente à CCD revelada com reagente dragendorff. O fracionamento em coluna aberta das amostras reunidas originou 13 novas frações coletadas em frascos de 10 ml (figura 27).

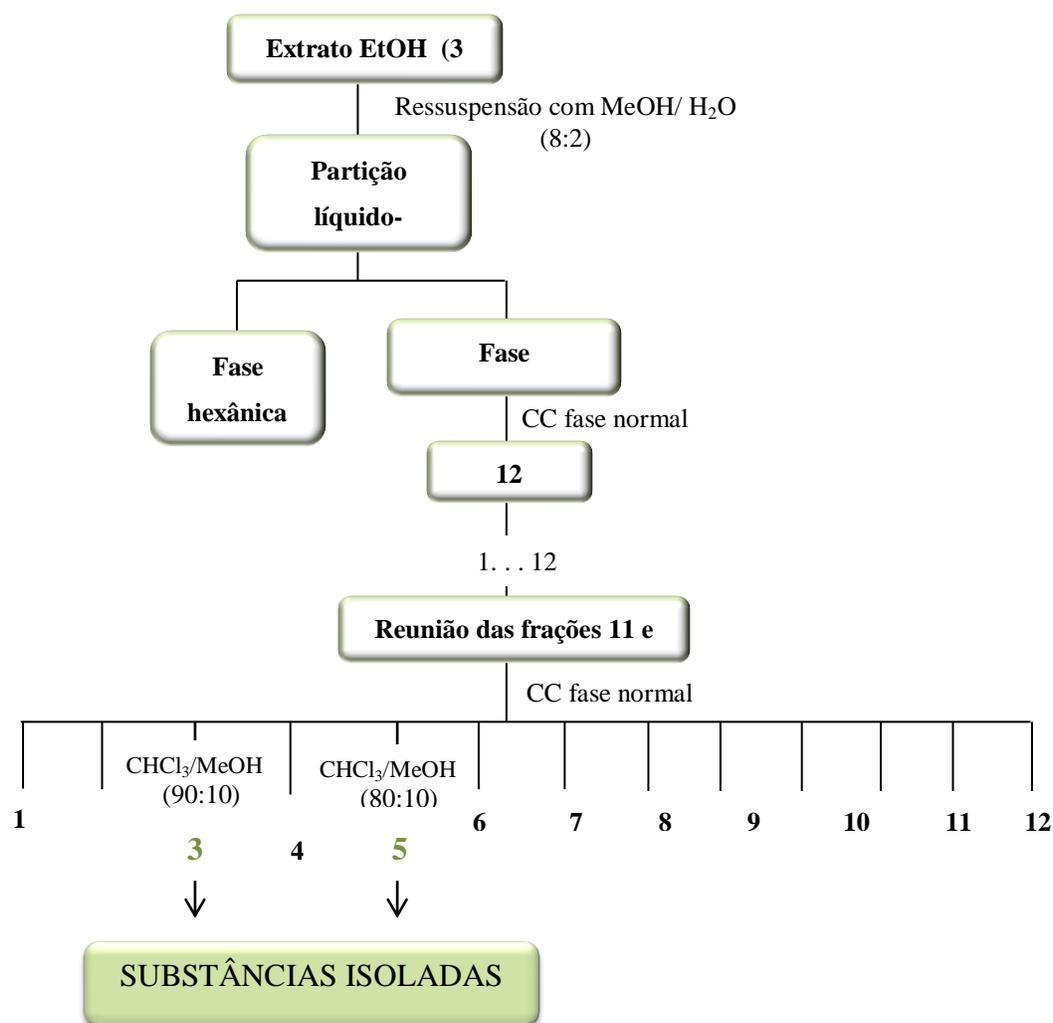


Figura 27- Fracionamento do extrato dos galhos de *A. ferrea*

Aniba panurensis- Utilizando-se uma mistura de MeOH/ H₂O (8:2), solubilizou-se 3 g de extrato etanólico dos galhos de *A. panurensis*. Em seguida foi feita uma partição líquido- líquido com hexano visando retirar as substâncias de baixa polaridade. A fase metanólica foi seca originando 268 g de extrato desengraxado. Com essa massa realizou-se um fracionamento cromatográfico em coluna aberta (2,0 cm de diâmetro e 75 cm de altura)

tendo como fases móveis Hex, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade. As frações foram coletadas em erlenmeyer de 125 ml e, depois do solvente evaporado, transferidas para frascos de 10 ml obtendo-se 21 frações. As etapas desse procedimento podem ser observadas na figura 28.

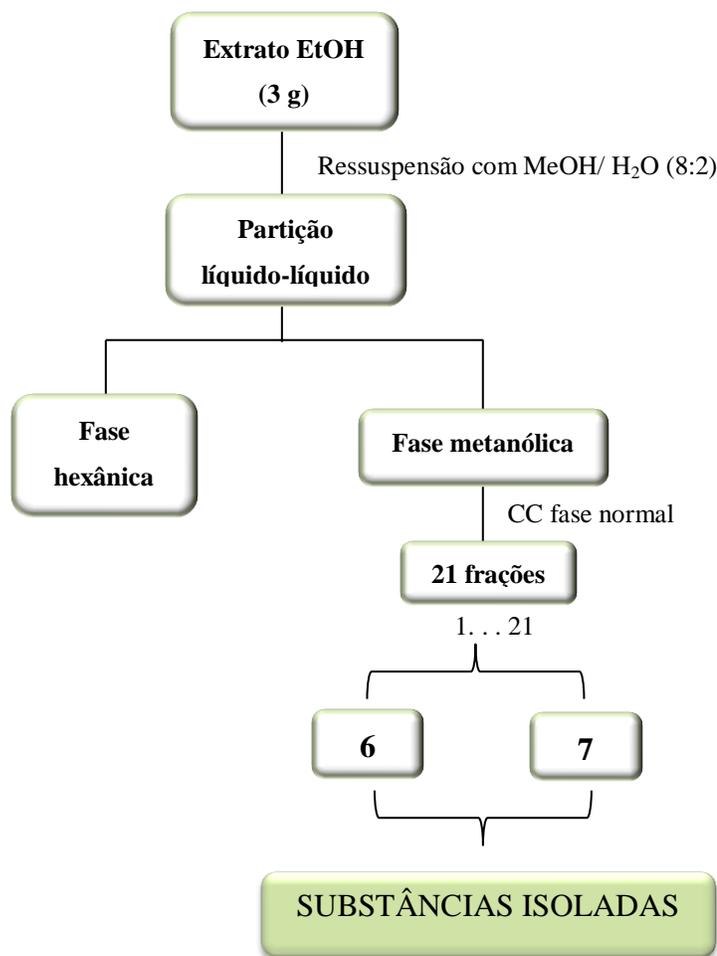


Figura 28- Fracionamento dos galhos de *A. panurensis*

4.4.2. Identificação – Espectrometria de Massas e Espectroscopia de Ressonância

Magnética Nuclear

Para análise das amostras oriundas de fracionamento em coluna aberta foram utilizadas as técnicas espectrométricas (EM) e técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e ^{13}C). Os espectros de massas foram registradas no espectrômetro LCQ FleetTM (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de Eletrospray, operando no modo positivo e programado para monitorar a faixa de m/z 200-600, adequado para alcaloides, da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As amostras foram solubilizadas para concentração de 5 ppm, usando metanol grau HPLC como solvente e injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas com fluxo de $30 \mu\text{L min}^{-1}$.

Os experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional e bidimensional foram realizados em espectrômetro INOVA-500 da Varian, localizado na Central analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). Os espectros unidimensionais de RMN ^1H foram operados em 500 MHz e de RMN ^{13}C com Hidrogênio desacoplado foram operados 125 MHz. Foram realizados ainda os experimentos de correlação heteronuclear múltipla simples (HSQC) e de correlação heteronuclear de múltiplas ligações (HMBC). As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno TMS ($\delta= 0,00$) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (tripleto) e m (multiplete).

4.4.3. Ensaio quimicos/biológicos

Os ensaios biológicos de atividade antimicrobiana e de citotoxicidade, bem como o de varredura de radicais livres frente ao radical DPPH e ao cátion radical ABTS•+, foram realizados no Laboratório de Atividades Biológicas I (BIOPHAR) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. A esses ensaios foram submetidos os extratos, frações e substâncias isoladas.

4.4.3.1. Varredura de radicais livres

Os extratos e as frações contendo alcalóides foram submetidos à avaliação de suas atividades antioxidantes. Para tanto se utilizou os métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e ABTS•+ (2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato).

a) Ensaio qualitativo da atividade antioxidante (DPPH)

Foi realizado teste de atividade antioxidante qualitativo por meio da capacidade sequestrante do radical estável DPPH em soluções com solvente metanol, por trinta segundos. Cerca de 5 µL de extrato bruto, fração alcaloídica e também do padrão quercetina foram aplicadas sobre uma cromatoplaça de sílica gel na concentração de 1 g/mL em temperatura ambiente. Depois da evaporação do solvente, nebulizou-se a placa com solução em metanol de DPPH a 0,3 mM/mL. A atividade antioxidante foi observada pela presença de manchas amarelas ou brancas decorrentes da redução do DPPH, contra a

coloração púrpura de fundo (SOLER-RIVAS *et al.*, 2000). O esquema do ensaio qualitativo DPPH, pode ser observado na figura 29.

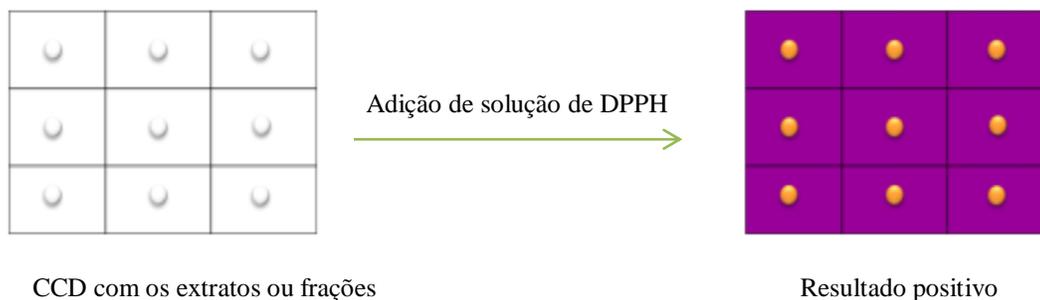


Figura 29- Esquema do ensaio qualitativo de DPPH

b) Ensaio quantitativo da atividade antioxidante DPPH

A atividade antioxidante quantitativa foi avaliada por meio da capacidade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH.), utilizando o flavonoide quercetina como padrão antioxidante, expressos como valores de concentração eficiente (CE50). Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e preparados em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 $\mu\text{g/mL}$). Em uma microplaca de 96 poços, adicionou-se 30 μL dos extratos e do padrão (em triplicata) em diferentes concentrações e, em seguida, adicionou-se 270 μL da solução de DPPH (0,8 mmol/L) em cada poço.

As leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas após 30 minutos da adição da solução de DPPH, em espectrofotômetro de UV/VIS Beckman Coulter DXT 800

a 517 nm. Por meio dos valores obtidos das leituras das absorbâncias e por regressão linear foram obtidos os valores de CE50 (MENSOR, 2001).

c) Ensaio quantitativo do cátion radical ABTS^{•+}

O método é baseado na redução do cátion radical 2,2'-azinobis (3-etilfeniltiazolina-6- sulfonato) utilizando TROLOX[®] como antioxidante padrão. Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e na concentração de 100 µg/mL foram adicionados 30 µL de cada extrato (em triplicata) em uma microplaca de 96 poços. Em seguida adicionou-se 270 µL da solução do padrão (0,8 mmol/L). As leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas após 30 minutos da adição da solução padrão em espectrofotômetro de UV/VIS Beckman Coulter DXT 800 a 715 nm (RE *et al.*, 1998).

4.4.3.1. Citotoxicidade em células tumorais

O ensaio de citotoxicidade foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, sob supervisão da Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos. A citotoxicidade foi avaliada pelo método de alamar blue (NAKAYAMA *et al.* 1997). Neste ensaio foi utilizada sete linhagens de células: seis tipos de linhagens tumorais e uma linhagem de células normais: HT1080 (fibrosarcoma humano), HCT116 (cólon - humano), MCF-7 (mama- humano, linhagem de células normais), MRC5 (fibroblastos de pulmão humanos), ACP02 (adenocarcinoma gástrico) e SKIMEL 3 e 9

(Melanomas) cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos.

As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C, as mesmas foram tratadas com os extratos, frações e substância isolada solubilizados em DMSO puro estéril e testadas nas seguintes concentrações: 50 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µM/mL, respectivamente para um *screening* inicial. Como controle negativo foi utilizado somente meio de cultura.

Após esse procedimento as amostra voltaram à estufa por 72. Ao término desse período foi adicionado 10 µL de resazurina 0,4% (diluída 1: 20) em cada orifício da placa. Posteriormente ao tempo padronizado de metabolização da resazurina, que compreendeu o período de 2 horas, foi realizada a leitura da fluorescência. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula: % viabilidade = $F_t \times 100 / F_b$, onde F_t = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e F_b = (fluorescência da célula + meio + resazurina).

4.4.3.3. Atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobianos dos extratos brutos, frações alcalóidicas e substâncias isoladas foram realizados no Instituto de Pesquisa Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ, sob supervisão da Dra. Patrícia Orlandi Nogueira, frente às bactérias descritas na tabela 6. A seguir são descritas detalhadamente as etapas para realização do presente ensaio.

Bactérias Gram-Negativas

DAEC - <i>Escherichia coli</i> aderência	F1845
ETEC- <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica LT	LT2871
ETEC- <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica ST	ST8
EIEC- <i>Escherichia coli</i> -INV- enteroenvasora	ATCC 1381
EPEC- <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica típica	ATCC E234869
EAEC- <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	ATCC 042
<i>Escherichia coli</i> não diarreio gênica	ATCC 10536
EHEC- <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	CDC-EDL933-171-0157: H3
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 13313
<i>Shigella flexnerie</i>	ATCC 12022-152
<i>Vibrio cholerae</i>	ATCC 9458-156
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352-083
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 15290-095
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 14756-131
<i>Hafnia alvei</i>	ATCC 11601-120
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606-143
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 43864-576
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC9610-098
<i>Pseudomonas putida</i> (oralis)	ATCC 15175-113
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDC EDL-1284,
<i>Salmonella enterica</i> Choleraesuis	ATCC 10708-028
<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhimurium	ATCC 13311-084

Bactérias Gram-Positivas

<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615
<i>Streptococcus galolyticus</i>	ATCC 9809
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 11733
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis (CT)	ATCC 6051
<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>)	ATCC 4083
<i>Listeria inócua</i>	ATCC 33090
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 7953
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 80958
<i>Staphylococcus</i> sp.	ATCC 23235
<i>Staphylococcus sumulans</i>	ATCC27851
<i>Staphylococcus resistente a meticilina</i>	MRSA

Tabela 6- Bactérias utilizadas para teste antimicrobiano

ETAPA I-Preparo das amostras analisadas

Para o *screening* inicial foram testados quatorze extratos etanólicos, quatorze frações alcaloídicas e duas substâncias isoladas proveniente de folhas e galhos das espécies eleitas para esse estudo. Os extratos e frações foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 5 mg/mL e as substâncias isoladas em 1 mg/mL.

ETAPA II-Preparação das placas

Para esse procedimento foi necessário o preparo prévio do meio de cultura líquido (meio onde as bactérias foram colocadas para crescer) e em placa (meio onde foi realizado o antibiograma) realizado em câmara de fluxo laminar. Para a preparação do meio líquido diluiu-se o meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion Broth) em água deionizada na concentração de 37 g/L, com utilização de forno de micro-ondas para ajudar no processo de solubilização. Em seguida, colocou-se 3 mL desse meio de cultura em tubos de ensaio que foram autoclavados em estufa em temperatura de 120 a 140 °C para total esterelização.

De forma similar, foi preparado em balão de 500 mL o meio de cultura em placa só que utilizando o meio Agar Müller Hinton II (AMH). Após a esterilização, a solução foi depositada nas placas de 90 x 15 mm em duas camadas: a inferior contendo 10 mL de AMH (colocada em repouso por 30 minutos para enrijecimento) e a segunda mais espessa (15 mL) que ficou em repouso por 1 hora para solidificar. Em seguida, foram feitos orifícios cilíndricos de aproximadamente 6 mm de diâmetro com o auxílio de ponteiras estéreis de 200 µL de maneira equidistante para evitar zonas de inibição convergentes.

ETAPA III-Preparação do inóculo

Para essa etapa, as cepas selecionadas foram cultivadas em 3 mL do meio líquido BHI (Brain Heart Infusion Broth) preparado anteriormente. Assim, selecionou-se para a inoculação 3 a 5 colônias isoladas, sendo posteriormente incubadas a 37 °C, por 24 horas (NCCLS, 2005). Para o preparo do inóculo bacteriano, uma alíquota de 50 a 100 µL do meio de cultura foi transferida com auxílio de micropipeta para tubos contendo 3 mL de meio estéril e este foi comparado até atingir a turvação padrão de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

ETAPA IV-Atividade antibacteriana por teste de difusão em ágar pela técnica de difusão em poço.

O processo de estriamento das placas iniciou-se logo após o preparo do inóculo. Para isso, foi inserido um swab estéril em cada um dos diferentes tubos contendo os diferentes inóculos. Após tal procedimento, os microorganismos alvos foram semeados em toda a superfície da placa em três direções, girando a placa aproximadamente 60° com o objetivo assegurar distribuição uniforme do inóculo. Por último, o swab foi passado na margem da placa.

Para que o inóculo fosse completamente absorvido pelo meio, deixou-se as placas entreabertas por 5 a 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta, foram adicionados nos poços, devidamente identificados, o controle positivo (antibiótico Imipenem na concentração de 30 µg/mL tanto para as bactérias Gram-Positivas quanto para as Gram-Negativas), o controle negativo (solvente adequado) e as

amostras vegetais. Depois disso, as placas foram colocadas em estufa a 37 °C por um período de 24 horas.

Após o período de incubação, identificou-se a formação de halos nas amostras com resultado positivo. Para melhor visualização dos halos de inibição foi preparado o revelador cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) a 1% acrescido 0,1% de Ágar bacteriológico. Sobre cada placa foram adicionados 8 mL desse corante seguido da incubação das mesmas sob temperatura de 37 °C por 30 minutos. Ao fim deste período, os halos de inibição foram visualizados por meio da conversão da coloração nos locais onde houve crescimento bacteriano na placa. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com auxílio de uma régua milimetrada (ALMEIDA, 2007).

ETAPA V-Método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração bactericida mínima é a quantidade mínima de agente antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana, ou seja, provocar danos irreversíveis a célula bacteriana, sendo possível avaliar se o composto é bacteriostático ou bactericida (BARON e FINEGOLD,1990).

Para esse teste foram utilizadas as amostras que apresentaram resultado positivo para o teste descrito anteriormente. Visando obter a concentração compatível com a escala 0,5 de McFarland, os inóculos foram preparados de forma similar ao descrito anteriormente. Em seguida, foram acrescidos 100 µL de meio em cada um dos 96 orifícios (8 linhas e 12 colunas) de uma placa de microtitulação.

Nos orifícios da linha 1 foram acrescentados mais 60 μL do meio e 40 μL da amostra. O conteúdo dos orifícios da linha 1 foi homogeneizado e 100 μL foram retirados e acrescentados aos orifícios da linha 2, em suas respectivas colunas, sendo novamente homogeneizados. Assim, 100 μL foram transferidos sucessivamente até os orifícios da linha 10 (a partir da anterior) e ao final, o conteúdo desta última linha (100 μL), foi retirado e descartado. Após tal procedimento, os orifícios da linha 1 a 11 foram completados com mais 60 μL do meio estéril, 20 μL de resazurina 0,01% (filtrada como indicador colorimétrico de oxi-redução para caracterizar a viabilidade celular) e 20 μL de inóculo a 0,5 da escala McFarland, sendo que nas linhas 1 e 10 houve uma concentração que variou de 1000 a 1,95 μg das amostras.

Nas colunas E e F, colocou-se os controles, sendo que no controle de esterilidade foi acrescentando 80 μL do meio estéril e 20 μL de resazurina 0,01% filtrada, e no controle negativo foi acrescentado 60 μL de meio estéril e 20 μL de resazurina e mais 20 μL de inóculo. Após isso, a placa foi incubada a 37° C por 24 horas. Depois desse tempo, foi realizada a leitura nos poços. A reação foi considerada negativa onde houve a conversão do corante azul para rosa (ou incolor) e positiva onde os poços permaneceram com coloração azul.

5. RESULTADOS

5.1. FASE 1: Prospecção preliminar

5.1.1. Análise das frações alcaloídicas por CCD

Com a intenção de se obter informações preliminares importantes para a eleição das plantas investigadas, foram submetidos à partição ácido-base para alcaloides 29 extratos de folhas e galhos de 20 espécies pertencentes a 9 gêneros distintos de Lauraceae. Dos extratos submetidos à marcha alcaloídica, observou-se resultado positivo para o reagente dragendorff em mais de 50% das amostras testadas (tabela 7).

Espécies	Órgão vegetal	Resultado para Dragendorff
<i>Ocotea leucoxylon</i> (Sw.) Laness	Folhas	+
<i>Ocotea leucoxylon</i> (Sw.) Laness	Galhos	+
<i>Licaria canella</i> (Meissn.) Kosterman. <i>angustata</i> Kurzj	Folhas	+
<i>Licaria canella</i> (Meissn.) Kosterman. <i>angustata</i> Kurz	Galhos	+
<i>Licaria martiniana</i> (Mez) Kosterm	Folhas	+
<i>Licaria martiniana</i> (Mez) Kosterm	Galhos	+
<i>Endlicheria sericea</i> Nees	Folhas	+
<i>Endlicheria sericea</i> Nees	Galhos	+
<i>Aniba panurensis</i> (Meisn.) Mez	Folhas	+
<i>Aniba panurensis</i> (Meisn.) Mez	Galhos	+
<i>Aniba guianensis</i> Aublet	Galhos	+
<i>Aniba ferrea</i> Kubitzki	Galhos	+
<i>Aniba parviflora</i> Aublet	Galhos	+
<i>Pleurotyrium parviflorum</i> Ducke	Galhos	+
<i>Rhodostemonodapne recurva</i> van der Werf	Galhos	+
<i>Aniba parviflora</i> Aublet	Folhas	-
<i>Aniba guianensis</i> Aublet	Folhas	-
<i>Endlicheria anomala</i> (Nees) Mez	Folhas	-
<i>Endlicheria anomala</i> (Nees) Mez	Galhos	-
<i>Mezilaurus duckei</i> van der Werf	Folhas	-
<i>Mezilaurus duckei</i> van der Werf	Galhos	-
<i>Pleurotyrium vasquezii</i> van der Werff	Folhas	-
<i>Pleurotyrium parviflorum</i> Ducke	Folhas	-
<i>Rhodostemonodaphne crenaticupula</i> Madriñan	Galhos	-
<i>Rhodostemonodaphne crenaticupula</i> Madriñan	Folhas	-
<i>Sextonia rubra</i> Mez	Folhas	-
<i>Aiouea maguireana</i> (C.K.Allen) S.S.Renner	Galhos	-

Tabela 7- Prospecção fitoquímica para alcalóides (+)- resultado positivo; (-) resultado negativo.

As partições ácido-base foram realizadas de acordo com o método de Giordani *et al.* (2008), com modificações. As placas cromatográficas em fase normal com os resultados das espécies que apresentaram resultado positivo para o reagente dragendorff estão expressas na figura 30 e as condições da análise estão descritas na tabela 8.

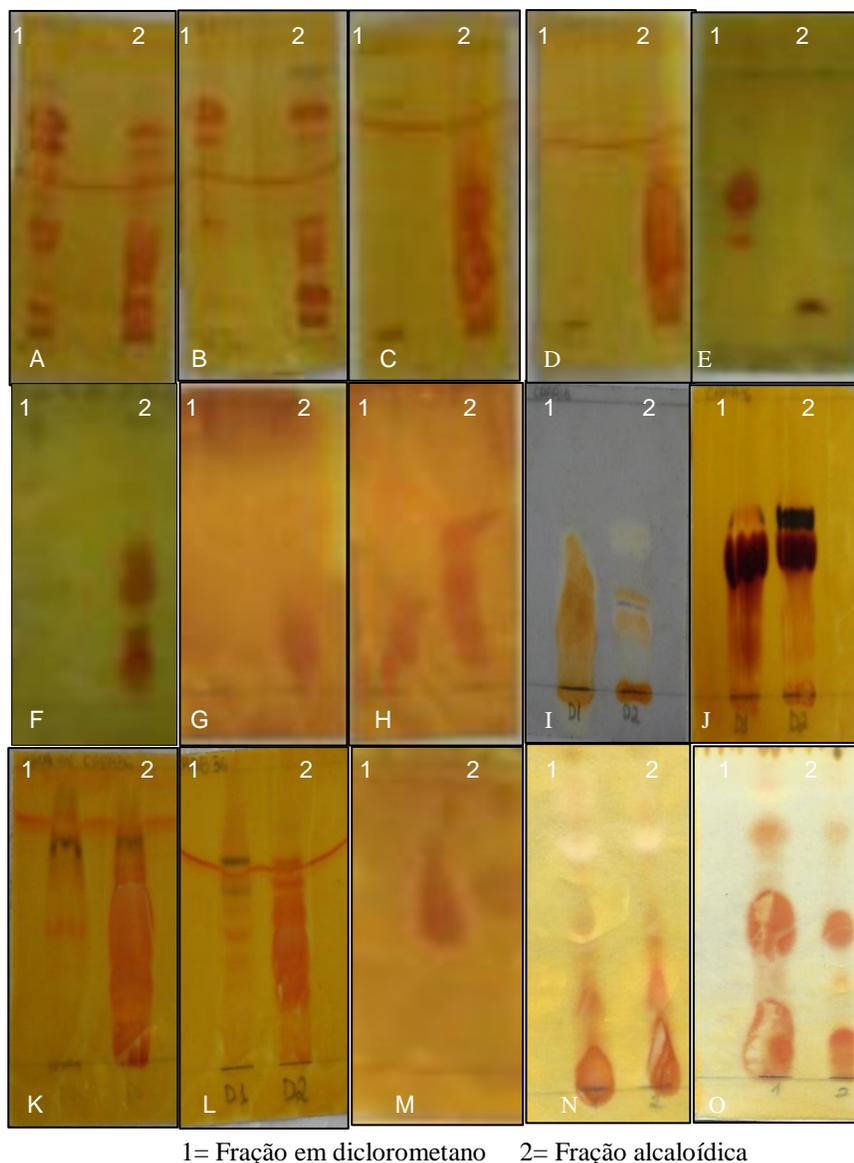


Figura 30- Placas cromatográficas reveladas com Dragendorff A- *O. leucoxylon* (folhas); B- *O. leucoxylon* (galhos); C- *L. canella angustata* (folhas); D- *L. canella angustata* (galhos); E- *L. martiniana* (folhas); F- *L. martiniana* (galhos); G- *E. sericea* (folhas); H- *E. sericea* (galhos); I- *A. panurensis* (folhas); J- *A. panurensis* (galhos); K- *A. guianensis* (galhos); L- *A. ferrea* (galhos); M- *A. parviflora* (galhos); N- *P. parviflorum* (galhos); O- *R. recurva* (galhos).

Espécie	Placa	Condições de análise	
		Eluente	Fase
<i>O. leucoxyton</i> (folhas)	A	CHCl ₃ - MeOH (9:1)	Normal
<i>O. leucoxyton</i> (galhos)	B	CHCl ₃ - MeOH (9:1)	Normal
<i>L. canella angustata</i> (folhas)	C	CHCl ₃ - MeOH (7,5:2,5)	Normal
<i>L. canella angustata</i> (galhos)	D	CHCl ₃ - MeOH (7,5:2,5)	Normal
<i>L. martiniana</i> (folhas)	E	CH ₂ Cl ₂ - MeOH- H ₂ O (8:2)	Normal
<i>L. martiniana</i> (galhos)	F	CH ₂ Cl ₂ - MeOH- H ₂ O (8:2)	Normal
<i>E. sericea</i> (folhas)	H	CH ₂ Cl ₂ - MeOH- H ₂ O (7:2:1)	Normal
<i>E. sericea</i> (galhos)	H	CH ₂ Cl ₂ - MeOH- H ₂ O 7:2:1)	Normal
<i>A. panurensis</i> (folhas)	I	Hex - CHCl ₃ - AcOEt (7:3:2)	Normal
<i>A. panurensis</i> (galhos)	J	Hex - CHCl ₃ - AcOEt (7:3:2)	Normal
<i>A. guianensis</i> (galhos)	K	CH ₂ Cl ₂ - MeOH- H ₂ O (8:2)	Normal
<i>A. ferrea</i> (galhos)	L	CHCl ₃ - MeOH (8,5:1,5)	Normal
<i>A. parviflora</i> (galhos)	L	CHCl ₃ - MeOH (8,5:1,5)	Normal
<i>P. parviflorum</i> (galhos)	N	CH ₂ Cl ₂ - MeOH- H ₂ O (7:2:1)	Normal
<i>R. recurva</i> (galhos)	M	CH ₂ Cl ₂ - MeOH- H ₂ O (7:2:1)	Normal

Tabela 8- Condições de análise das CCD das frações alcalóidicas

Diante do resultado obtido, realizou-se uma varredura das frações alcalóidicas em espectrômetro de massas das amostras que apresentaram resultado positivo para o reagente dragendorff. Tal procedimento foi crucial para a escolha das espécies que foram investigadas, uma vez que a rápida identificação de compostos conhecidos em misturas complexas ajuda a direcionar as investigações químicas a respeito da composição dos extratos, além de contribuir para a triagem de gêneros e espécies promissoras. Assim, mesmo que a triagem preliminar realizada com infusão direta em espectrômetro de massas não seja um método quantitativo, foi possível comparar os dados obtidos para a classe de interesse para esse estudo com os encontrados na literatura e assim verificar a proximidade que há entre os alcalóides já descritos e a composição de amostras investigadas.

5.1.2. Análise das frações alcaloídicas por espectrometria de massas

É muito comum na família Lauraceae a presença de alcaloides, principalmente da classe dos isoquinolínicos. Destes, são predominantes compostos com esqueletos aporfínicos, oxoaporfínicos e benzilisoquinolínicos. Por meio de espectrometria de massas, operando no modo positivo, foi possível analisar os perfis das frações e, dessa forma, selecionar as espécies mais promissoras.

Vale ressaltar, que para a etapa preliminar os espectros de massas não foram feitos em alta resolução e também não foi realizada fragmentação dos íons presentes nas frações analisadas, visto que “*a priori*” a intenção foi realizar uma triagem por meio de CCD e EM (*full scan*) em buscas das espécies mais promissoras. Depois de selecionadas as espécies, foram realizadas análises mais detalhadas por meio de métodos espectrométricos e espectroscópicos visando à elucidação das substâncias isoladas.

A análise dos espectros de massas total das quinze frações alcaloídicas correspondentes aos seis gêneros diferentes de Lauraceae obtidos nas mesmas condições experimentais, revelou que os íons com maior intensidade foram m/z 330, 300, 356, 314 e 288. Os dois primeiros íons (330 e 300) foram observados na maioria das frações como majoritários. Estes podem corresponder aos alcaloides reticulina e N-metilcoclaurina, respectivamente, sendo ambos descritos como alcaloides isolados de gêneros de Lauraceae (SULAIMAN *et al.*, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2003). Na tabela 9, é possível observar todos os íons correspondentes às amostras inseridas em espectrômetro de massas, bem como a massa o M+1 observada, a intensidade desses íons, a sugestões de nomes para os possíveis alcaloides e a referência consultada.

Espécie	Órgão	Massa	M+1	Intensidade (%)	Alcalóide sugerido	Referência
<i>O. leucoxydon</i>	Folhas	355	356	100,0	6-dicentrina N-óxido, ocokriptina, leucoxina	Garcez <i>et al.</i> , 2011; Zanin <i>et al.</i> , 2011; Cava <i>et al.</i> , 1968
		341	342	81,0	O- metilarmepavina metiodida; magnoflorina iodida	Wu & Huang, 2006
		369	370	17,0	N-formil-3-metóxi-nordomesticina; papaveraldina-N-óxido; ocoteina, N-metilglaucina	Pabon & Cuca (2010); Wu & Huang, 2006; Zhou <i>et al.</i> , 2000; Guinaudeau, 1983;
		381	382	10,0	talflavidina chlorida	Wu & Huang, 2006
		443	444	2,0	sem sugestão	
		399	400	1,0	sem sugestão	
	Galhos	355	356	100,0	6-dicentrina N-óxido, ococryptina, leucoxina	Garcez <i>et al.</i> , 2011; Zanin <i>et al.</i> , 2011; Cava <i>et al.</i> , 1968
		341	342	29,0	O- metilarmepavina metiodida; magnoflorina iodida	Wu & Huang, 2006
		371	372	5,0	norocoxilonina	Garcez <i>et al.</i> , 2011
		281	382	2,5	talflavidina chlorida	Wu & Huang, 2006
517		518	1,5	sem sugestão		
<i>L. canella angustata</i>	Folhas	313	314	100,0	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		329	330	30,5	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		281	282	28,0	Nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007
	Galhos	299	300	100,0	N-metilcoclaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		329	330	82,0	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		313	314	20,0	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		285	286	12,0	Coclaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
<i>L. martiniana</i>	Folhas	299	300	100	N-metilcoclaurina; 14-episiomenina;(-)-Nmetilisococlaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Vecchietti <i>et al.</i> , 1977; Saidi <i>et al.</i> , 20
		329	330	83	Reticulina; Ocobotrina;	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Vecchietti <i>et al.</i> , 1977;
		193	194	27	Coripalina	Wu & Huang, 2006
		396	397	24	Ocominarona	Vecchietti, 1979
	Galhos	193	194	71	Escopoletina cumarina	Garcez, 2005
		313	34	42	Norboldina; (+)-6-metoxi-1-(3-metoxi-benzil)-N-meil-7-isoquinolinol; armepavina; laureliptina;	Wu <i>et al.</i> , 2010; Saidi <i>et al.</i> , 2011; Johns, 1969; Yariwake Vilegas, 1989
<i>E. sericea</i>	Folhas	329	330	100	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		281	282	28,0	Nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007
		443	444	22,5	sem sugestão	
		285	286	19,0	Coclaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003; Silva, <i>et al.</i> , 2002
		313	314	13,5	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		369	370	10,0	N-formil-3-metóxi nordomesticina; papaveraldina-N-óxido; ocoteina; N-metilglaucina	Pabon & Cuca (2010); Wu & Huang, 2006; Zhou <i>et al.</i> , 2000; Guinaudeau, 1983;
	Galhos	281	282	47,0	Nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007

		327	328	24,	boldina; <i>O</i> -metilarmepavina; isoboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010; Wu & Huang, 2006
		355	356	21,0	6- dicentrina N-óxido; ocokriptina, leucoxina	Garcez <i>et al.</i> , 2011; Zanin <i>et al.</i> , 2011; Cava <i>et al.</i> , 1968
		341	342	18,0	<i>O</i> - metilarmepavina metiodida; magnoflorina iodida.	Wu & Huang, 2006
		369	370	14,0	N-formil-3-metóxi nordomesticina; papaveraldina- <i>N</i> -óxido; ocoteina; N-metilglaucina	Pabon & Cuca (2010); Wu & Huang, 2006 Zhou <i>et al.</i> , 2000; Guinaudeau, 1983;
<i>A. panurensis</i>	Folhas	288	289	100	Sem sugestão	
		296	297	34	Sem sugestão	
		314	315	25	Sem sugestão	
		372	373	23	Sem sugestão	
		329	330	15	Sem sugestão	
	Galhos	288	289	100,0	Sem sugestão	
		272	273	5,0	Sem sugestão	
		228	229	25,0	Sem sugestão	
<i>A. guianensis</i>	Galhos	329	330	100,0	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		299	300	88,0	N-metilcoclorina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		281	282	38,0	Nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007
		313	314	9,0	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		341	342	8,5	<i>O</i> - metilarmepavina metiodida magnoflorina iodida	Wu & Huang, 2006
<i>A. ferrea</i>	Galhos	299	300	100,0	N-metilcoclorina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		329	330	60,0	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		345	346	35,0	sem sugestão	
<i>A. parviflora</i>	Galhos	329	330	100,0	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		299	300	32,0	N-metilcoclorina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		143	144	23,0	sem sugestão	
		285	286	22,0	Coclorina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003; Silva, et al., 2002
		129	130	10,0	sem sugestão	
		191	192	9,0	sem sugestão	
<i>P. parviflorum</i>	Galhos	313	314	94,5	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		207	208	49,0	<i>O</i> -metilcoripalina; coripalina metiodida	
		343	344	45,5	sem sugestão	
		281	282	10,0	Nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007
<i>R. recurva</i>	Galhos	329	330	81,5	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005, Dias <i>et al.</i> , 2003
		343	344	46,0	sem sugestão	
		281	282	45,0	Nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007
		313	314	43,0	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		329	300	13,0	N-metilcoclorina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005

Tabela 9- Íons indicativos de alcaloides das amostras em EM

Ocotea leucoxylon (folhas e galhos)

Diversos são os estudos relatados envolvendo o isolamento de alcaloides do gênero *Ocotea*. Entre os alcaloides estudados para esse gênero, a classe dos aporfínicos aparece com bastante frequência sendo encontrados em um número considerável de espécies (ZANIN & LORDELLO, 2007).

Os espectros correspondentes ao perfil alcaloídico tanto das folhas quanto dos galhos de *Ocotea leucoxylon*, apresentam poucos íons em destaque. No espectro das folhas, os íons de massas m/z 356 seguido do m/z 342 são predominantes, já no espectro dos galhos tem como destaque somente o íon de massa m/z 356, como mostra as figuras 31 e 32.

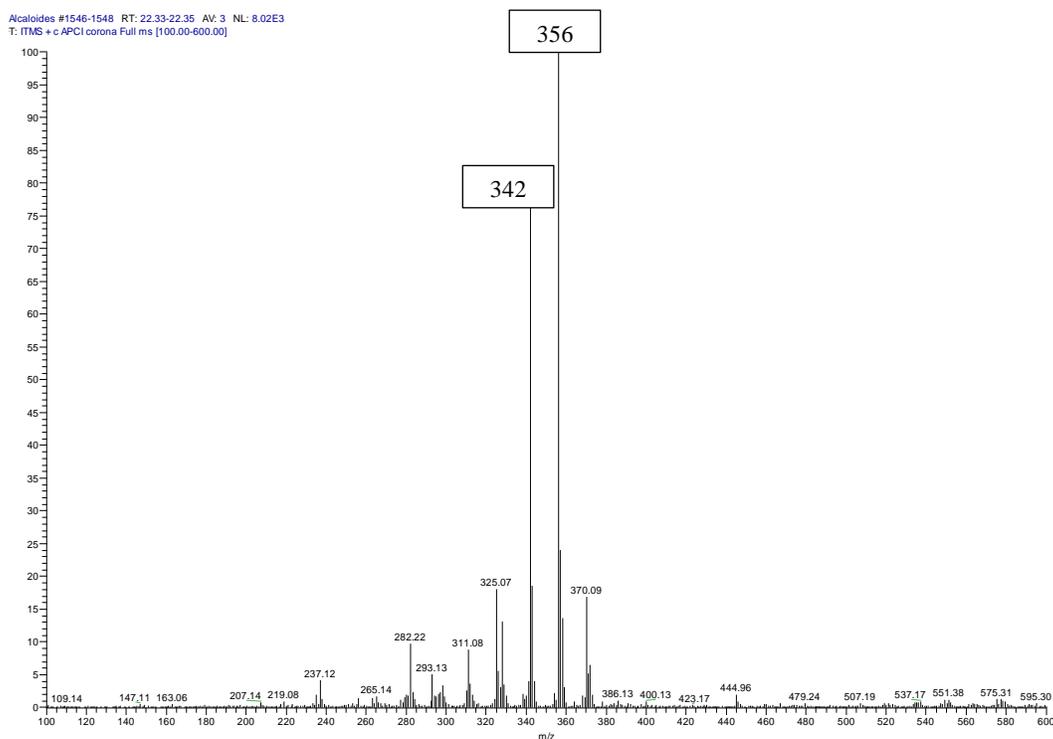


Figura 31- Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de *Ocotea leucoxylon*

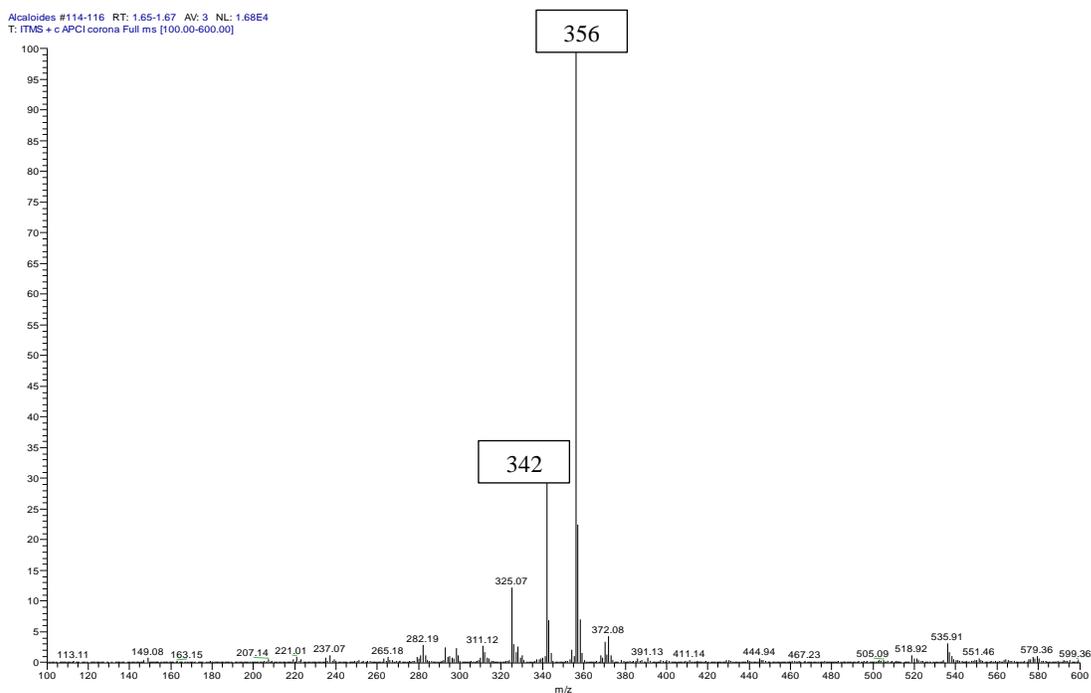


Figura 32-Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *Ocotea leucoxylon*

Pode-se sugerir que o íon de massa m/z 356, majoritário tanto nas frações das folhas quanto dos galhos, possa se tratar dos alcaloides 6-N-óxido dicentrina, ocokriptina ou leucoxina (GARCEZ *et al.* 2011; ZANIN *et al.*, 2011; CAVA *et al.*, 1968), isolados das folhas e cascas de *Ocotea acutifólia*, *Ocotea perula* e *Ocotea macropoda* (Lauraceae) por possuírem as massas moleculares ($C_{20}H_{22}NO_5$) correspondente ao íon em discussão. No trabalho de Wu & Huang (2006) foram isolados, entre outros, os alcaloides O-metilarmepavina metiodida [$C_{21}H_{28}NO_3$]⁺ e magnoflorina iodida [$C_{20}H_{24}NO_4$]⁺. Devido à similaridade da massa molecular desses alcaloides com a massa do íon m/z 342, supõe-se tratar dos mesmos alcaloides.

Além dos íons m/z 356 e 342 também foram observados no espectro relacionado à fração alcaloídica originada das folhas de *Ocotea leucoxylon*, os picos de m/z 370, 382, 444 e 400, menos intensos. -Algumas sugestões de alcaloides podem ser atribuídas para esses

íons. O íon m/z 370 corresponde à massa dos alcaloides aporfínicos N-formil-3-metóxi-nordomesticina ($C_{20}H_{20}NO_6$) isolado dos talos de *Ocotea macrophylla* (PABON & CUCA, 2010), N-metilglaucina e ocoteína ($C_{21}H_{23}NO_5$), isolados do gênero *Ocotea* (GUINAUDEAU, 1983; ZHOU *et al.* 2000) e do alcaloide benzilquinolínico N-óxido papaveraldina ($C_{20}H_{19}NO_6$) isolado dos gêneros *Thalictrum* (Ranucularceae) e *Phellodendron* (Rutaceae) (WU & HUANG, 2006). Do gênero *Thalictrum* (Ranucularceae) também foi isolado o alcalóide aporfínico talflavidina chlorida [$C_{22}H_{24}NO_5$]⁺ cuja massa corresponde ao íon m/z 382 encontrado (WU & HUANG, 2006). Para os íons m/z 400 e 444 não foram encontrados registros de alcaloides que correspondam a essas massas.

Verificou-se que o espectro do perfil alcaloídico gerado a partir dos galhos da espécie em questão foi similar ao das folhas. A diferença é que no espectro dos galhos não foram observados os íons m/z 370 e 400. Mas, é possível notar dois íons que não foram detectados no espectro das folhas que são os m/z 372 e 518. O primeiro corresponde à massa do alcaloide aporfínico norocoxilonina ($C_{20}H_{22}NO_5$) (GARCEZ *et al.* 2011) e para o segundo não foi encontrada sugestão de alcaloides que correspondam a tal massa. Na tabela 10 estão registrados todos os íons observados.

Espécie	Órgão vegetal	Massa	M+1	(%)	Alcaloide sugerido	Referência
<i>O. leucoxylo</i>	Folhas	355	356	100,0	6-N-óxido dicentrina	Garcez <i>et al.</i> , 2011
		341	342	81,0	O- metilarmepavina metiodida; magnoflorina iodida	Wu & Huang, 2006
		369	370	17,0	N-formil-3-metóxi-nordomesticina; papaveraldina-N-óxido; ocoteína, N- metilglaucina	Pabon & Cuca 2010); Wu & Huang, 2006; Zhou <i>et al.</i> , 2000; Guinaudeau, 1983;
	Galhos	355	356	100,0	6- N-oxido dicentrina	Garcez <i>et al.</i> , 2011
		341	342	29,0	O- metilarmepavina metiodida;	Wu & Huang, 2006
		371	372	5,0	norocoxilonina	Garcez <i>et al.</i> , 2011

Tabela 10- Íons indicativos de alcalóides oriundo das flolhas e galhos de *O. leucoxylo*

Endlicheria sericea (folhas e galhos)

Folhas e galhos da espécie *E. sericea* foram analisadas mediante aos espectros de massa provenientes de frações alcaloídicas. Nos espectros originados das folhas se observou a presença do íon majoritário m/z 330. Tal pico pode corresponder ao alcaloide benzilquinolínico reticulina (SCHMIDT *et al.* 2005; DIAS *et al.* 2003). Na figura 33 observa-se o espectro das folhas onde pode ser observado o m/z 330 em destaque.

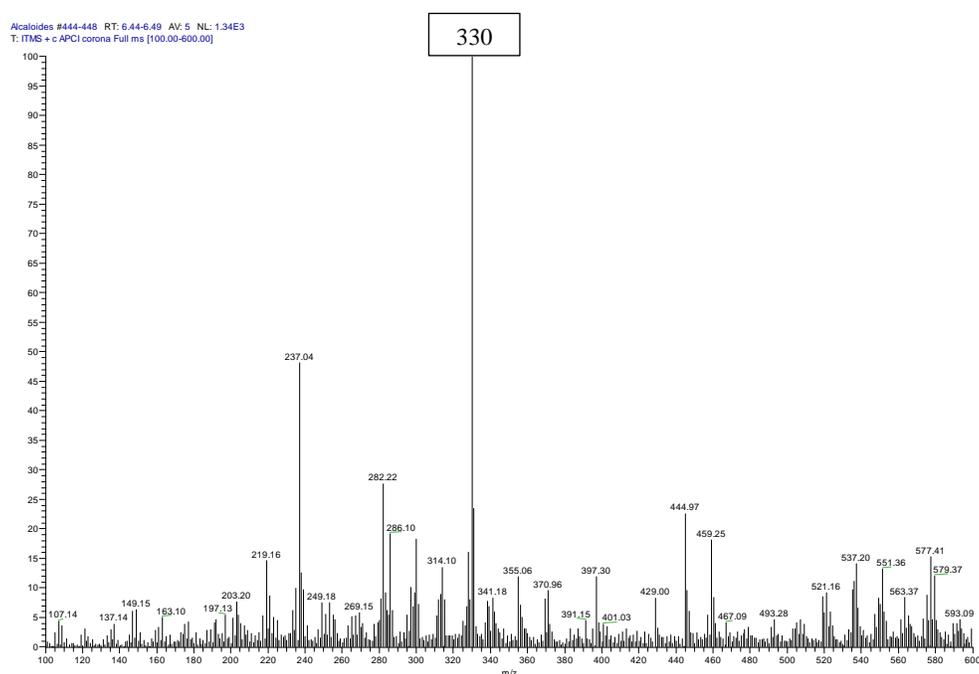


Figura 33- Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de *E. sericea*

Outros íons menos intensos presentes no espectro das folhas de *Endlicheria sericea* que podem ser indicativos de alcaloides são os de m/z 282, 444, 286, 314 e 370. Destes, o primeiro pode corresponder ao alcaloide norruciferina (TORRES *et al.* 2007), um alcaloide aporfínico de massa $C_{18}H_{19}NO_2$ isolado das cascas e madeira da espécie *Rollinia pittieri*, da família Annonaceae.

Com relação ao íon m/z 286, sugere-se que este corresponda ao alcaloide benzilquinolínico coclaurina, de mesma massa molecular do íon em questão, relatado em estudos anteriores de diversos gêneros pertencentes à família Lauraceae (SCHMIDT *et al.* 2005; DIAS *et al.* 2003; SILVA, *et al.* 2002; MORAIS *et al.* 1998). Como sugestão de alcaloide para o íon m/z 314, pode-se indicar que possa se tratar do alcaloide norboldina de fórmula molecular $C_{19}H_{21}NO_4$. Este alcaloide, que corresponde à mesma massa do íon m/z 314, foi isolado da espécie *Radix linderae*, pertencente à família Lauraceae (WU *et al.* 2010).

Não há sugestão de alcaloide para o íon 444, assim como já foi relatado que o íon m/z 370 corresponde à massa dos alcaloides aporfínicos N-formil-3-metóxi-nordomesticina ($C_{20}H_{20}NO_6$) isolado dos talos de *Ocotea macrophylla* (PABON & CUCA, 2010), N-metilglaucina e ocoteína ($C_{21}H_{23}NO_5$), isolados do gênero *Ocotea* (GUINAUDEAU, 1983; ZHOU *et al.* 2000) e do alcaloide benzilquinolínico papaveraldina-N-óxido ($C_{20}H_{19}NO_6$) isolado dos gêneros *Thalictrum* (Ranuncularceae) e *Phellodendron* (Rutaceae) (WU & HUANG, 2006).

Quanto ao espectro das frações alcaloídicas dos galhos, notou-se que a massa do íon majoritário não é indicativa de alcaloide. Os íons de m/z 282 e 370, observados no perfil das folhas, estão presentes também no perfil dos galhos. No entanto, o primeiro se trata do íon mais abundante indicativo de massa de alcaloide, mas nesse espectro observou-se que existem outros íons mais intensos que não são indicativos desse tipo de metabólito como mostra a figura 34.

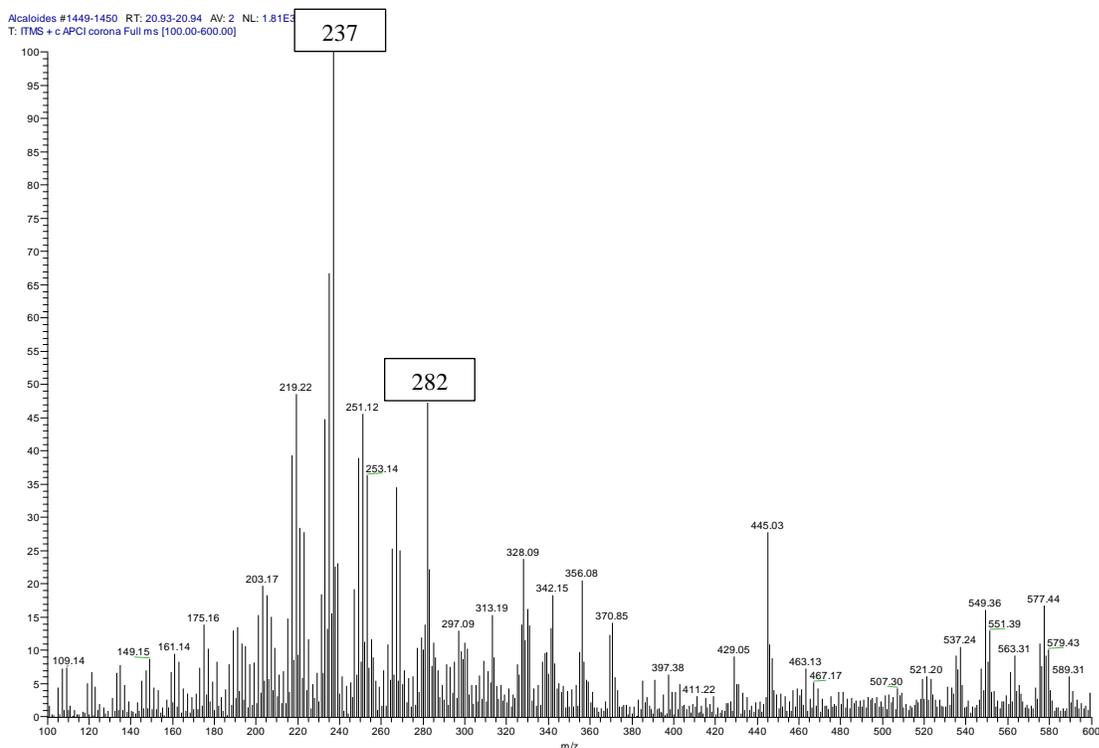


Figura 34- Espectro de massas da fração alcalóidica dos galhos de *E. sericea*

No mesmo espectro, observaram-se ainda os íons m/z 328, 356 e 342. Destes, o primeiro pode estar relacionado com o alcaloide boldina ($C_{19}H_{21}NO_4$) isolado da espécie *Radix linderae* pertencente à família Lauraceae (WU *et al.* 2010) e aos alcalóides *O*-metilarmepavina ($C_{20}H_{25}NO_3$) e isoboldina ($C_{20}H_{25}NO_3$) isolados das raízes de *Thalictrum* sp. (Ranunculaceae) e das cascas de *Phellodendron wilsonii* (Rutaceae) (WU & HUANG, 2006).

Esses alcaloides possuem a mesma correlação m/z do íon em discussão. Para os outros íons também foram encontradas sugestões de alcaloides correspondentes, como comentado anteriormente. Na tabela 11 estão apresentados todos os íons que podem estar relacionados com alcaloides, bem como sugestões de nomes para estes, comparados com a literatura consultada.

Espécie	Órgão vegetal	Massa	M+1 observado	Intensidade (%)	Alcaloide sugerido	Referência
<i>E. sericea</i>	Folhas	329	330	100	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		281	282	28,0	Nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007
		443	444	22,5	sem sugestão	
		285	286	19,0	Coclaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003; Silva, <i>et al.</i> , 2002
		313	314	13,5	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		369	370	10,0	N-formil-3-metóxi nordomesticina; papaveraldina- <i>N</i> -óxido; ocoteina; N-metilglaucina	Pabon & Cuca (2010); Wu & Huang, 2006; Zhou <i>et al.</i> , 2000; Guinaudeau, 1983;
	Galhos	281	282	47,0	Nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007
		327	328	24,0	boldina; <i>O</i> -metilarmepavina; isoboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010; Wu & Huang, 2006
		355	356	21,0	6- <i>N</i> -óxido dicentrina	Garcez <i>et al.</i> , 2011
		341	342	18,0	<i>O</i> -metilarmepavina metiodida; magnoflorina iodida.	Wu & Huang, 2006
		369	370	14,0	N-formil-3-metóxi nordomesticina; paveraldina- <i>N</i> -óxido; ocoteina; N-metilglaucina	Pabon & Cuca (2010); Wu & Huang, 2006; Zhou <i>et al.</i> , 2000; Guinaudeau, 1983;

Tabela 11- Íons indicativos de alcalóides oriundos das folhas e galhos da espécie *E. sericea*

Licaria canella angustata (folhas e galhos)

Apenas três picos indicativos de alcalóides, já discutidos anteriormente, foram observados no espectro proveniente das frações alcaloídicas a partir das folhas de *Licaria*

canella angustata. O m/z 314 aparece como o íon mais intenso e sugere-se que corresponda ao alcaloide norboldina, isolado da espécie *Radix linderæ* (WU *et al.* 2010). O m/z 330 está relacionado ao alcalóide reticulina (SCHMIDT *et al.* 2005; DIAS *et al.* 2003) e o m/z 282 é indicativo do alcalóide nornuciferina (TORRES *et al.* 2007) (figura 35).

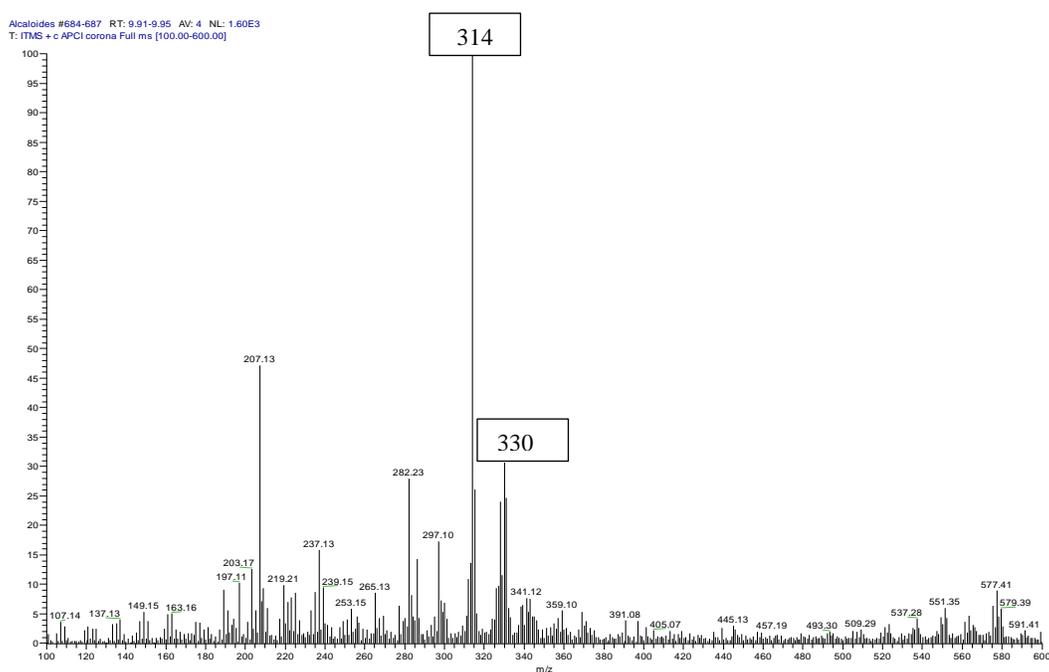


Figura 35- Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de *L. canella angustata*

Quanto aos íons detectados no espectro gerado da fração alcaloídica dos galhos de *L. canella angustata*, notou-se como íon mais intenso o m/z 300 seguido do íon 330. Na figura 36 é possível observar esses íons em destaque em relação aos demais, bem menos intensos.

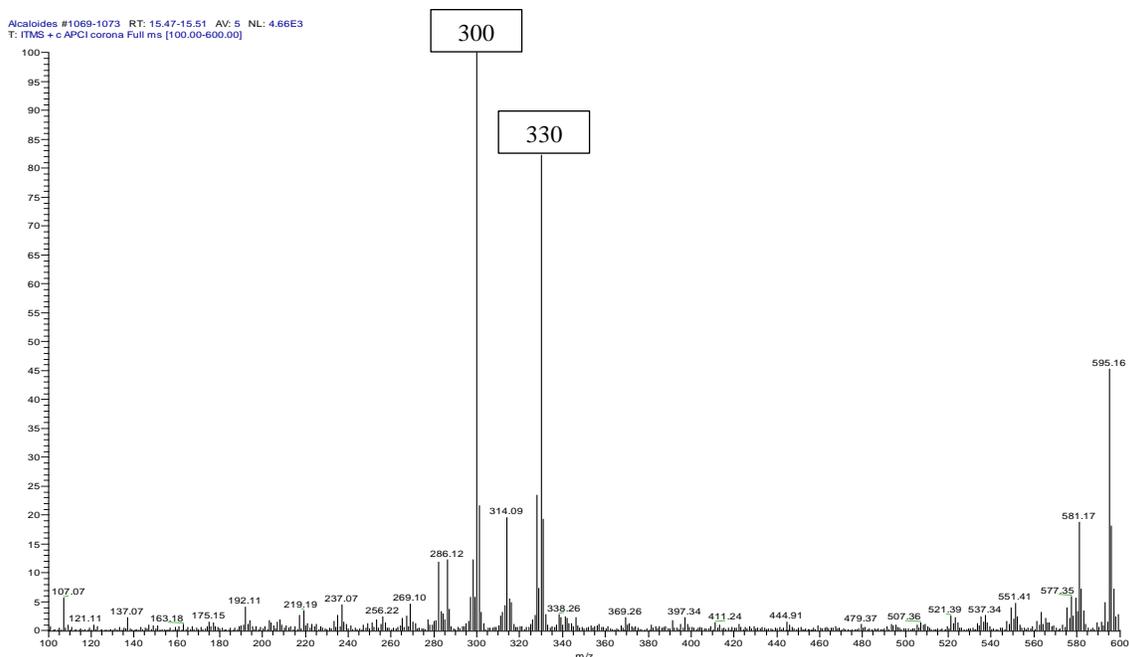


Figura 36- Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *L. canella angustata*

Ambos os íons (m/z 330 e 300), assim como os íons menos intensos (314 e 286), tiveram suas massas comparadas a alcaloides discutidos anteriormente. Quanto ao íon m/z 192, sugere-se que este corresponda ao alcaloide noroxiidrastinina, um alcaloide do tipo isoquinolona derivado das raízes de *Thalictrum* sp. (Ranunculaceae) e das cascas de *Phellodendron wilsonii* (Rutaceae) (WU & HUANG, 2006), cuja fórmula molecular ($C_{10}H_9NO_3$) corresponde ao íon citado.

Para os outros íons indicativos de alcaloides (m/z 338, 256 e 444), não foram encontrados dados na literatura utilizada de alcaloides que correspondam a tais massas. A relação dos íons encontrados, assim como a intensidade destes e as sugestões de alcaloides observados nos espectros das folhas e galhos gerados a partir de frações alcaloídicas da espécie em questão, é mostrada na tabela 12.

Espécie	Órgão vegetal	Massa	M+1	Intensidade (%)	Alcaloide sugerido	Referência
<i>L. canella angustata</i>	Folhas	313	314	100,0	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		329	330	30,5	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		281	282	28,0	nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007
	Galhos	299	300	100,0	N-metilcoclorina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		329	330	82,0	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		313	314	20,0	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		285	286	12,0	Coclorina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		191	192	4,5	Noroxiidrastinina	Wu & Huang, 2006
		337	338	3,0	sem sugestão	
		255	256	2,0	sem sugestão	
		443	444	1,5	sem sugestão	

Tabela 12- Íons indicativos de alcaloides dos galhos da espécie *L. canella angustata*

***Licaria martiniana* (folhas e galhos)**

Os espectros de massas originados das frações alcaloídicas tanto das folhas quanto dos galhos da espécie *L. martiniana* foram analisados. No espectro da fração alcaloídica das folhas observou-se a presença do íon majoritário m/z 300 seguido do íon 330. Sugere-se que esses íons correspondam aos alcaloides N-metilcoclorina e reticulina respectivamente (SCHMIDT *et al.* 2005; DIAS *et al.* 2003). Um terceiro íon observado foi m/z 194. Na literatura foi encontrado o isolamento de um alcaloide que corresponde a essa mesma massa. Trata-se do alcaloide isoquinolínico coripalina, isolado da espécie *Thalictrum sp.* (Ranunculaceae) e das cascas de *Phellodendron wilsonii*, pertencente à família Rutaceae (Wu & Huang, 2006). Na figura 37 observa-se o espectro das folhas desses íons em destaque.

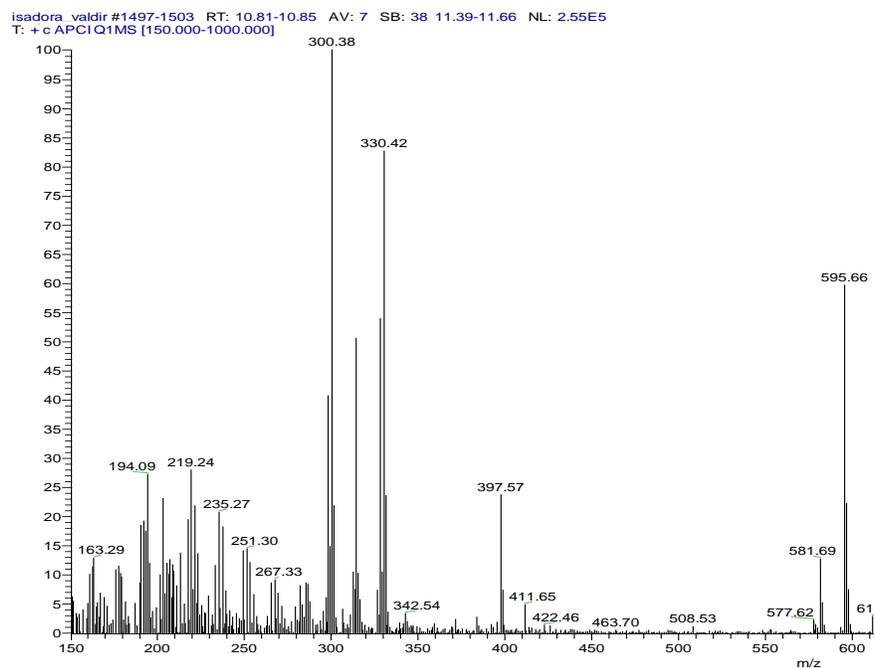


Figura 37- Espectro de massas da fração alcalóidica das folhas de *L. martiniana*

Perfil semelhante foi observado para o espectro originado da fração alcalóidica dos galhos dessa espécie. A diferença principal está relacionada com a intensidade dos dois últimos íons (330 e 194). O espectro correspondente aos galhos dessa espécie pode ser observado na figura 44.

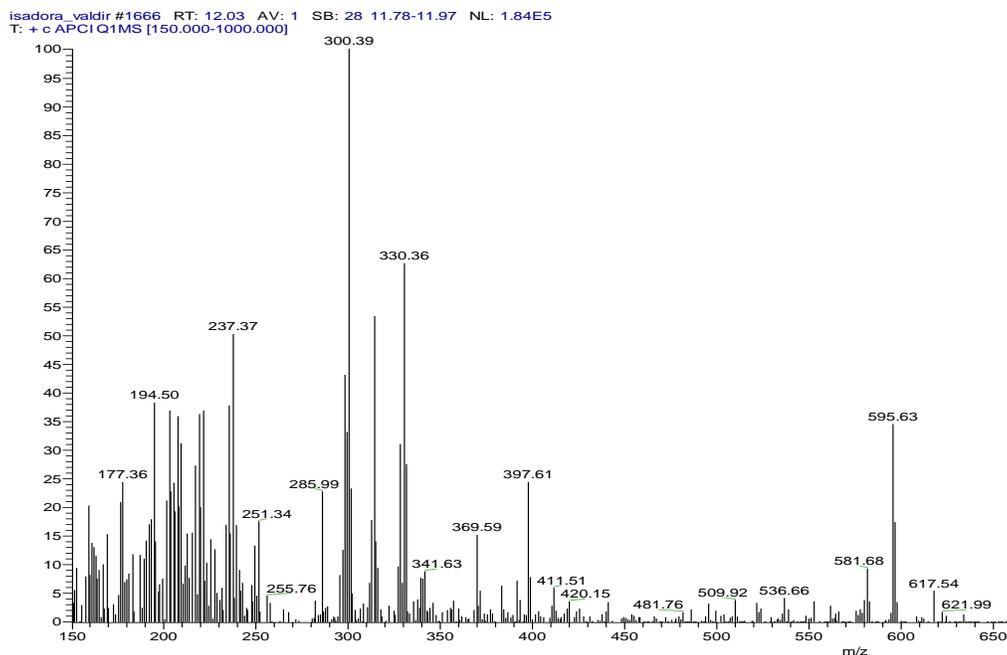


Figura 38- Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *L. martiniana*

Na tabela 13 estão descritas as informações obtidas dos espectros tanto das folhas quanto dos galhos da espécie em discussão.

Espécie	Órgão vegetal	Massa	M+1	Intensidade (%)	Alcalóide sugerido	Referência
<i>Licaria martiniana</i>	Folhas	299	300	100	N-metilcoclaurina;	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		329	330	85	reticulina;	Schmidt <i>et al.</i> , 2005, Dias <i>et al.</i> , 2003
		193	194	27	coripalina	Wu & Huang, 2006
	Galhos	299	300	100	N-metilcoclaurina;	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		329	330	65	reticulina;	Schmidt <i>et al.</i> , 2005, Dias <i>et al.</i> , 2003
		193	194	45	coripalina	Wu & Huang, 2006

Tabela 13- Íons indicativos de alcaloides dos galhos da espécie *L. canella angustata*

Rhodostemonodapne recurva (galhos)

A análise do espectro proveniente da fração alcaloídica dos galhos de *Rhodostemonodapne recurva*, revelou se tratar de uma fração com alto grau de complexidade. Muitos íons foram observados e destes somente seis são indicativos de alcaloides. O íon mais intenso observado indicativo de alcaloide foi o m/z 330, ressaltando que não foi esse o íon o mais destacado.

Em contrapartida, observou-se que outros íons, cuja massa não corresponde à de alcaloide, foram observados com uma intensidade bem mais relevante em relação aos que possuem massa sugestiva para alcaloides (m/z 423 e 409), como pode ser observado na figura 39.

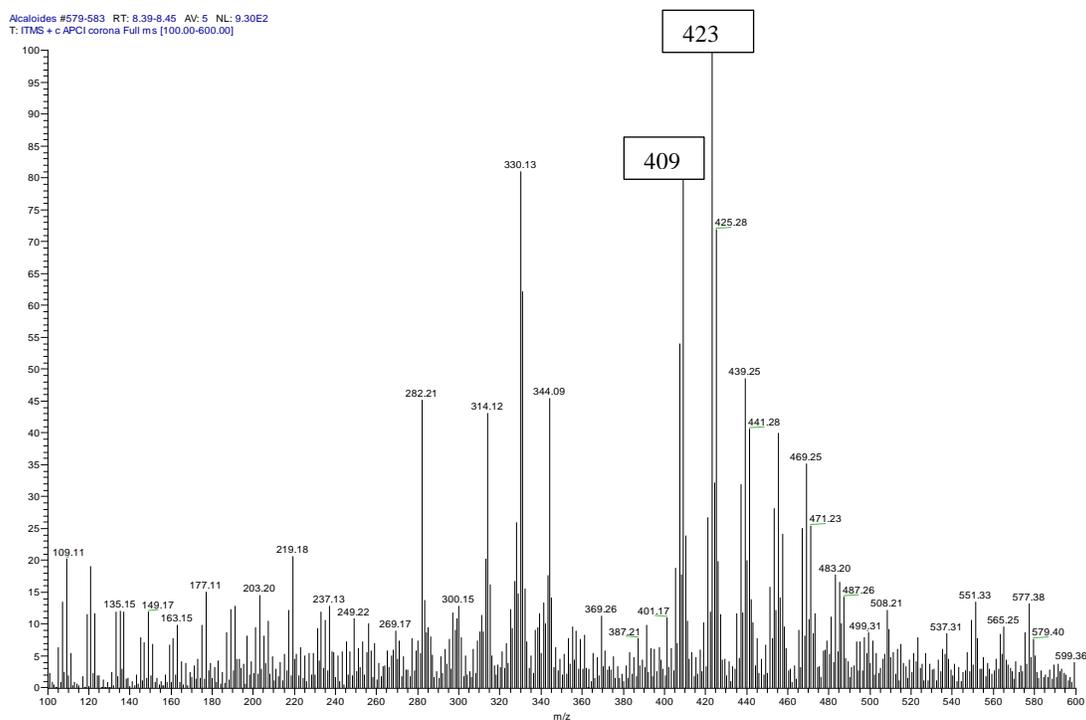


Figura 39- Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *R. recurva*

O íon m/z 330, assim como os de m/z 282, 314 e 300 foi observado nos espectros analisados anteriormente, principalmente na fração dos galhos de *L. canella angustata*, com exceção do m/z 508 para o qual não se tem sugestão de alcaloide, uma vez que não foi encontrado registro nas referências utilizadas que corresponda a tal massa.

Todos esses dados e outras informações pertinentes a respeito da fração alcaloídica oriunda dos galhos da espécie *R. recurva* (como sugestão de alcaloides e as referências consultadas) estão reunidos na tabela 14.

Espécie	Órgão vegetal	Massa	M+1 observado	Intensidade (%)	Alcaloide sugerido	Referência
<i>R. recurva</i>	Galhos	329	330	81,5	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005, Dias <i>et al.</i> , 2003
		343	344	46,0	sem sugestão	
		281	282	45,0	Nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007
		313	314	43,0	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		329	300	13,0	N-metilcoclaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		507	508	12,0	sem sugestão	

Tabela 14- Íons indicativos de alcaloides dos galhos da espécie *R. recurva*

***Pleurotyrium parviflorum* (galhos)**

Nesse espectro é observado como majoritário um íon que não é indicativo de alcaloide (m/z 331). A análise da fração alcaloídica dos galhos de *Pleurotyrium parviflorum*, indicou que os íons m/z 314, 208, 344 e 282 possuem massas indicativas de alcaloides. Na figura 40 estão relacionados esses íons, bem como todos os outros indicativos de outras classes de metabólitos. Dos íons citados anteriormente, já foram registrados em outros espectros de frações relacionadas a esse estudo os íons m/z 314, o

mais intenso, e o 282 que são indicativos dos alcaloides norboldina (WU *et al.* 2010) e nornuciferina (TORRES *et al.* 2007), respectivamente.

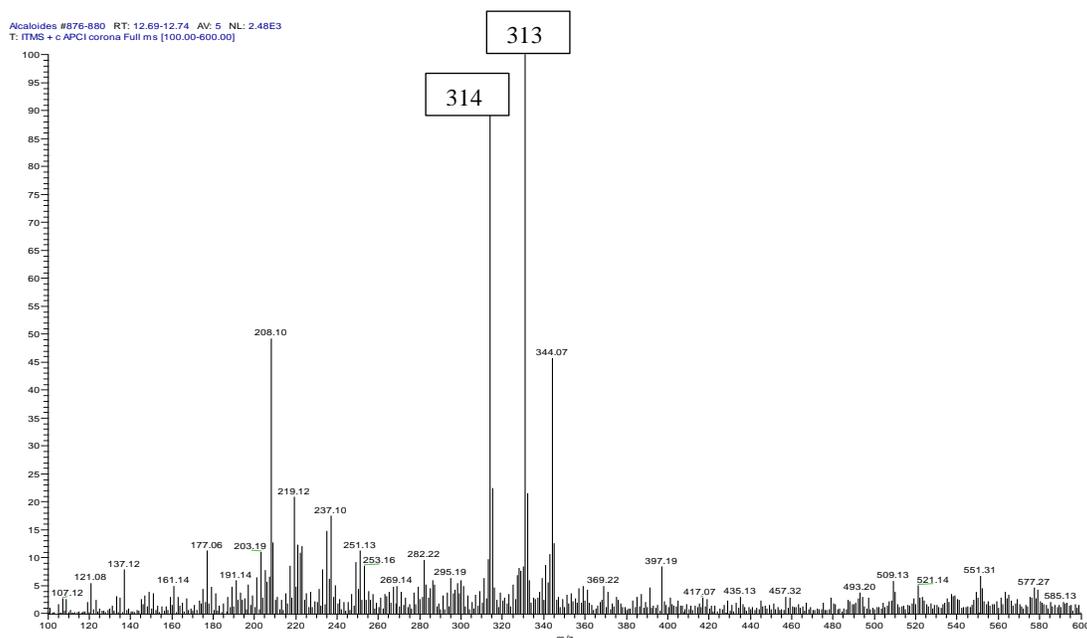


Figura 40- Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *P. parviflorum*

Para o íon 344, não foi encontrada sugestão alguma de alcalóide na literatura consultada. No caso do íon de massa m/z 208, sugere-se que possa se tratar dos alcaloides *O*-metilcoripalina ou coripalina metiodida (WU & HUANG, 2006). Considerando a complexidade do espectro, é possível entender que o trabalho de isolamento de algum alcaloide dessa fração seja algo difícil em comparação com outras frações analisadas por meio da espectrometria de massa. Com exceção do íon 208, que não aparece como o mais intenso no espectro, os outros dois foram observados em outras frações (tabela 15).

Espécie	Órgão vegetal	Massa	M+1	(%)	Alcaloide sugerido	Referência
<i>P. parviflorum</i>	Galhos	313	314	94,5	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		207	208	49,0	<i>O</i> -metilcoripalina; coripalina metiodida	
		343	344	45,5	Sem sugestão	
		281	282	10,0	Nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007

Tabela 15- Íons indicativos de alcaloides dos galhos de *P. parviflorum*

***Aniba guianensis* (galhos)**

Na triagem fitoquímica para a escolha das espécies de interesse para esse estudo, utilizando espectrometria de massa, foram detectados sete íons com massa sugestiva de alcalóide proveniente da fração alcaloídica oriunda dos galhos de *Aniba guianensis*. Destes, o mais intenso é o m/z 330 correspondente ao alcalóide reticulina (SCHMIDT *et al.* 2005; DIAS *et al.* 2003), seguido do m/z 300, indicativo do alcalóide N-metilcoclaurina (SCHMIDT *et al.* 2005).

Outros íons menos intensos observados foram o m/z 282, sugestivo do alcaloide nornuciferina (TORRES *et al.* 2007), m/z 314, correspondente a norboldina (WU *et al.* 2010), m/z 342 referente aos alcalóides O- metilarmepavina metiodida ou magnoflorina iodida (Wu & Huang, 2006), e o m/z 444, para o qual não foi encontrado sugestão de alcaloide. Como sugestão para o íon m/z 194 pode-se apontar o alcaloide coripalina, pertencente à classe dos isoquinolínicos, de fórmula molecular $C_{11}H_{15}NO_2$ correspondente à massa do íon em questão (Wu & Huang, 2006). Com exceção do m/z 194, todos os picos sugestivos de alcaloides presentes na fração alcaloídica em questão, já foram relatados nesse estudo em discussões anteriores.

Analisando tal espectro, percebe-se que os íons mais abundantes são indicativos de alcaloides, apesar da maioria dos íons menos intensos não serem. Percebe-se ainda, que ao se comparar os dados da tabela a seguir com os íons encontrados nos espectros anteriores, estes apresentam um perfil bem similar com outras frações como, por exemplo, de *Licaria canella angustata*, *Endlicheria sericea* e *Licaria martiniana* (figura 41).

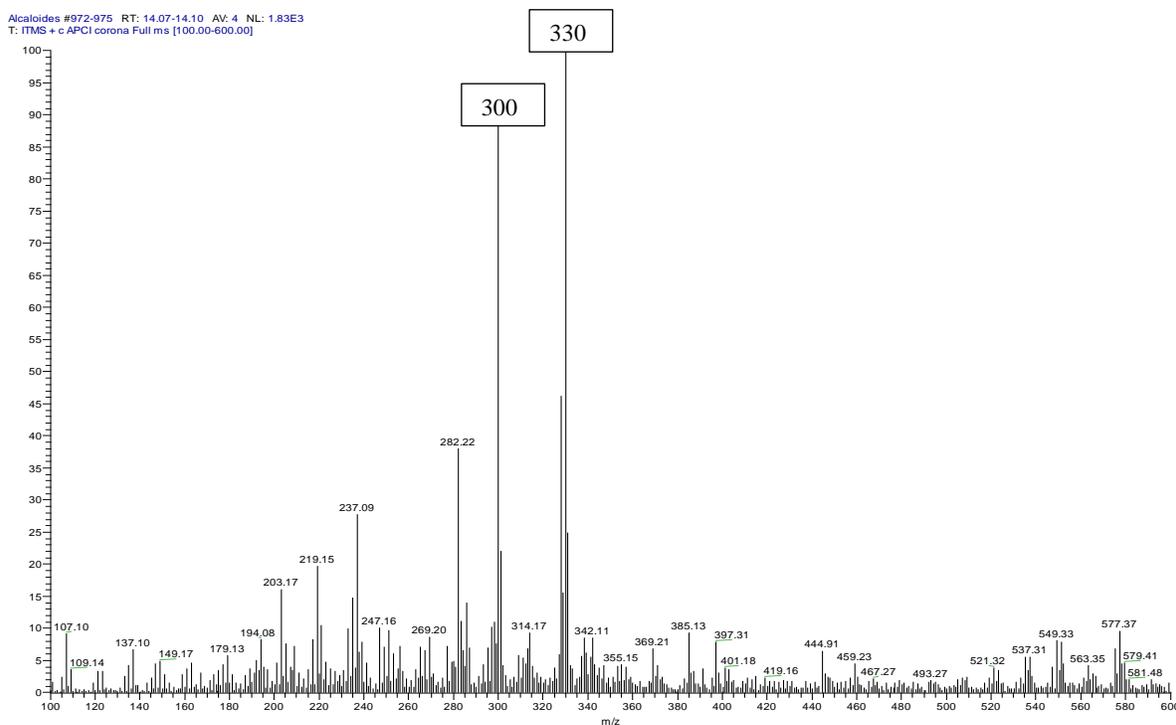


Figura 41- Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *Aniba guianensis*

Na tabela 16 são mostradas as informações sobre os íons indicativos de alcaloides observados no espectro referente a fração alcaloídica dos galhos da espécie *A. guianensis*.

Espécie	Órgão vegetal	Massa	M+1	(%)	Alcaloide sugerido	Referência
<i>A. guianensis</i>	Galhos	329	330	100,0	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		299	300	88,0	N-metilcoclorina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		281	282	38,0	Nornuciferina	Torres <i>et al.</i> , 2007
		313	314	9,0	Norboldina	Wu <i>et al.</i> , 2010
		341	342	8,5	O- metilarmepavina metiodida magnoflorina iodida	Wu & Huang, 2006
		193	194	8,0	coripalina	Wu & Huang, 2006
		443	444	7,0	sem sugestão	

Tabela 16- Íons indicativos de alcaloides dos galhos da espécie de *A. guianensis*

***Aniba ferrea* (galhos)**

No espectro da fração alcaloídica proveniente dos galhos de *A. ferrea*, observou-se como íon predominante o de m/z 300 que corresponde ao alcaloide N-metilcoclaurina (SCHMIDT *et al.*, 2005). Este íon foi observado em outras frações analisadas anteriormente, como na fração alcaloídica dos galhos de *L.canella angustata*, *R. recurva* e *A. guianensis*. No entanto, ao contrário das frações colocadas em comparação, a fração alcaloídica de *A. ferrea* gerou um espectro mais limpo, com menos íons e onde se observou maior intensidade para o íon m/z 300.

Os íons de m/z 330 e 346, já discutidos em frações analisadas anteriormente, também foram observados nesse espectro. Na literatura consultada não foi encontrado relatos de estudos envolvendo isolamento de alcaloides de *Aniba ferrea*.

Considerando todos os aspectos discutidos, bem como o grau de complexidade da fração, onde há um íon de maior intensidade e dois íons de menor intensidade indicativos de alcaloides, torna a investigação dessa espécie promissora. Os íons presentes no espectro de massa proveniente da fração alcaloídica de *A. ferrea*, pode ser visto na figura 42.

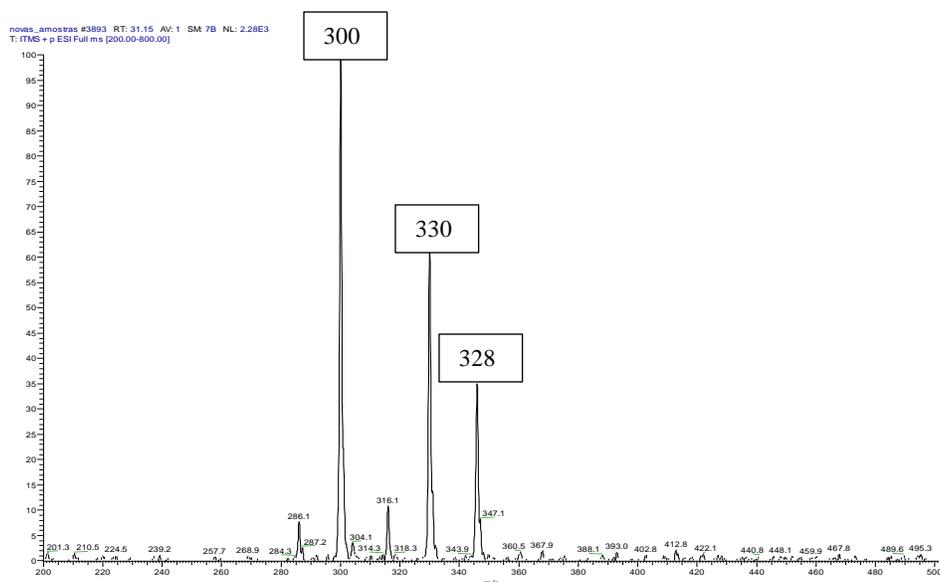


Figura 42- Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *Aniba ferrea*

São mostrados na tabela 17, os dados extraídos do espectro de massa apresentados na figura 42. É possível observar ainda, as sugestões de alcaloides que correspondem às massas dos íons presentes na fração alcaloídica dos galhos de tal espécie.

Espécie	Órgão vegetal	Massa	M+1	Intensidade (%)	Alcaloide sugerido	Referência
<i>A. ferrea</i>	Galhos	299	300	100,0	N-metilcoclorina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		329	330	60,0	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		345	346	35,0	Sem sugestão	
		285	286	8,0	Coclorina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003; Silva, et al., 2002

Tabela 17- Íons indicativos de alcaloides detectados da fração alcaloídica oriunda dos galhos de *A. ferrea*

Aniba panurensis (fohas e galhos)

Foi observado no espectro oriundo da fração alcaloídica das folhas de *Aniba panurensis* um íon majoritário bastante intenso. Trata-se do íon de m/z 289. Na literatura, não foi encontrado relatos de alcaloides com tal massa, o mesmo ocorrendo para os outros

íons menos intensos também de massa ímpar m/z 297 e 273. Foram observados ainda, dois íons minoritários de massa ímpar: os de m/z 315 e 273.

O único íon de massa indicativa de alcaloide no espectro foi o de m/z 330. Poderia ser atribuído a esse último íon (m/z 330), a forte mancha observada na CCD realizada a partir da fração alcaloídica das folhas dessa espécie revelada com reagente dragendorff. O fato é que no espectro originado da fração alcaloídica dos galhos, mostrado na figura 43, não foi observado o íon m/z 330 e na placa cromatográfica da fração alcaloídica dos galhos dessa mesma espécie verificou-se indícios ainda mais fortes de alcaloide frente ao mesmo revelador, como pode ser constatado na figura a seguir:

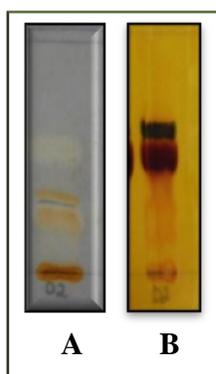


Figura 43- A: CCD da fração alcaloídica das folhas de *A. panurensis*;
B: CCD da fração alcaloídica dos galhos de *A. panurensis*.

Dessa forma, comparando o espectro de massas de *A. panurensis* com os espectros das outras espécies analisadas, observou-se um perfil diferente, visto que as massas desses íons são ímpares, o que nos leva a acreditar que possa se tratar de uma classe diferente de alcaloides com número par de átomos de nitrogênio na molécula o que justifica uma massa ímpar dos íons gerados no espectro de massas no modo positivo. A fração alcaloídica das folhas de *A. panurensis* gerou um espectro limpo, com poucos íons como pode ser observado na figura 44.

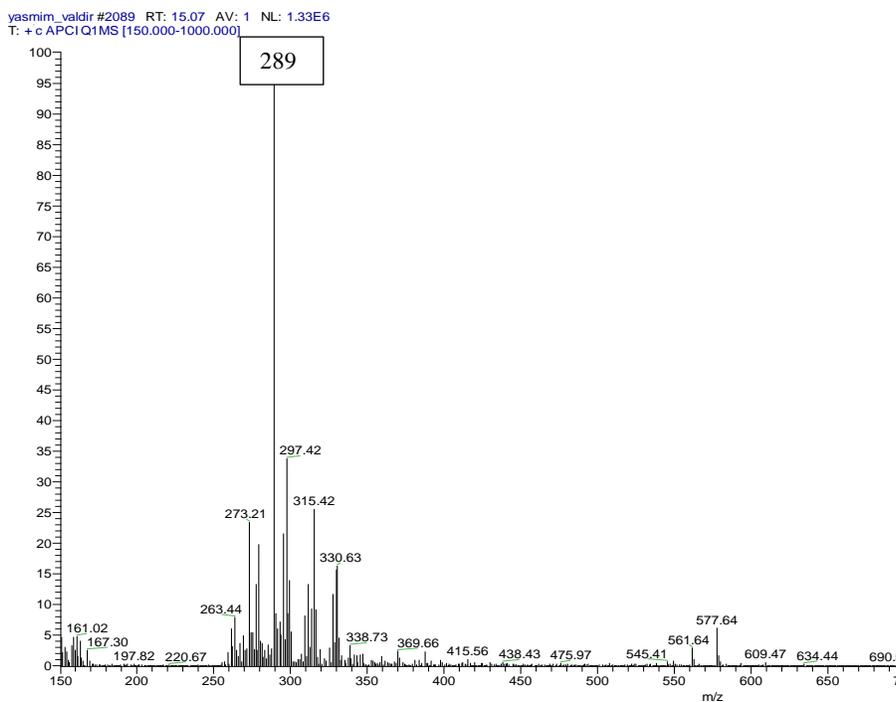


Figura 44- Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de *A. panurensis*

Perfil bem semelhante foi observado para o espectro de massas gerado a partir da fração alcaloídica dos galhos. O íon majoritário, assim como nas folhas, também é o m/z 289, assim como o segundo íon o m/z 273 que neste caso é mais intenso que o observado no perfil das folhas. Trata-se de um espectro com apenas três íons e dessa forma, menos complexo que a fração das folhas (figura 45).

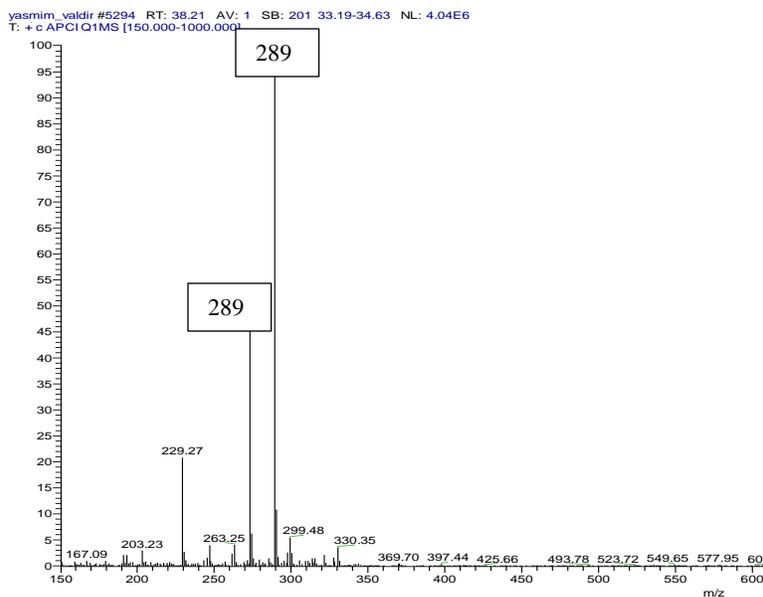


Figura 45- Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *A. panurensis*

A massa dos íons observados nos espectros de massas gerados a partir das frações alcaloídicas oriundas das folhas e dos galhos de *A. panurensis*, podem ser observadas na tabela 18, onde também é possível observar a intensidade dos íons e a sugestão de alcaloide para o íon de m/z 330.

Espécie	Órgão vegetal	Massa	M+1	Intensidade (%)	Alcaloide sugerido	Referência
<i>A. panurensis</i>	Folhas	288	289	100%	Sem sugestão	
		296	297	34%	Sem sugestão	
		314	315	25%	Sem sugestão	
		272	273	23%	Sem sugestão	
		329	330	15%	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
	Galhos	288	289	100,0	Sem sugestão	
		272	273	5,0	Sem sugestão	
		228	229	25,0	Sem sugestão	

Tabela 18- Íons observados no MS da fração alcaloídica dos galhos de *A. panurensis*

Aniba parviflora (galhos)

É possível observar no espectro de massas da fração alcaloídica proveniente dos galhos de *A. parviflora* cinco íons com massas indicativas de alcaloides: m/z 300, 330, 286, 192 e 130, sendo o íon majoritário o de m/z 330 que juntamente com o 300 e 286 já foram observados nos espectros anteriores de outras frações de outras espécies investigadas nesse estudo. Os dois últimos íons (m/z 130 e 192) não foram observados em outros espectros. Na literatura consultada não foi encontrado estudos de isolamento de alcaloides com massa correspondente a desses íons. Na figura 46 é apresentado o espectro originado a partir da fração alcaloídica dos galhos de *A. parviflora*.

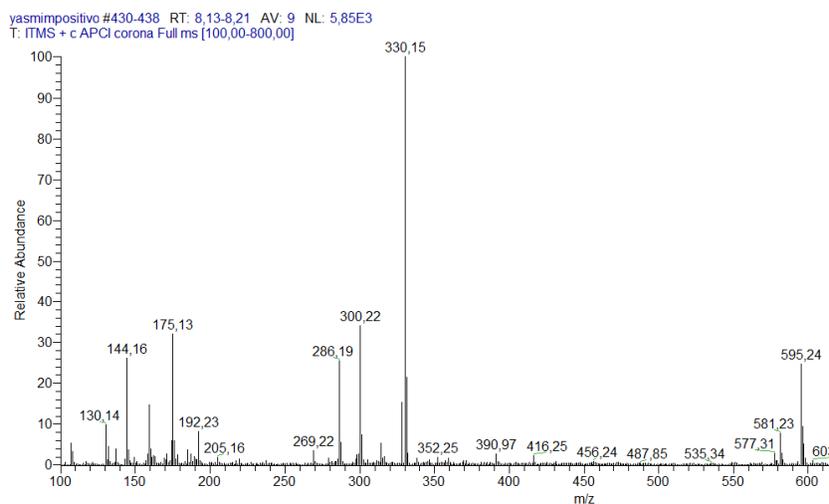


Figura 46- Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *A. parviflora*

Pode-se observar que o espectro acima não apresenta alto grau de complexidade e que possui poucos íons indicativos de alcaloides. No entanto, os íons mais destacados foram observados em espectros anteriores mais propensos de serem isolados como é o caso do espectro proveniente da fração alcaloídica dos galhos de *Aniba ferrea*. É apresentado na

tabela 19 alguns dados do espectro gerado a partir da fração alcaloídica dos galhos de *A. parviflora* e sugestões de alcaloides para os principais íons observados.

Espécie	Órgão vegetal	Massa	M+1	Intensidade (%)	Alcaloide sugerido	Referência
<i>A. parviflora</i>	Galhos	299	300	100,0	N-metilcoclaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		329	330	23,0	Reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		285	286	8,0	Coclaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003; Silva, <i>et al.</i> , 2002

Tabela 19- Íons observados no MS da fração alcaloídica dos galhos de *A. parviflora*

5.1.3. Escolhas das espécies de interesse

Depois de analisar os espectros de massas obtidos a partir das frações alcaloídicas das dezesseis amostras testadas, foi possível eleger aquelas que foram submetidas ao processo de isolamento e identificação de alcaloides. Para tanto, dois aspectos foram considerados para permitir um fracionamento mais rápido e objetivo das amostras menos complexas e de composição química diferenciada.

O primeiro deles está relacionado à complexidade dos espectros. Optou-se em aprofundar a investigação nas espécies que apresentaram espectros com menor quantidade de íons, o que torna mais viável o processo de isolamento em um menor espaço de tempo. Outro aspecto considerado foi a intensidade desses íons. Considerando tais parâmetros, elegeram-se duas espécies (*Ocotea leucoxydon* e *Aniba ferrea*), cujos espectros geraram íons indicativos de alcaloides mais intensos em relação às outras. Além dessas, foi eleita uma terceira espécie, *A. panurensis*, que apresentou espectros de massas da fração

alcaloídica tanto das folhas quanto dos galhos, com íons majoritários de massa ímpar. No entanto, levou-se em consideração o perfil da CCD que apresentou fortes indícios de alcaloides frente ao reagente dragendorff.

Algumas espécies que apresentaram íons indicativos de alcaloides não foram investigadas nesse estudo. Em geral, esses íons se encontram presentes em frações de composição muito complexa e foram destacados para estudos futuros em níveis de doutoramento. Assim, três espécies pertencentes a dois gêneros distintos foram eleitas para se cumprir o objetivo central desse estudo e por isso foram submetidas ao processo de fracionamento e isolamento: *Ocotea leucoxylon*, *Aniba ferrea* e *Aniba panurensis*. Para os ensaios biológicos, além destas, mais quatro espécies foram investigadas: *Licaria canella angustata*, *Licaria martiniana*, *Aniba parviflora* e *Aniba guianensis* por serem espécies que, segundo a literatura (YAMAGUCHI *et al.* 2012; SILVEIRA *et al.* 2011; ALCÂNTARA *et al.* 2010; KLAUSMEYER *et al.* 2004), possuem potencial biológico compatíveis com os que foram avaliados nessa pesquisa.

Na literatura é possível encontrar muitos alcaloides isolados de espécies do gênero *Ocotea* (ZANIN *et al.*, 2011; WARD, 1999; COUTINHO *et al.* 2006; BARBOSA-FILHO *et al.* 2008; COY & CUCA, 2009; PABON & CUCA, 2010; CHAVERRI *et al.* 2011, entre outros), inclusive para a espécie em questão (IMLER *et al.* 2003; ZHOU *et al.* 2000; AHMAD & CAVA, 1977; GOODWIN *et al.* 1960). *Ocotea leucoxylon* foi eleita em função de serem observados nos espectros, tanto das folhas quanto dos galhos, íons bem destacados indicativos de alcaloides. O íon predominante nessas frações foi m/z 356. Essa massa está relacionada com a dos alcaloides 6-N-óxido dicentrina, glaucina, ococriptina e leucoxina.

O primeiro é um alcaloide isolado das espécies *O. acutifolia* (que teve seu potencial citotóxico testado contra quatro linhagens de células tumorais, nas quais não foi comprovada atividade) e *O. puberula* cuja atividade citotóxica *in vitro* foi testada contra linhagem de células humanas KB (SILVA, 2010; ARAÚJO, 2000; WU *et al.*, 1989). O segundo trata-se de um alcaloide isolado do tronco da espécie *O. macrophylla* (FRANCA *et al.*, 1975), terceiro foi isolado da espécie *Ocotea macropoda* (CAVA *et al.*, 1968) e leucoxina foi isolado de uma espécie *O. puberula*. O outro íon mais intenso observado nos espectros de ambas as frações foi m/z 342. Há registro na literatura de um alcaloide que possui massa correspondente a esse íon, a O- metilarmepavina metiodida (WU & HUANG, 2006), isolada das raízes de *Thalictrum sp.* (Ranunculaceae) e das cascas de *Phellodendron wilsonii* (Rutaceae). Não há registro de bioensaios para tais alcaloides.

As outras duas espécies escolhidas pertencem ao gênero *Aniba*: *A. ferrea* e *A. panurensis*. Existem poucos alcaloides isolados para o gênero *Aniba* (SANTOS *et al.* 2011; HIRANTHI *et al.*, 2004; KLAUSMEYER *et al.*, 2004; BRAVO *et al.* 1996; OGER *et al.* 1993; OGER *et al.* 1992; AGUIAR *et al.* 1980; FERREIRA *et al.* 1980; CORREA & GOTTLIEB, 1980; GOTTLIEB & ROCHA, 1972). *Aniba ferrea* foi eleita porque o espectro de massas da fração alcaloídica do extrato dos galhos dessa espécie, apresentou apenas três íons com massa indicativa de alcaloide. Além desses, foram observados apenas dois outros íons minoritários, o que nos levou a escolher essa espécie como fonte promissora de alcaloides. O íon majoritário observado foi o de massa m/z 300, seguido dos íons m/z 330 e m/z 346.

Apesar de não terem sido encontrados estudos de isolamento de alcaloides para a espécie *A. ferrea*, há registro na literatura de alcaloide com mesma massa do íon majoritário m/z 300 observado no espectro de massas da espécie em discussão. Trata-se do alcaloide N-

metilcoclaurina (SCHMIDT, 2005). A massa do íon m/z 330, o segundo íon mais destacado, pode ser comparada com a massa do alcaloide reticulina, isolado de duas espécies: uma pertencente à família Papaveraceae (SCHMIDT, 2005) e outra pertencente à família Lauraceae (DIAS, 2003). No entanto, para esses dois alcaloides, cujas massas correspondem aos íons em discussão, não foram encontrados registros de bioensaios. Não foi encontrada sugestão de alcaloide para íon m/z 346.

Aniba panurensis é uma espécie pouco estudada, como a maioria das espécies de Lauraceae que ocorrem na Amazônia. Na literatura foi encontrado um único estudo de isolamento de alcaloides isolado dessa espécie. Trata-se do alcaloide 6,8-didec-(1Z)-enil-5,7-dimetil-2,3-diidro-1H-indolizinium que apresentou atividade antimicrobiana frente à bactéria *Candida albicans* (KLAUSMEYER *et al.*, 2004). Dessa forma, apesar dos íons mais intensos, m/z 289 e 273, observados no espectro de massas das frações alcaloídicas oriundas tanto dos galhos quanto das folhas dessa espécie não serem íons indicativos de alcaloides, resolveu-se investiga-la, visto que foi observado na placa cromatográfica, revelada com dragendorff, um forte indicativo da presença de alcaloides, como mostrado na figura 46. Assim, foram isolados cinco alcaloides das três espécies selecionadas para serem fracionadas: dois da espécie *Aniba ferrea* (m/z 328 e 330), dois de *Aniba panurensis* (m/z 273 e 289) e um de *Ocotea leucoxylon* (m/z 356). Realizaram-se ainda ensaios antioxidante, antimicrobiano e citotóxico com os extratos e frações alcaloídicas das espécies anteriormente citadas, que passaram por processos de fracionamento e isolamento, e com mais quatro espécies: *Aniba guianensis*, *Aniba parviflora*, *Licaria martiniana* e *Licaria canella angustata*.

5.2. FASE 2: Escolha da metodologia para a obtenção das frações alcalóidicas

5.2.1. Rendimento das extrações de frações alcalóidicas

De acordo com os resultados apresentados na tabela 20 os rendimentos (%) das frações alcalóidicas, realizado a partir de 1 g de material de partida, variaram de 0,25 nos galhos de *A. panurensis* a 7,48 nas folhas de *O. leucoxylon*, sendo que essa última espécie apresentou rendimento mais expressivo tanto para as folhas quanto para os galhos, nas três metodologias testadas. Entre os métodos testados, o primeiro foi o que proporcionou melhores resultados tanto para as folhas quanto para os galhos analisados.

Espécies	Rendimento Método 1 (%)		Rendimento Método 2 (%)		Rendimento Método 3 (%)	
	Folhas	Galhos	Folhas	Galhos	Folhas	Galhos
<i>Aniba ferrea</i>	1,14	0,96	0,85	0,68	0,40	0,61
<i>Aniba panurensis</i>	0,96	1,72	0,54	0,31	0,24	0,25
<i>A. guianensis</i>	0,76	0,64	0,74	0,62	0,73	0,51
<i>A. parviflora</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>L. canella angustata</i>	2,14	1,81	1,37	0,65	0,98	0,63
<i>L. martiniana</i>	2,06	0,92	1,45	0,76	1,21	0,67
<i>Ocotea leucoxylon</i>	7,48	5,98	7,21	5,68	4,12	3,09

Tabela 20- Rendimento da partição ácido-base (%)

NR = não realizado

O segundo método mais eficaz foi o 2, cujo rendimento variou de 7,21% a 0,31% com melhor resultado para as folhas de *O. leucoxylon* e o menos expressivo para os galhos de *A. panurensis*. Dos três métodos testados, o menos eficaz foi o terceiro nas duas partes testadas, visto que foi observado menor rendimento para esse método em quase todos os casos.

5.2.2. Rendimento dos extratos etanólicos das espécies recoletadas

Considerando que a metodologia 1 apresentou maior rendimento, foi utilizado esse método para a aquisição de frações alcaloídicas em maior escala para atender aos objetivos desse estudo. Tendo em vista que as frações alcaloídicas obtidas a partir dessa metodologia são oriundas de extratos obtidos em etanol previamente preparados, foi também necessário à obtenção de extrato etanólicos em maior escala de cada uma das espécies selecionadas. O rendimento correspondente aos 14 extratos obtidos relacionados com as sete espécies estudadas, variou de 1,42 a 10,83% como pode ser observado na tabela 21.

Espécie	Folhas			Galhos		
	Massa submetida à extração (g)	Rendimento		Massa submetida à extração (g)	Rendimento	
		Massa final (g)	%		Massa final (g)	%
<i>A. ferrea</i>	250,0	5,3378	2,13	250,0	7,4335	2,97
<i>A. panurensis</i>	250,0	16,441	6,58	250,0	3,5578	1,42
<i>A. guianensis</i>	80,0	8,6654	10,83	80,0	5,6363	7,04
<i>A. parviflora</i>	250,0	6,506	2,60	250,0	6,8822	2,75
<i>L. canella angustata</i>	250,0	12,152	4,86	250,0	7,6512	3,06
<i>L. martiniana</i>	250,0	13,251	5,30	250,0	10,0531	4,02
<i>O. leucoxyton</i>	250,0	9,8252	3,93	250,0	7,6245	3,05

Tabela 21- Rendimento dos extratos etanólicos das folhas e galhos de espécies de Lauraceae

De acordo com os dados da tabela 21, a espécie *A. guianensis* apresentou rendimento mais expressivo, tanto nas folhas quanto nos galhos (10,83 e 7,04% respectivamente) e o menos expressivo foi para as folhas de *A. ferrea* (2,1351%) e galhos de *A. panurensis* (1,4231%). Nas sete espécies em questão foi verificado na maioria dos casos um maior rendimento dos extratos etanólicos para as folhas, quando comparados com os dos galhos da mesma espécie.

5.3. FASE 3: Isolamento, identificação e bioensaios

5.3.1. Identificação estrutural dos metabólitos secundários isolados

O estudo fitoquímico de três espécies de Lauraceae (*O. leucoxydon*, *A. ferrea* e *A. panurensis*) levou ao isolamento de cinco substâncias correspondentes às massas dos íons moleculares protonados em: 356, 330, 328, 273 e 289. A estrutura dessas substâncias foi determinada com base na análise dos dados dos espectros de massas (operando no modo positivo) e de dados de RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais HSQC e HMBC, juntamente com a comparação com dados da literatura (COSTA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2011; GARCEZ *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2010; ZANIN *et al.*, 2011; ZANIN & LORDELLO, 2007; SCHIMDT *et al.*, 2005; STÉVIGNY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2002; GUINAUDEAU *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1984; GUINAUDEAU *et al.*, 1982; CAVA *et al.*, 1968). De acordo com esses dados chegou-se à conclusão de que as substâncias isoladas correspondem a dois tipos de alcaloides: três isoquinolínicos de m/z 356, 328 e 330 (dois da classe dos aporfinoide e um da classe benziltetraidroisoquinolínico, respectivamente) e dois indólicos de m/z 273 e 289.

Segundo Shama (1972) e Cavé *et al.*, (1987), os alcaloides aporfínicos podem sofrer substituições no anel A (no carbono 1, 2 e 3) e no anel D, cujas substituições mais comuns ocorrem nos carbonos 9, 10 e 11, sendo que não é comum substituição no carbono 8. Destacam, também, que, de forma geral, tais substituintes são oxigenados (presença de hidroxilas ou metoxilas), visto que tais compostos são biossintetizados a partir de alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos via acoplamentos oxidativos. Às análises dos espectros associou-se o conhecimento da constituição alcaloídica de extratos de Lauraceae relatados na literatura.

5.3.1.1. Substância 1

A substância 1, oriunda do extrato em etanol dos galhos de *O. leucoxyton*, foi obtida como um sólido branco após pré- fracionamento e fracionamento em coluna de sílica gel em fase normal e recristalização com Hex, DCM, MeOH e AcOEt. Na figura 47A, 47B e 47C podem ser observadas as placas cromatográficas em sílica gel do pré-fracionamento, fracionamento e substância isolada eluídas em CHCl₃/MeOH (90:10), AcOEt/MeOH (70:30) e CHCl₃/MeOH (90:10) respectivamente, reveladas com dragendorff. As manchas laranjadas indicam presença de alcaloides.

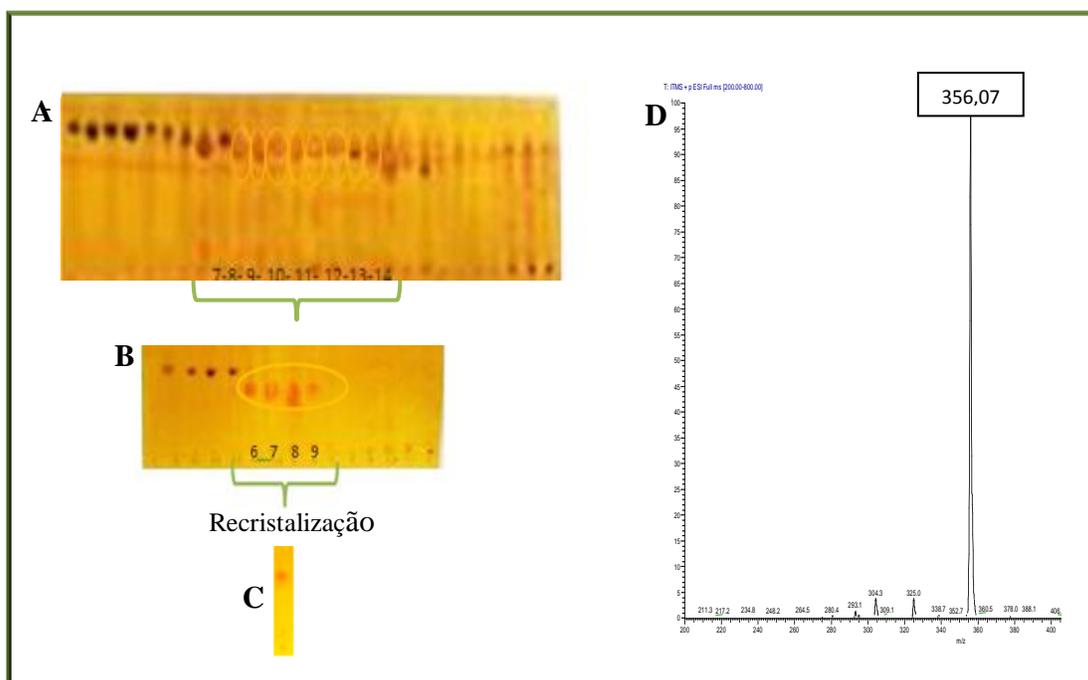


Figura 47- Placas cromatográficas em sílica gel- A: CCD do pré-fracionamento; B: CCD do fracionamento; C: CCD da substância isolada; D: Espectro de massas da substância isolada.

O espectro de massas da substância 1, gerado no modo positivo, forneceu um íon molecular protonado em m/z de 356, como pode ser observado na figura 50D. Com esse íon molecular ímpar (355), fica confirmada a presença de um alcaloide contendo um único

nitrogênio e uma molécula mais pesada, como um alcaloide aporfínico com várias metoxilas. Na figura 48, correspondente ao espectro de MSⁿ, é apresentado o perfil de fragmentação do íon m/z 356.

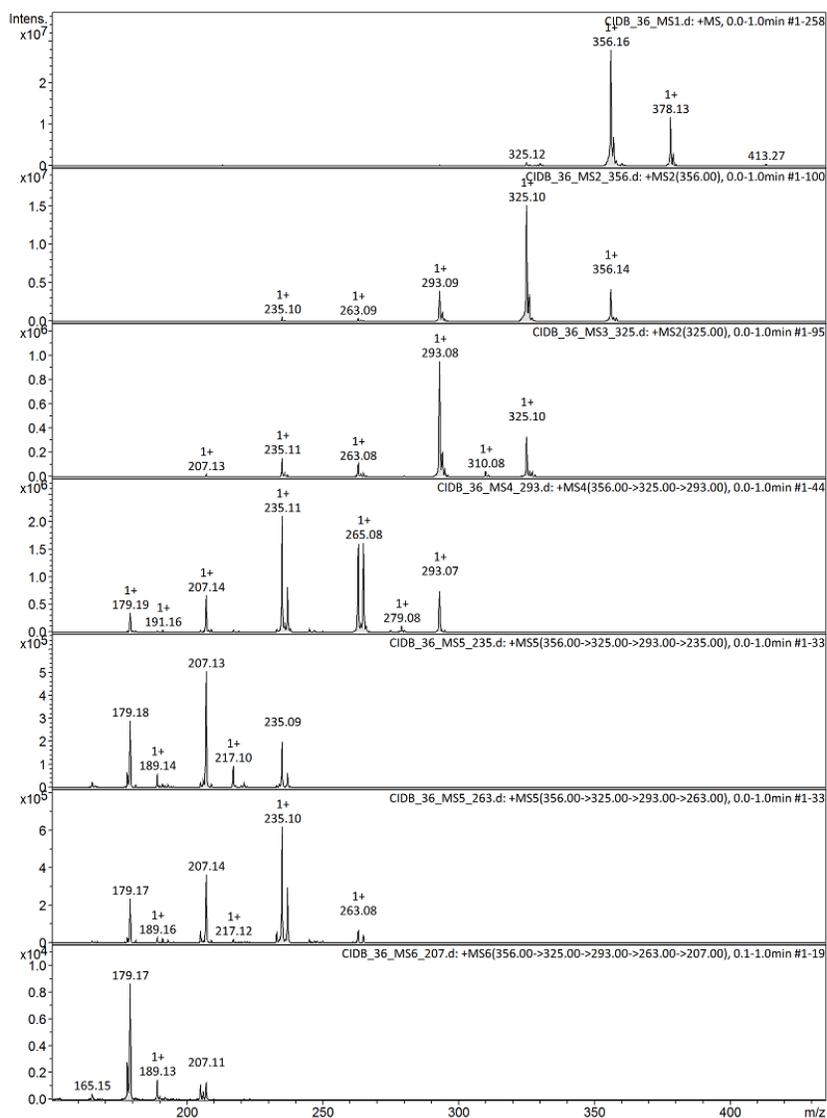


Figura 48- ESI (+)-MS¹, MS², MS³, MS⁴, MS⁵ e MS⁶ do íon m/z 356

Neste perfil observa-se primeiramente a formação dos fragmentos m/z 325 e 293. Este último originou os íons m/z 263 (perda de 30 Da) e m/z 265 (perda de 28 Da). Ambos deram origem ao fragmento m/z 235 a partir das perdas de 28 e 30 Da, respectivamente. Partindo do íon m/z 235 foram observadas duas perdas sequenciais, ambas de 28 Da, que

originaram os fragmentos de m/z 207 e m/z 179, respectivamente. Os fragmentos iônicos obtidos por MS^n foram caracterizados por meio da análise das fragmentações-chave.

A primeira perda observada foi de 31 Da (CH_3NH_2), seguida de 32 Da (CH_3OH) e perdas sequenciais de 28 Da (CO) e 30 Da (CH_2O). O inverso destas duas últimas perdas também se observou, ou seja, perdas sequenciais de 30 e 28 Da. Perda inicial do fragmento de massa 17 ou 31 Da é essencial para identificar se ao nitrogênio do grupo amina está ligado um hidrogênio ou uma metila, respectivamente.

Logo, verifica-se que neste caso, como a perda inicial foi de 31Da, o alcaloide em questão está ligado á uma metila. Sugere-se ainda que nesta molécula esteja presente o grupo metilenodióxi, além de grupos metoxila e hidroxila vicinal, devido às perdas sequenciais dos grupos CH_2O e CO e perdas sequenciais de CH_3OH e CO (STÉVÍHNY, 2004).

Os dados de fragmentação da substância 1 protonada em m/z 356 ($[M+H]^+$), aliados à comparação com os registros da literatura, compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{22}NO_5$, confirmada pela análise do espectro de RMN de 1H , sinalizam que tal substância seja o alcaloide de esqueleto aporfínico 1,10-dimetóxi-2,3-metilenodióxido-11-hidroxiaporfínico também chamado de N-metilernandina ou ainda ocokriptina descrito pela primeira vez na espécie *O. leucoxylon*. A estrutura química desse alcaloide é apresentada na figura 49.

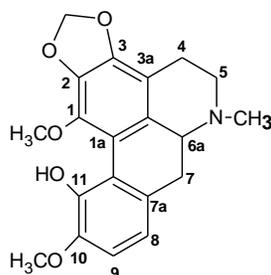


Figura 49- Alcaloide aporfínico ocokriptina isolado dos galhos de *O. leucoxydon*

Esta substância foi isolada anteriormente da espécie *Ocotea macropoda* (CAVA *et al.*, 1968) e posteriormente da espécie *Lindera chunii* (ZHANG *et al.*, 2002), ambas da família Lauraceae. Na figura 50 é apresentada a fragmentação da molécula desse alcaloide, baseada na proposta de Stévigny *et al.*, (2004). Nesta proposta pode ser observada inicialmente a formação dos íons de m/z 325 e 293.

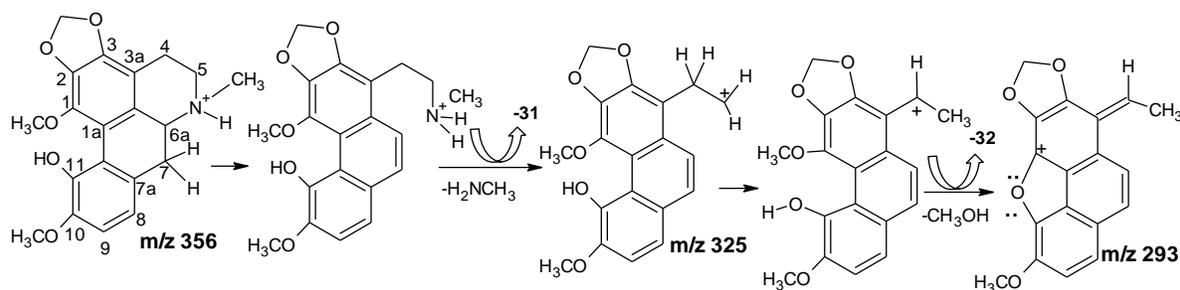


Figura 50- Fragmentação da molécula ocokriptina baseada na proposta de Stévigny *et al.*, (2004)

A partir do íon de m/z 293, é apresentado um mecanismo para a fragmentação para essa molécula, onde são observados dois caminhos para a formação do fragmento de m/z 235. Seguindo essa proposta pelo caminho B, verifica-se que esse último íon origina mais dois fragmentos de m/z 207 e 179, respectivamente (figura 51).

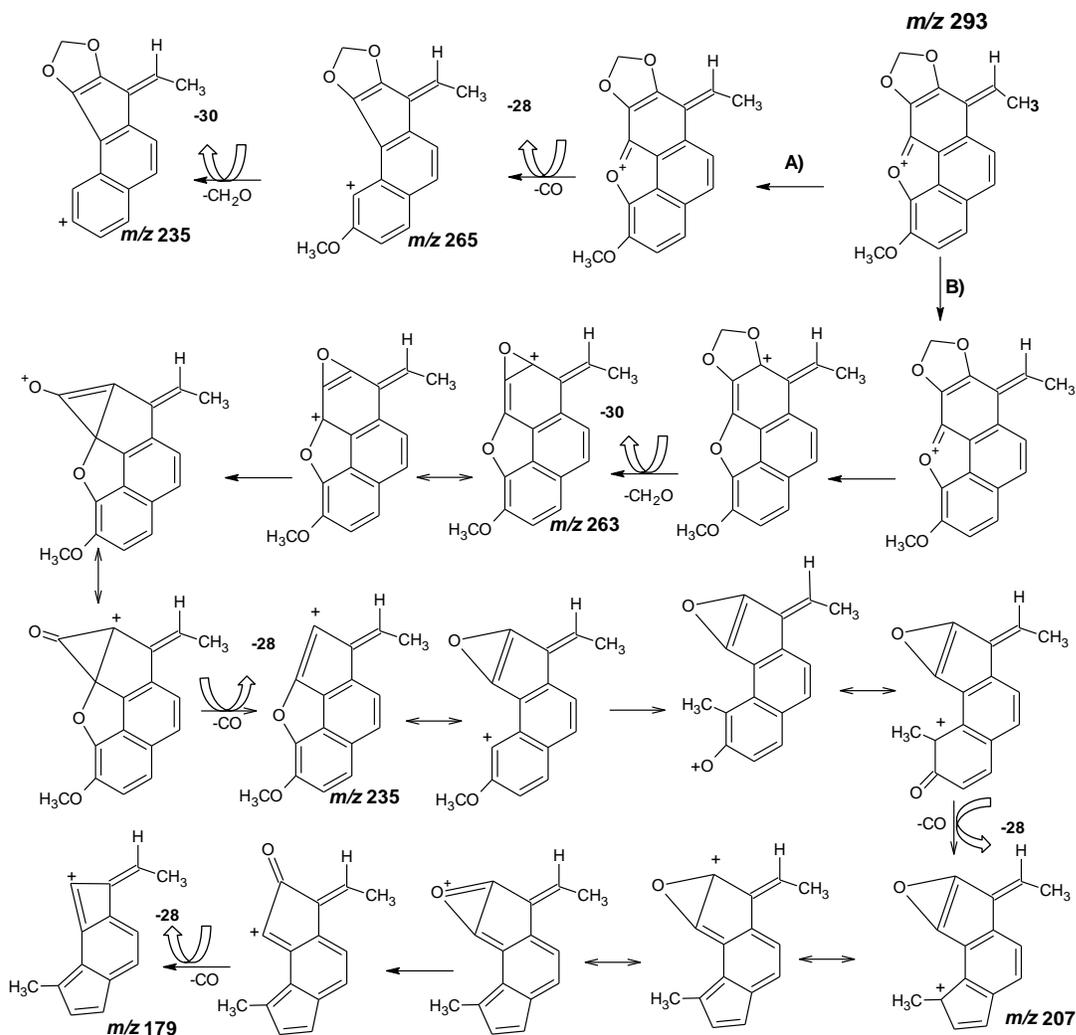


Figura 51- Proposta de mecanismo para a fragmentação do alcaloide ococoptina

No espectro de RMN ^1H a 500 MHz em CDCl_3 (figura 52) foram observados o deslocamento em 7,27, representado por um singlete, é característico do solvente utilizado (CDCl_3). Os sinais em δ 6,84 e δ 6,85, localizados em C8 e C9, respectivamente, foram atribuídos á dois hidrogênios aromáticos presentes na estrutura. Sinais observados entre δ 3,35 δ e 3,96 foram atribuídos aos prótons metilênicos localizados em C4, C5 e C7, além de um sinal em δ 4,05 atribuído a um próton metino em C6a.

Verificou-se também um sinal na forma de singlete em δ 3,92 com integração para 6 hidrogênios característicos de grupos metoxílicos substituídos em C1 e C10 e dois sinais

na forma de dubletos, sendo um em δ 6,07 (1H) e outro em δ 6,12 (1H) típicos dos hidrogênios do grupo metilenodióxi substituído em C-2 e C-3 (GUINAUDEAU *et al.*, 1983).

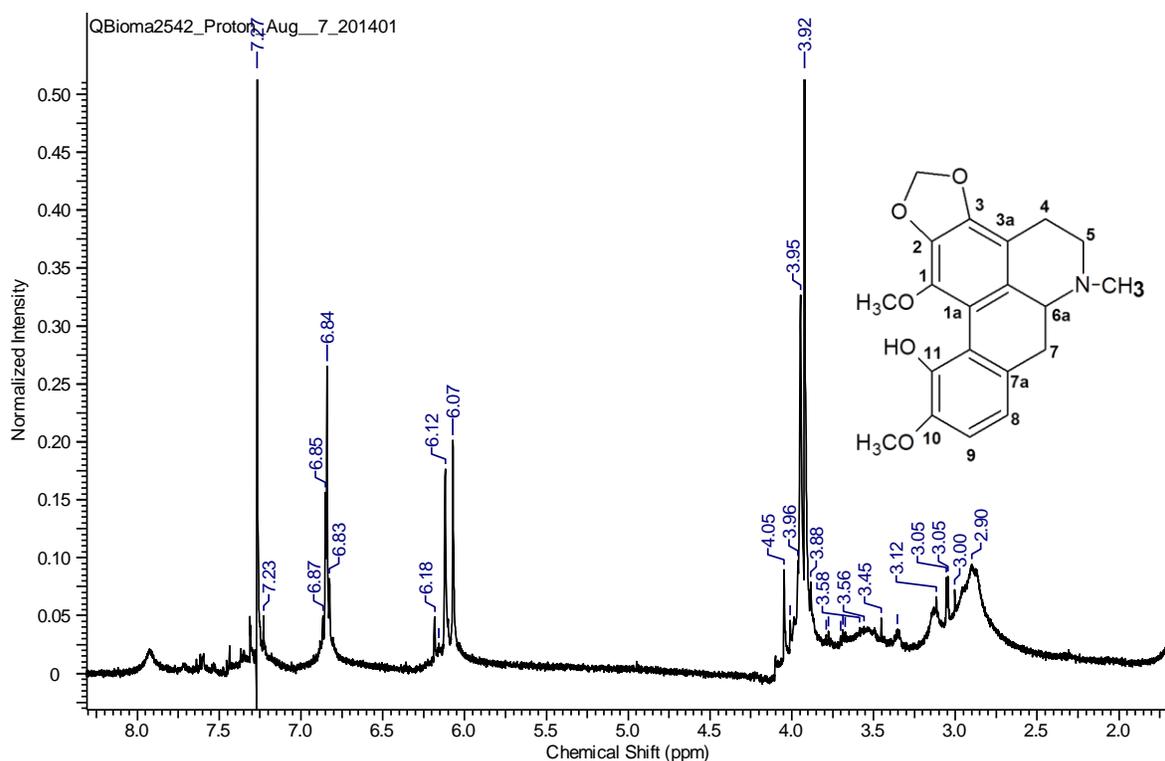


Figura 52- Espectro de RMN ^1H do alcaloide ococipina isolado dos galhos de *O. leucoxylon*

A comparação dos dados espectrais de RMN ^1H com o descrito na literatura para o mesmo alcaloide, isolado da espécie *Ocotea macropoda* [(Lauraceae) (CAVA *et al.*, 1968)], indicou a similaridade entre as substâncias.

Alguns deslocamentos não foram fornecidos no estudo de Cava *et al.*, 1968. Assim, foi necessário comparar os dados experimentais obtidos com os do alcaloide leucoxina obtido a partir da espécie *Ocotea perula* [(Lauraceae) (ZANIN *et al.*, 2011)]. Leucoxina possui a mesma massa molecular do alcaloide ocokriptina em questão e, portanto, são substâncias isômeras, sendo possível tal comparação (tabela 22).

Posição	¹ H (dados experimentais) ¹	¹ H (literatura) ²	¹ H (literatura) ³
3	-	-	6,58 (1H, <i>s</i>)
4	3,35 (1H, <i>m</i>)	-	3,33 (1H, <i>m</i>)
	3,45 (1H, <i>m</i>)	-	3,39 (1H, <i>m</i>)
5	3,56 (1H, <i>m</i>)	-	3,59 (1H, <i>m</i>)
	3,88 (1H, <i>m</i>)	-	3,72 (1H, <i>m</i>)
6 (a)	4,05 (1H, <i>m</i>)	-	-
7	3,96 (1H, <i>m</i>)	-	3,64-3,92 (1H, <i>m</i>)
	3,45 (1H, <i>m</i>)	-	3,32-3,49 (1H, <i>m</i>)
8	6,84 (1H, <i>s</i>)	6,77 (1H)	-
9	6,85 (1H, <i>s</i>)	6,77 (1H)	-
11	-	-	7,26 (1H, <i>s</i>)
1- OMe	3,92 (3H, <i>s</i>)	3,91 (3H, <i>s</i>)	3,90 (3H, <i>s</i>)
10- OMe	3,92 (3H, <i>s</i>)	3,91 (3H, <i>s</i>)	3,94 (3H, <i>s</i>)
2,3- OCH₂O-	6,07; 6,12 (2H, d; <i>J</i> =1,50)	5,92; 5,98 (2H)	5,96; 6,14 (2H, d; <i>J</i> =1, 18)
N- CH₃	3,00 (3H, <i>s</i>)	2,5	3,01 (3H, <i>s</i>)

Tabela 22- ¹Experimento realizado em 500 MHz para RMN ¹H em CDCl₃; ²Dados da literatura de acordo com CAVA *et al.*, 1968; ³ZHANG *et al.*, 2002 (400MHz, CDCl₃).

5.3.1.2. Substâncias 2 e 3

As substâncias 2 e 3, que se apresentaram como sólidos brancos, foram obtidas dos galhos da espécie *A. ferrea*. Após o pré-fracionamento, as frações 11 e 12 foram reunidas e no fracionamento subsequente as substância 2 e 3 foram obtidas puras nas frações 3 e 5, respectivamente. As placas cromatográficas em sílica gel reveladas com dragendorff referentes ao pré-fracionamento e fracionamento eluídas em CHCl₃/MeOH (9:1) e CHCl₃/MeOH (8:2) respectivamente, podem ser observadas na figura 53A e 53B.

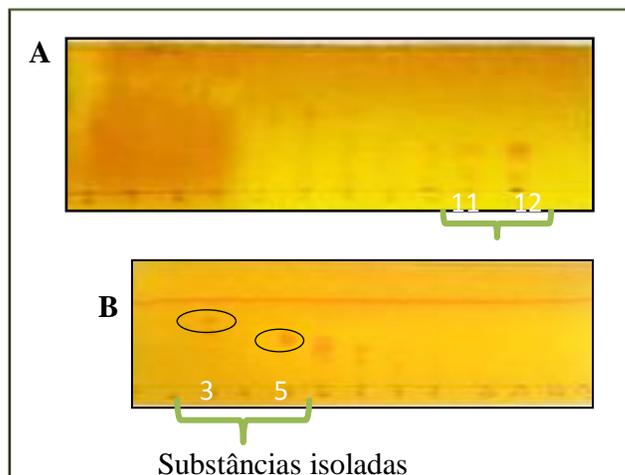


Figura 53- Placas cromatográficas em sílica gel.

A: CCD do pré-fracionamento; **B:** CCD do fracionamento

A análise da inserção direta (modo positivo) em solução metanólica das frações 3 e 5 mostraram que tais frações correspondem aos íons protonados em m/z 328 e 330, respectivamente, conforme os espectros de massas total mostrados na figura 54.

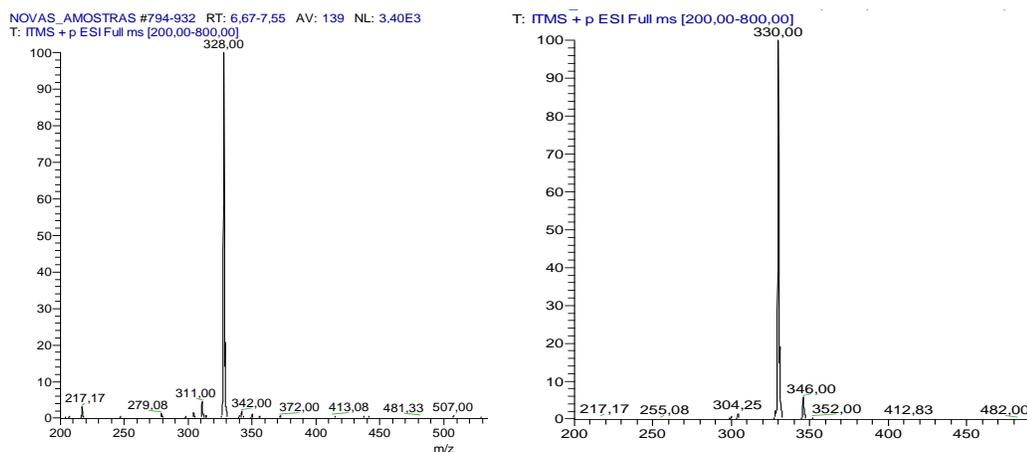


Figura 54- Espectros de massas das frações 3 e 5, respectivamente.

Na fragmentação do íon m/z 328 foi observada a formação dos íons de m/z 311, 279, 264 e 236 que correspondem às perdas de 17 (NH_3), 32 (CH_3OH), 15 (CH_3) e 28 (CO) Daltons, respectivamente, mostrado na figura 55.

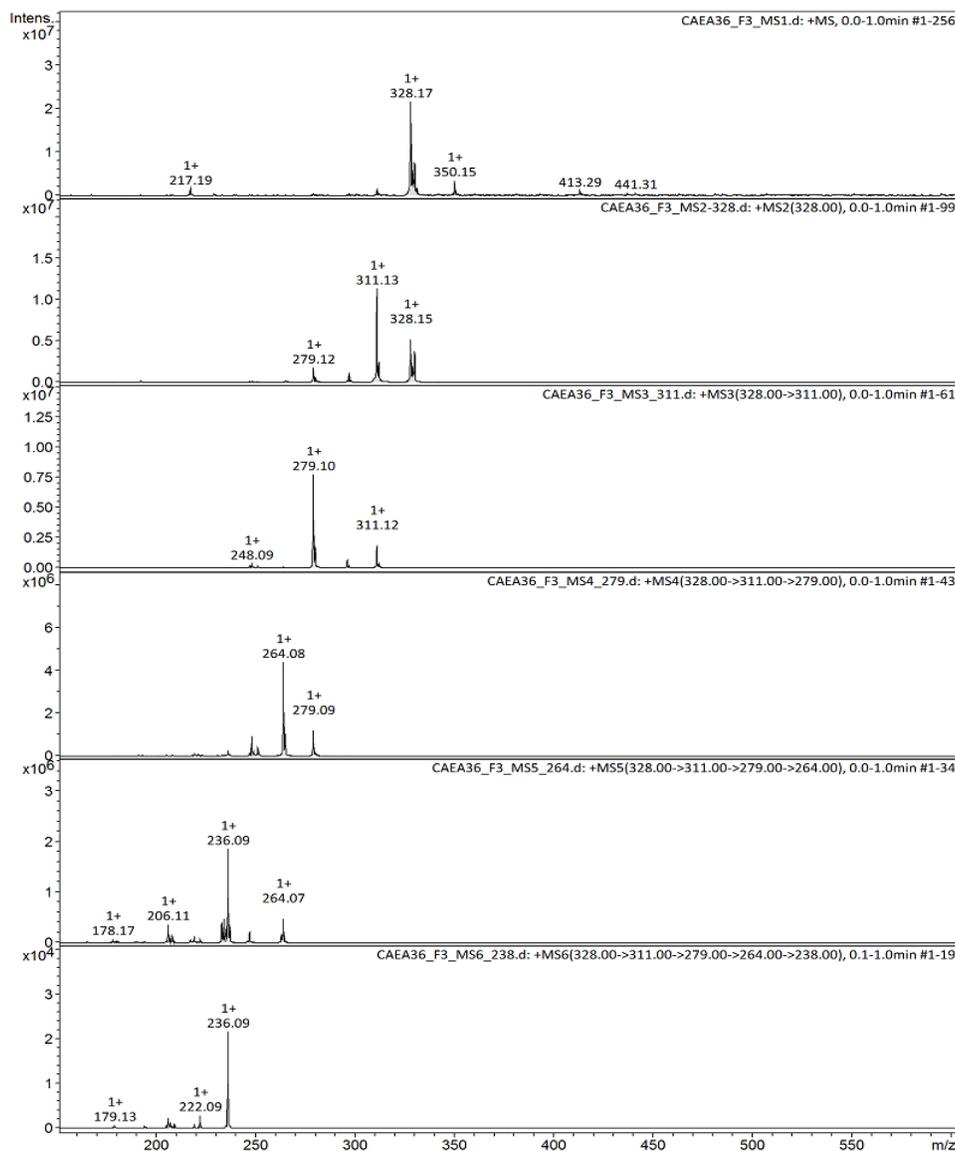


Figura 55- ESI (+)-MS¹, MS², MS³, MS⁴, MS⁵ e MS⁶ do íon m/z 328

A perda inicial de 17 Da foi atribuída à saída do grupo NH_3 , o que sinaliza que o nitrogênio presente na molécula está ligado a um hidrogênio, e não a uma metila. A saída do grupo CH_3OH , observada depois da saída do grupo amino, e a subsequente perda de $^{\bullet}\text{CH}_3$ seguida da saída do grupo CO, são típicas de compostos contendo um ou mais grupos metóxi não vicinal a um grupo hidróxi, como é observado na fragmentação do íon m/z 328 apresentada na figura 61 (STÉVINY, 2004). Os dados de fragmentação de massas aliados á dados experimentais de RMN de ^1H propõem que a substância 2 seja o alcaloide aporfínicos laurotetanina. Na figura 56 é mostrada a estrutura desse alcaloide.

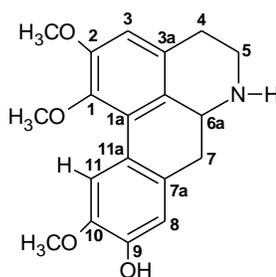


Figura 56- Alcaloide aporfínico laurotetanina isolado de *A. ferrea*

Este é o primeiro estudo de isolamento desse alcaloide no gênero *Aniba* e na espécie *Aniba ferrea*. No entanto, há necessidade de se realizar isolamento dessa substância em maior quantidade e submetê-la a nova análise de RMN ^1H e ^{13}C e, se necessários bidimensionais, para confirmar os dados de fragmentação, visto que a análise de RMN de ^1H realizada foi com apenas 1,5 mg de amostra.

Laurotetanina já foi descrito em outras espécies da família Lauraceae (UPRETY *et al.*, 1972; MOLLATAGHI *et al.*, 2012; Q. Z. ZHAO & J. WANG, 2005; BABCOCK & SEGELMAN, 1974; SHOEI-SHENG *et al.*, 2007; M. R. MUKHTAR *et al.*, 1997). Na

figura 57 é apresentada uma proposta de fragmentação para o íon m/z 328 baseada no estudo de Stévíhny *et al.*, 2004.

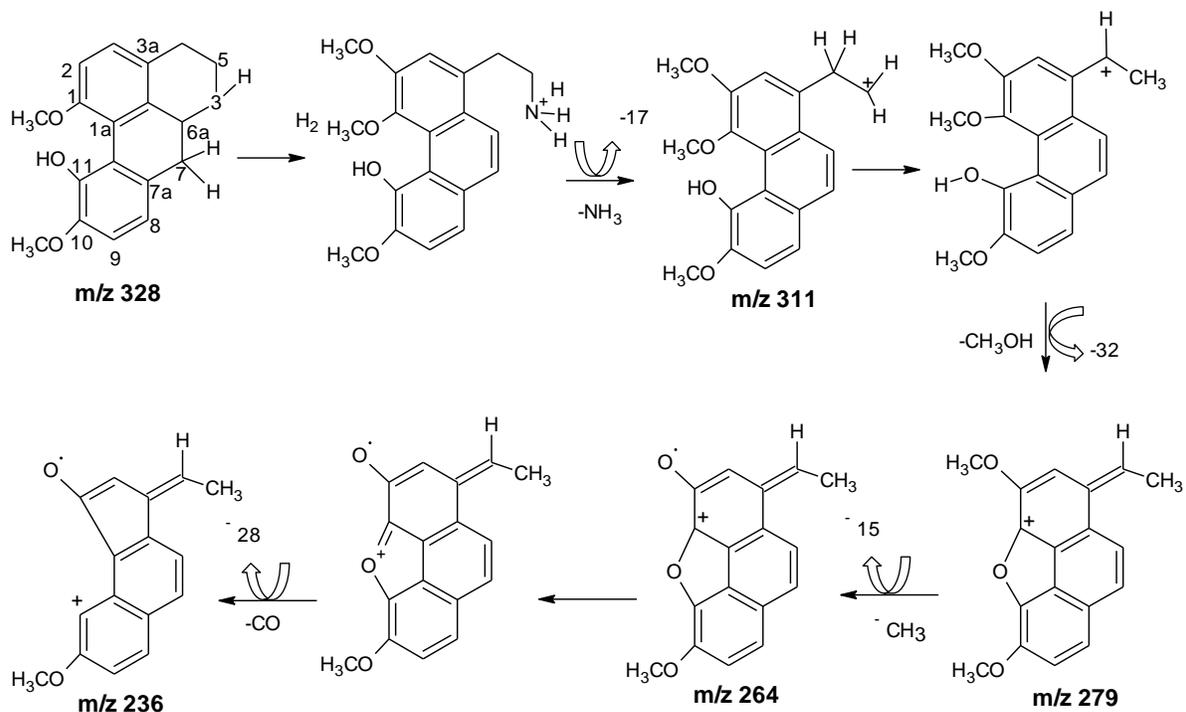


Figura 57- Proposta de fragmentação para o alcaloide aporfínico laurotetanina isolado dos galhos de *A. ferrea*

No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (figura 58) foram observados três sinais indicativos de hidrogênios de anel aromático em δ 6,81 (1H, *m*), δ 6,82 (1H, *m*) e em δ 7,31 (1H, *m*), atribuíveis a H-3, H-8 e H-11, respectivamente. Outros sinais na região entre δ 3,60 e δ 3,70 foram notados e relacionados com hidrogênios metilênicos em H-4, H-5 e H-7, além de um sinal em δ 3,68, referente a um hidrogênio metínico no em H6a. Os sinais em δ 3,88 e δ 3,89 foram atribuídos às metoxilas em C1, C2 e C10.

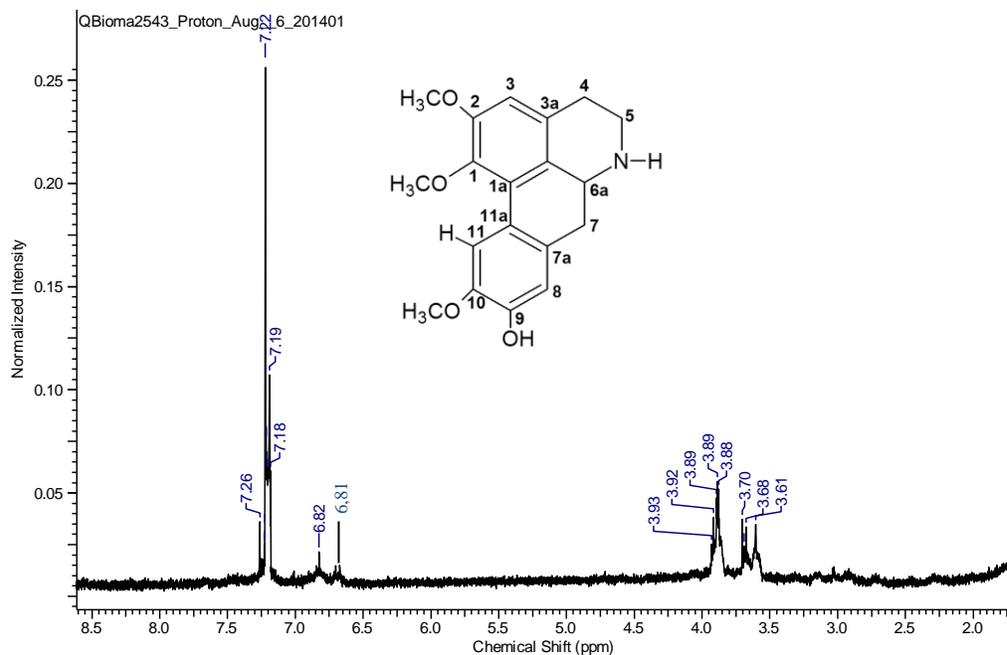


Figura 58- Espectro de RMN de ^1H do alcaloide laurotetanina isolado de *Aniba ferrea*

Os deslocamentos observados no espectro experimental de RMN de ^1H (figura 64) são apresentados na tabela 23.

Posição	^1H (dados experimentais)
3	6,81 (1H, m)
4	3,61 (1H, m) 3,68 (1H, m)
5	3,70 (1H, m) 3,70 (1H, m)
6 (a)	3,68 (1H, m)
7	3,60 (1H, m) 3,60 (1H, m)
8	6,82 (1H, m)
11	7,31 (1H, m)
1-OMe (3H, s)	3,88 (3H, s)
2-OMe (3H, s)	3,89 (3H, s)
10-OMe (3H, s)	3,89 (3H, s)

Tabela 23- ^1H Dados experimentais de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3)

Para o íon m/z 330 observaram-se os fragmentos em m/z 192, 177, 149 e 148. A partir deste último íon foram notados os fragmentos de m/z 120 e 133, como pode ser observado na figura 59.

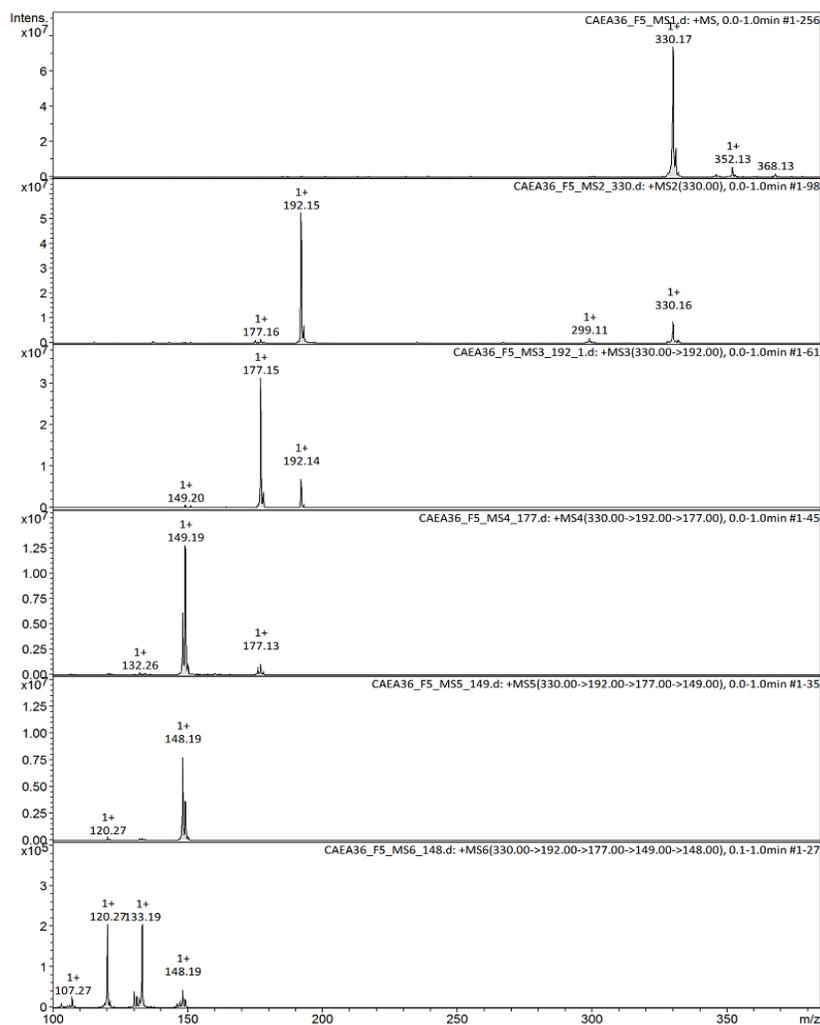


Figura 59- ESI (+)-MS¹, MS², MS³, MS⁴, MS⁵ e MS⁶ do íon m/z 330

Tais fragmentos correspondentes às perdas de 138 ($C_{11}H_{14}NO_2$), 15 ($\cdot CH_3$), 28 (CO), 1 ($\cdot H$), 28 (CO) e 15 ($\cdot CH_3$) Daltons. A ruptura do íon de m/z 330 produzindo os fragmentos de m/z 192 e 137 e a possível formação do fragmento de m/z 177 (a partir do íon de m/z 192 devido à perda de $\cdot CH_3$) é característica do alcaloide de esqueleto benziltetraidroisoquinolínico reticulina (SCHMIDT *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 1984).

Reticulina tem sido um alcaloide bem reportado na literatura (*Berberis microphylla* (Berberidaceae) (MANOSALVA *et al.*, 2014), *Dehaasia longipedicellata* (Lauraceae) (ZAHARI, *et al.*, 2014), *Litsea lancifolia* (Lauraceae) (Sulaiman *et al.*, 2011), *Radix linderae* (Lauraceae) (WU *et al.*, 2010), família Papaveraceae (SCHMIDT *et al.*, 2005), *Phoebe pittieri* (Lauraceae) (Castro *et al.*, 1984). No entanto, este é o primeiro relato de tal substância isolada da espécie *Aniba ferrea*. A figura a seguir apresenta a estrutura química desse alcaloide.

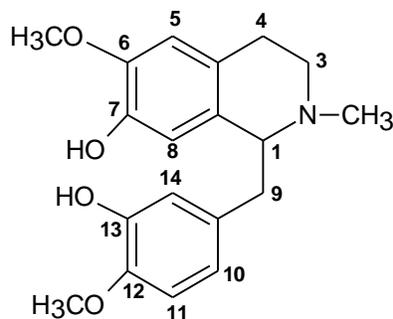


Figura 60- Alcaloide benziltetraidroisoquinolínico reticulina isolado de *A. ferrea*

Na figura 61 a seguir pode ser observada uma proposta de fragmentação para a reticulina baseada no estudo de Schmidt *et al.*, (2005) e Castro *et al.*, (1984).

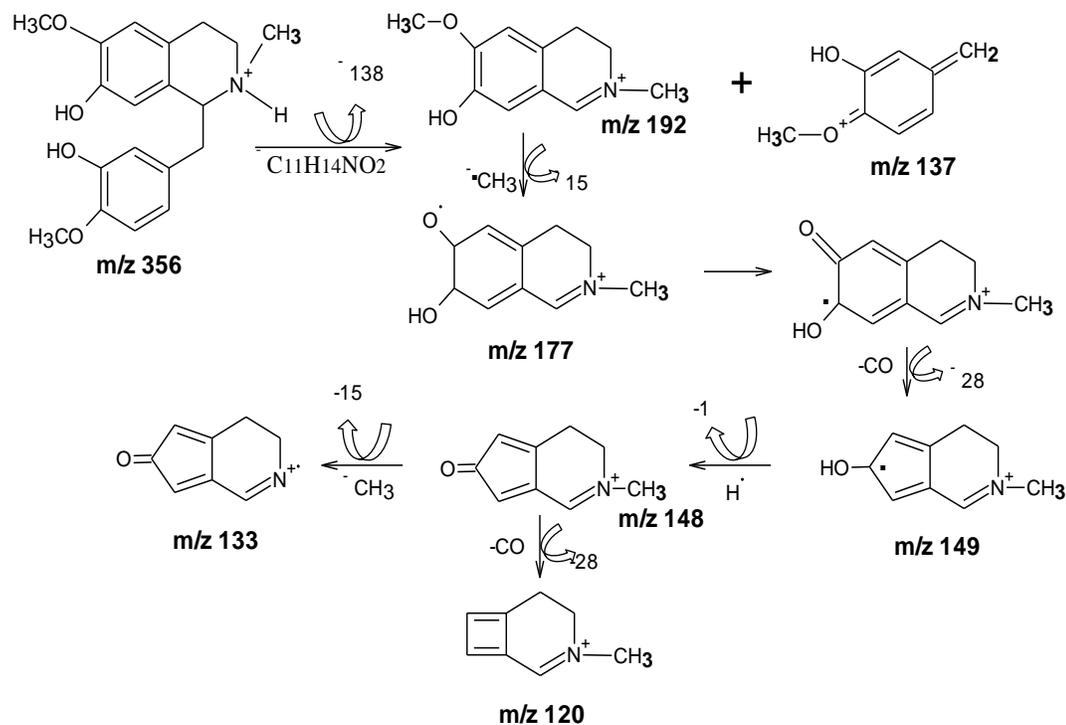


Figura 61- Proposta de mecanismo de fragmentação para o alcaloide reticulina baseada na proposta de Schmidt *et al.*, (2005); Castro *et al.*, (1984)

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (figura 62), os deslocamentos referente aos cinco hidrogênios aromáticos foram observados em δ 6,57 em (C5), δ 6,25 em (C8), δ 6,74 em C (14), δ 6,75 em C (11) e δ 6,62 em C (10). O sinal em δ 3,86 (6H, *s*) foi atribuído aos dois grupos metoxilícos em C6 e C12, assim como um grupo metila em δ 2,62 (3H, *sl*), característico de grupo metila ligado a nitrogênio. Seis sinais foram observados em δ 2,87, δ 2,78, δ 3,36, δ 3,34, δ 3,02 e δ 2,99 atribuídos á prótons metilênicos, além do sinal em δ 3,82, referente á um próton metínico.

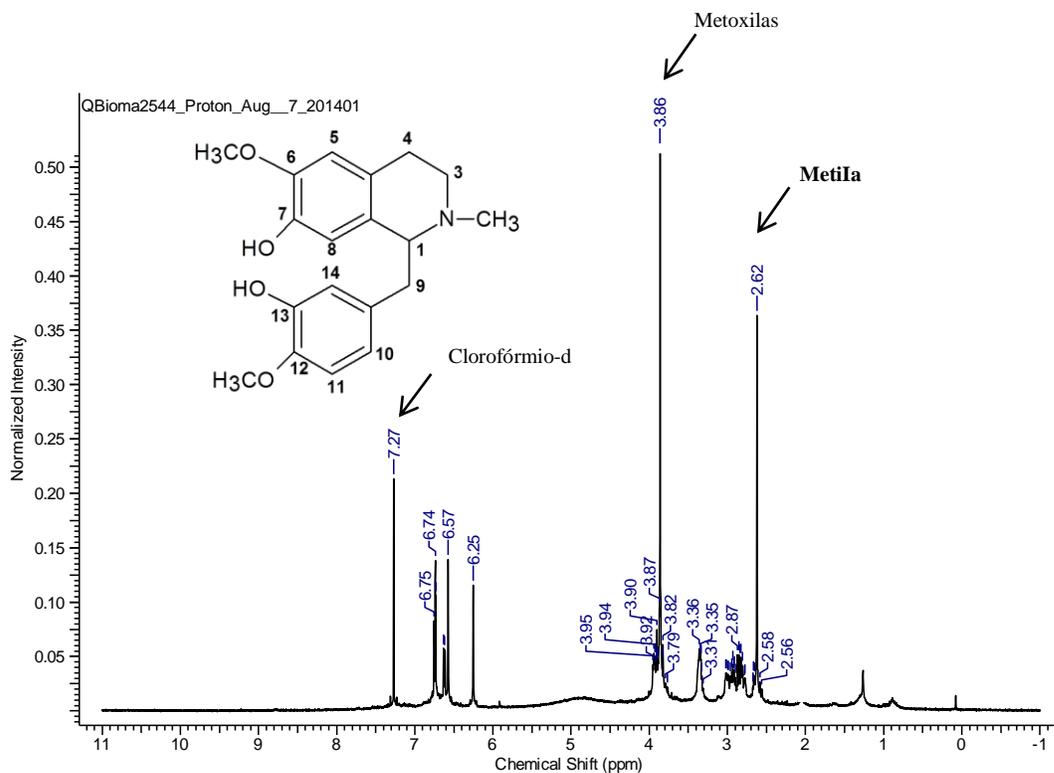


Figura 62- Espectro de RMN de ^1H da reticulina isolada de *Aniba férrea*

Na tabela 24 são apresentados os dados experimentais de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e os dados encontrados por Castro *et al.*, 1984 para o alcaloide reticulina.

Posição	^1H (dados experimentais) ¹	^1H (literatura) (dados da literatura) ²
1	3,82 (1H, <i>m</i>)	-
3	3,36 (1H, <i>m</i>)	3,25-2,55 (2 H, <i>m</i> -prótons alifáticos)
	3, 34 (1H, <i>m</i>)	3,25-2,55 (2 H, <i>m</i> -prótons alifáticos)
4	3,02 (2H, <i>m</i>)	3,25-2,55 (2 H, <i>m</i> -prótons alifáticos)
	2,99 (1H, <i>m</i>)	3,25-2,55 (2 H, <i>m</i> -prótons alifáticos)
5	6,57 (1H, <i>s</i>)	6,54 (1 H, <i>s</i>)
8	6,25 (1H, <i>s</i>)	6,39 (1 H, <i>s</i>)
9	2,87 (1H, <i>m</i>)	3,25-2,55 (2 H, <i>m</i> -prótons alifáticos)
	2,78(1H, <i>m</i>)	3,25-2,55 (2 H, <i>m</i> -prótons alifáticos)
10	6,62 (1H, <i>s</i>)	6,60 (1 H, <i>dd</i> , $J_1= 8,0$ Hz, $J_2= 1,5$ Hz)
11	6,75 (1H, <i>s</i>)	6,73 (1 H, <i>d</i> , $J= 8,0$ Hz)
14	6,74 (1H, <i>s</i>)	6,77 (1H, <i>d</i> , $J= 1,5$ Hz)
6-OMe	3,86 (1H, <i>s</i>)	3,85 (3H, <i>s</i>)
4'-OMe	3,86 (3H, <i>s</i>)	3,85(3H, <i>s</i>)
N-CH ₃	2,62 (3H, <i>sl</i>)	2,47 (3H, <i>s</i>)

Tabela 24- ¹ Experimentos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3); ² Dados de RMN ^1H de acordo com Castro *et al.*, 1984).

5.3.1.3. Substância 4 e 5

As substâncias 4 e 5, isoladas a partir do extrato desengraxado dos galhos de *A. panurensis*, foram obtidas como sólidos amarelos resultantes de um pré-fractionamento que originou 21 frações. Destas, as frações 6a e 6b apresentaram uma única mancha frente ao revelador dragendorff. Na figura 63 é apresentada a placa cromatográfica em sílica gel do pré-fractionamento eluída em Hex:AcOEt (80:20) e revelada com dragendorff. As manchas laranjadas indicam a presença de alcaloides.

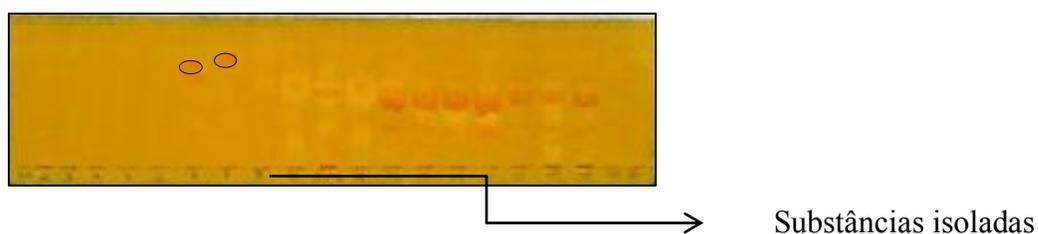


Figura 63- CCD do pré-fractionamento de *A. panurensis*

Os espectros de massas total das substâncias 4 e 5, realizados em modo positivo, forneceu os íons moleculares protonados em m/z 273 e 289 (figura 64).

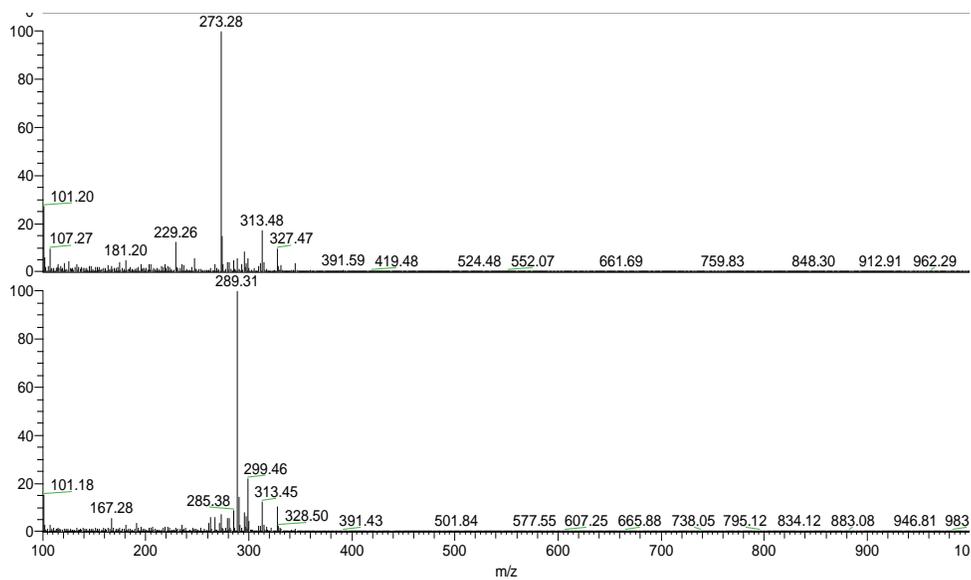


Figura 64- Espectros de massas total das substâncias 4 e 5.

Os íons observados na figura 70 indicam que tais substâncias sejam alcaloides com número par de átomos de nitrogênio pelo fato dos mesmos apresentarem massas ímpares quando protonados. O espectro de massas realizado por meio do ms^2 dos íons em questão é apresentado na figura 65.

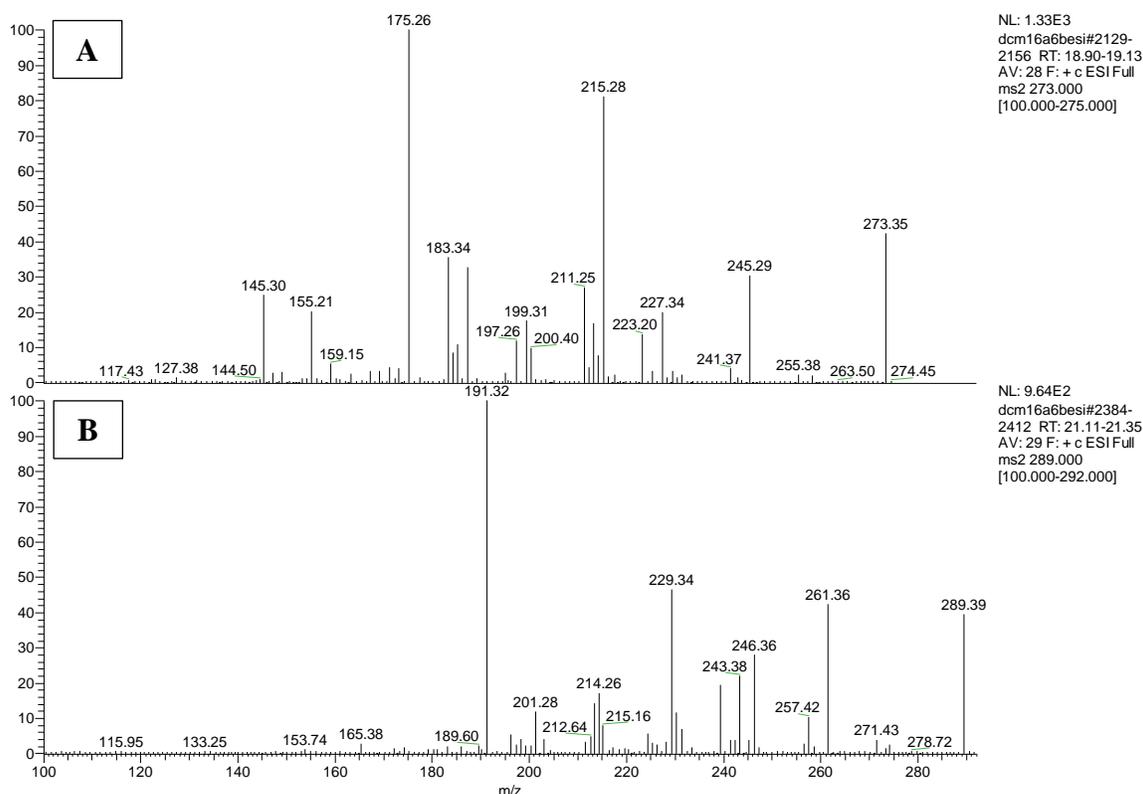


Figura 65- ESI (+)-MS² dos íons: (A) 273,36 e (B) 289,39 referente às substâncias 4 e 5.

O íon de m/z 273 (figura 65A) originou como principais fragmentos os íons de m/z 261 (característico da perda de CO), m/z 229 indicativo da perda de CH₃OH e m/z 175 (perda de 98 Da). Estas perdas também foram observadas na fragmentação do íon m/z 289,39 (figura 65B) que originaram os fragmentos de m/z 26 (perda de 28 Da), m/z 229 (perda de 32 Da) e de m/z 175 (perda de 98 Da). Outra similaridade verificada entre os espectros de ms^2 das duas substâncias em questão foi quanto à diferença de 16 Daltons observada entre os principais fragmentos nos referidos espectros, como é o caso dos

fragmentos 261 (figura 65B) e 245 (figura 65A), 243 (figura 65B) e 227 (figura 65A), 191 (figura 65B) e 175 (figura 65A). Tais similaridades entre os espectros de m/z dos íons em discussão sugerem que esses alcaloides possuam esqueletos químicos parecidos provavelmente com ausência de um oxigênio (16 Da) na estrutura correspondente ao íon de m/z 273.

Os dados de fragmentação juntamente com os de RMN de ^1H e os bidimensionais (HMBC e HSQC) corroboram para que as substâncias 4 e 5 sejam alcaloides indólicos de fórmulas moleculares $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ e $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$, respectivamente. Na figura 66 são mostradas as estruturas desses alcaloides.

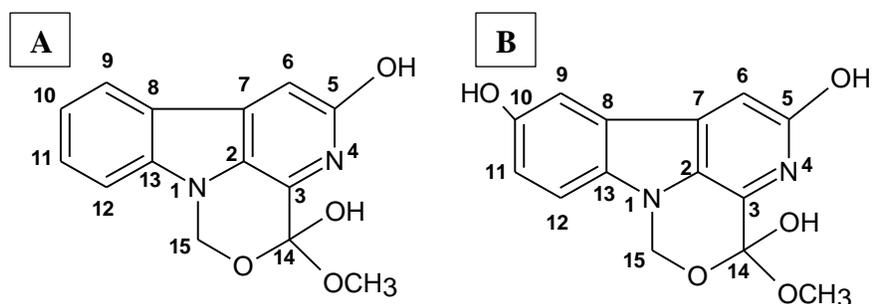


Figura 66- A: Alcaloide 4 de fórmula $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$; B: Alcaloide 5 de fórmula $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$.

Na análise do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), referente ao alcaloide 4, foram verificados quatro multipletos em δ 6,60, δ 7,52, δ 7,38 e δ 7,51 característicos de hidrogênios aromáticos. Em δ 5,95 foi observado um singlete, bem como a presença de um sinal em δ 5,50 (2H) atribuídos a hidrogênios metínicos. Verificou-se também um sinal típico de grupo metoxílico em δ 3,84 com integração para três hidrogênios (figura 67).

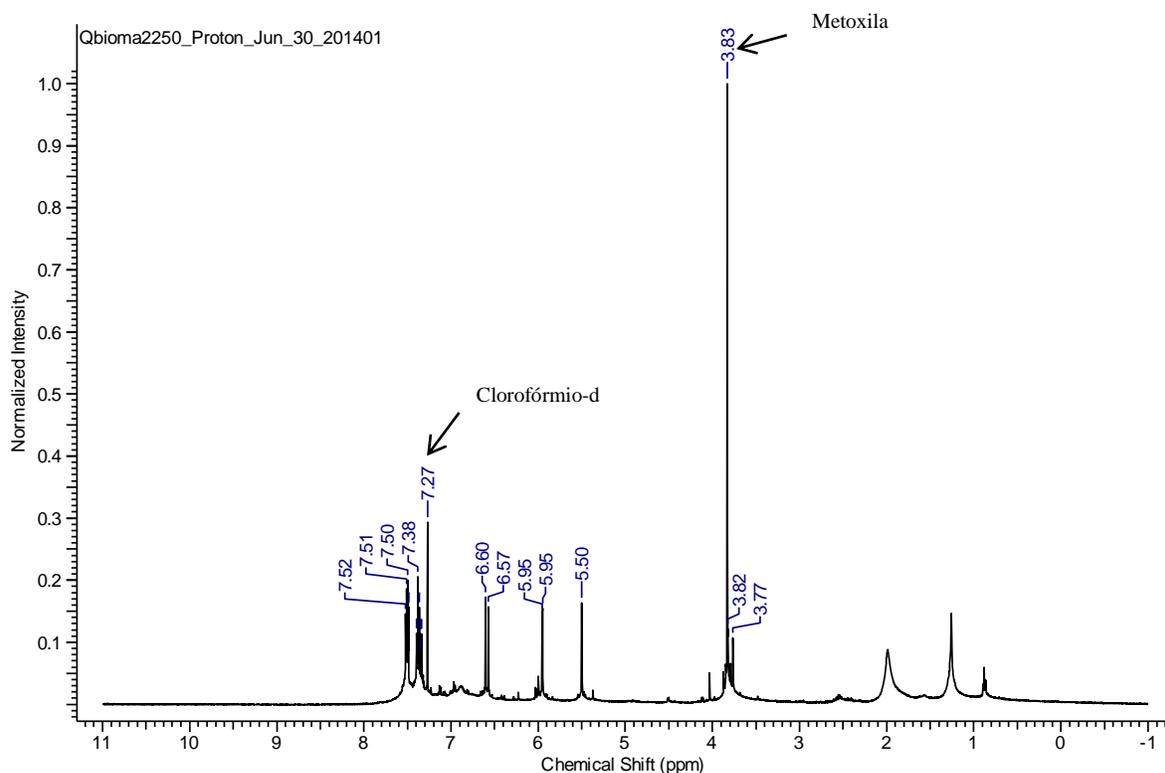


Figura 67- Espectro de RMN ^1H do alcaloide 4 de massa 272

No espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC (figura 68) foram observadas correlações do tipo 3J entre os sinais dos hidrogênios em δ 5,92 (H6) com os sinais dos carbonos em δ 158 (C5) e 118 (C7); δ 6,60 (H10) com os carbonos em δ 127 (C8) e δ 128 (C12); δ 7,52 (H9) com os carbonos em δ 118 (C7), δ 135 (C13) e δ 129 (C11); δ 7,38 (H11) com os carbonos em δ 128 (C9) e δ 135 (C13); δ 7,51 (H12) com os carbonos em δ 127 (C8) e δ 158 (C10); δ 5,52 (H15) com o carbono δ 171 (C14) e o sinal da metoxila em δ 3,84 correlacionando com o carbono em δ 58,5.

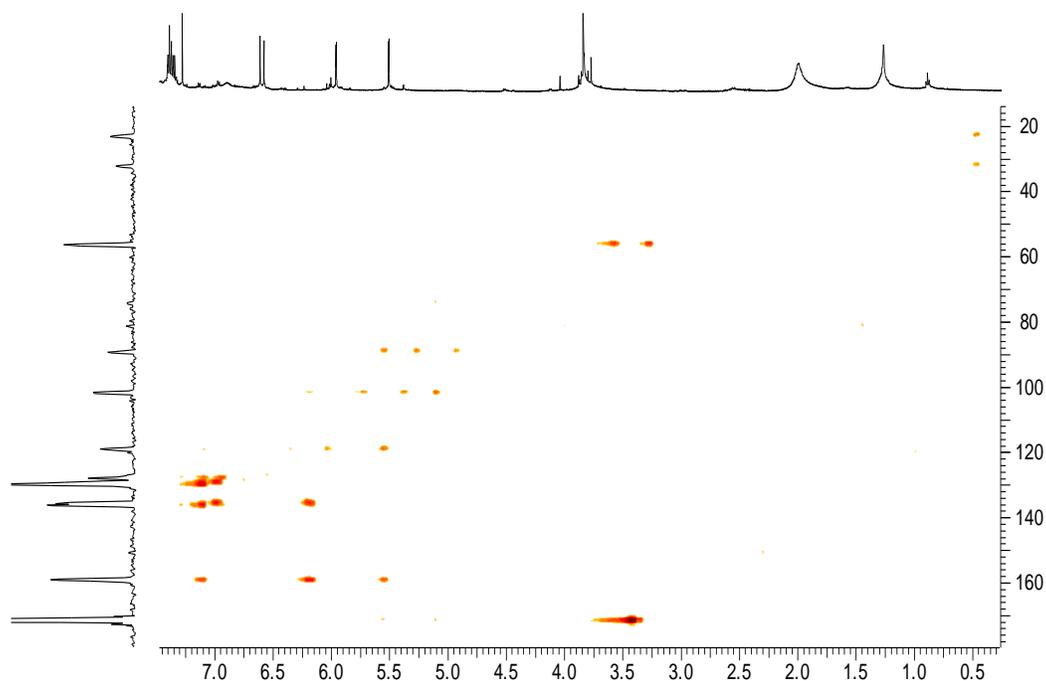


Figura 68- Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC do alcaloide 4

Na figura 69 pode-se verificar o esquema de correlações do tipo 3J referente ao alcaloide 4.

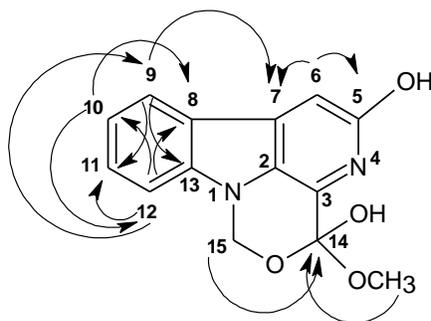


Figura 69- Correlações observadas no mapa de contorno HMBC do alcaloide 4

No espectro de HSQC (figura 70) foram observadas correlações entre os sinais do hidrogênio em δ 5,95 (H6) com o sinal do carbono em δ 101 (C6), do hidrogênio em δ 7,51 (H9) com o sinal do carbono em δ 128 (C9), do hidrogênio em δ 6,60 (H10) com o sinal do carbono em δ 158 (C10), do hidrogênio em δ 7,38 (H11) com o sinal do carbono

em δ 129 (C11), do hidrogênio em δ 7,52 (H12) com o sinal do carbono em δ 128 (C12) e dos hidrogênios em δ 5,50 e 5,95 (H15) com o sinal do carbono em δ 88 (C15).

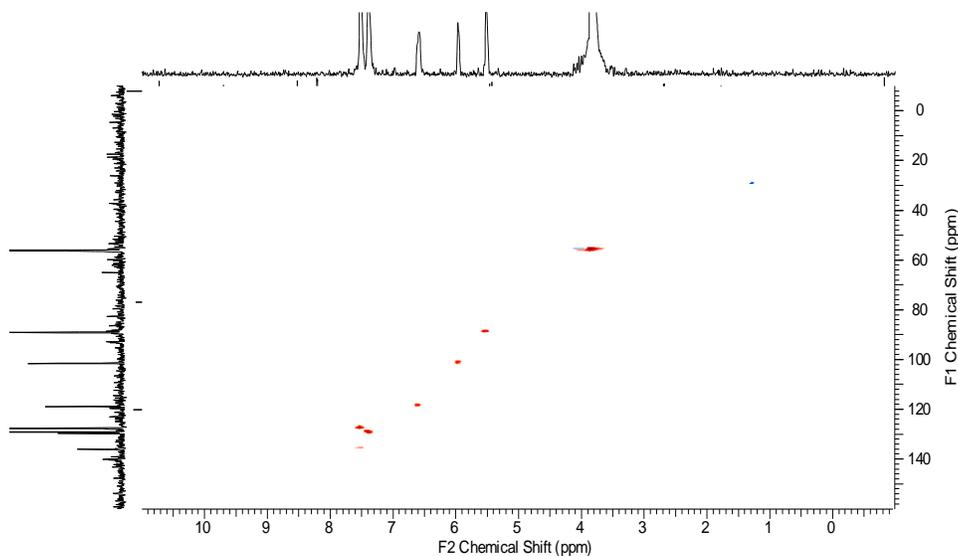


Figura 70- Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC

Na tabela 25 estão apresentados os dados dos espectros de 1D (^1H) e 2D (HMBC e HSQC) referente ao alcaloide 4 de massa 272.

Posição C/H	(^1H) ^{a, b, c}	(^{13}C) ^b	HMBC ^c
2	—	134	—
3	—	135	—
5	—	158	—
6	5,95	101	(C5); (C7)
7	—	118	—
8	—	127	—
9	7,51	128	(C7), (C13) e (C11)
10	6,60	158	(C8) e (C12)
11	7,38	129	(C9) e (C13)
12	7,52	128	(C8) e (C10)
13	—	135	—
14	—	171	—
15	5,50-5,95 (2H)	88	171 (C14)
16- OMe	3,84 (3H, s)	58,5	171 (C14)

Tabela 25- ^aDados de RMN de ^1H em CDCl_3 . ^bDados de HMBC. ^cDados de HSQC (500 MHz, CDCl_3).

A análise do espectro de RMN de ^1H a 500 MHz em CDCl_3 do alcaloide 5 (massa molecular 288) apresentou similaridades quando comparado com o espectro de ^1H do alcaloide 4 (de massa 272), visto que foram observados deslocamentos bastante próximos aos verificados no espectro do alcaloide de massa 4. Na figura 71 pode ser observado o espectro de RMN ^1H referente ao alcaloide em discussão.

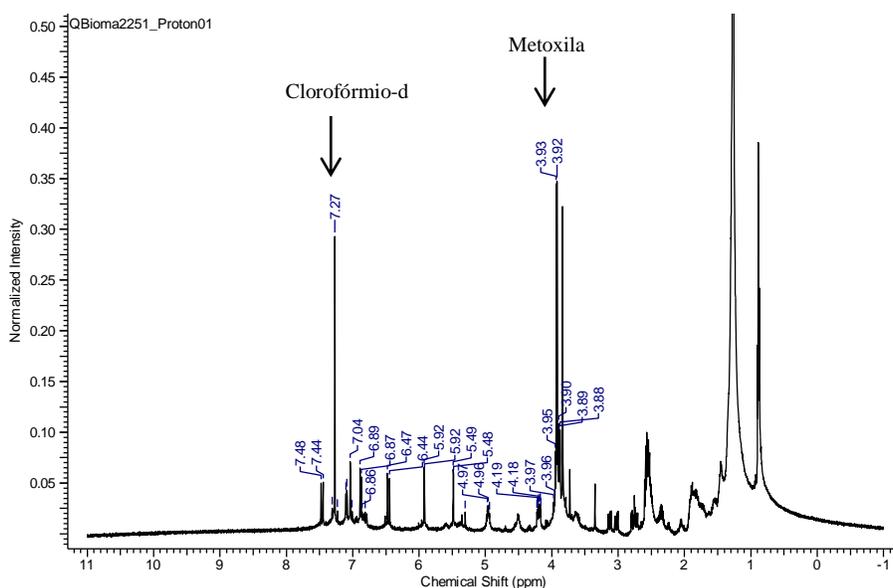


Figura 71- Espectro de RMN ^1H do alcaloide 5 de massa 288

Na tabela 26 estão apresentados os dados dos espectros de ^1H do alcaloide 5.

Posição	(^1H) ^a
2	—
3	—
5	—
6	5,92
7	—
8	—
9	7,48
10	—
11	7,44
12	7,51
13	—
14	—
15	5,48- 5,92 (2H)
16- OMe	3,92 (3H, s)

Tabela 26- Dados de RMN de ^1H experimental em CDCl_3 do alcaloide 5.

Este é o primeiro estudo de isolamento envolvendo tais alcaloides no gênero *Aniba* e na espécie *Aniba panurensis*. Em um estudo mais aprofundado, análises de espectrometria de massas de alta resolução juntamente com de rotação óptica $[\alpha]_D$ são necessários para confirmar estes dados preliminares.

Na literatura foram encontrados dois registros de estudos envolvendo isolamento de alcaloides indólicos em gêneros de Lauraceae. Aguiar *et al.*, (1980), isolaram de *Aniba santalodora* (Lauraceae) o alcaloide 1-p-hidroxibenzil-6-metóxi- β -carbolina (figura 72A), sendo este o único estudo envolvendo isolamento de alcaloide do gênero *Aniba*. Wong *et al.*, (2011) isolaram de *Neolitsea daibuensis* Kamikoti (Lauraceae) três alcaloides indólicos: 1-(4-hidroxibenzil)-3-metoxi-9h-pirido[3,4-*b*] indol-6-ol (figura 72B), (6-hidroxi-3-metoxi-9h-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)(4-hidroxipenil) metanona (figura 72C) e 1-(4-hidroxibenzil)-3-metoxi-9h-pirido[3,4-*b*]indol-5,6-diol (figura 72D). Da espécie *Ocotea minarum* (GARCEZ *et al.*, 2005) foi isolado o alcaloide indolico triptofol-5-o- β -d-glicopiranosídeo (figura 72E).

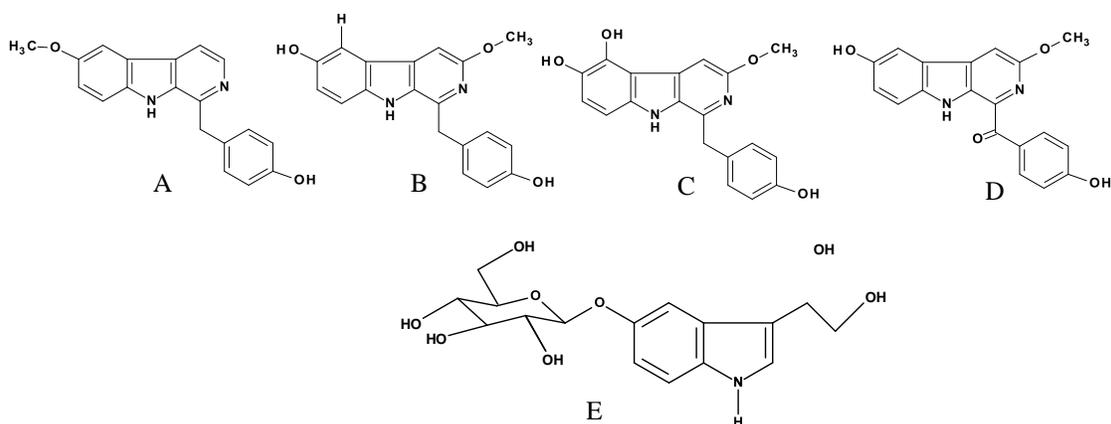


Figura 72- Alcaloides indólicos isolados de gêneros de Lauraceae

5.8. BIOENSAIOS

5.8.1 Atividade antioxidante

a) Ensaio qualitativo

O ensaio qualitativo realizado em placa de CCD, utilizando a solução de DPPH• em metanol, é uma avaliação preliminar da varredura de radicais livres presentes em uma determinada matriz. Na sua forma estável, esse radical apresenta coloração violeta, mas na presença de doadores de hidrogênio, como os antioxidantes, este se reduz mudando sua coloração para amarelo devido ao decréscimo na absorvância (YAMAGUCHY, 1998). Assim, verificou-se que tanto os extratos quanto as frações alcaloídicas das sete espécies de Lauraceae investigadas no presente trabalho apresentaram resultado positivo comparados com o padrão quercetina, sugerindo a presença de substâncias com possíveis atividades antioxidantes, como pode ser observado na figura 73.

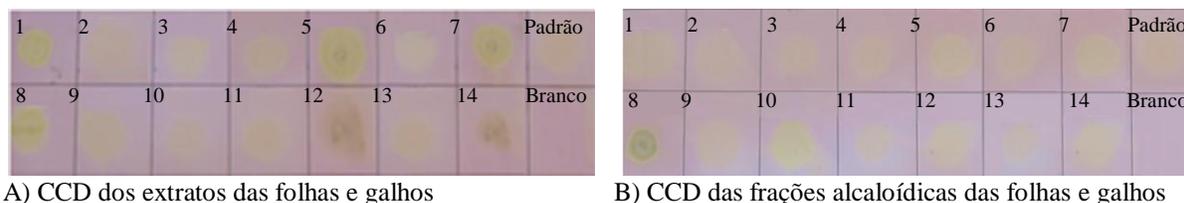


Figura 73- Placa cromatográfica dos extratos e frações alcaloídicas das folhas e galhos das espécies de Lauraceae e do padrão quercetina após a adição da solução de DPPH.

b) Ensaio quantitativo (DPPH• e ABTS^{•+})

Para a quantificação da varredura de radicais livres, utilizou-se nesse trabalho os métodos DPPH• e ABTS^{•+}. Estes consistem em ensaios colorimétricos em soluções com espécies radicalares estáveis, tais como o radical DPPH• e o cátion radical ABTS^{•+}. Na

tabela 27 é apresentada a concentração inibitória (CI₅₀) dos extratos e frações alcaloídicas adquirida por meio dos métodos em questão.

Espécie	Parte analisada	DDPH	ABTS
		CI ₅₀ ± dp (µg.mL ⁻¹)	CE ₅₀ ± dp (µg.mL ⁻¹)
<i>A. panurensis</i>	Extrato/ Folhas	68,47 ± 0,82	43,62 ± 0,62
	Extrato/ Galhos	62,87 ± 2,84	11,05 ± 0,63
	FA/ Folhas	> 50	> 50
	FA/ Galhos	91,82 ± 1,20	69,83 ± 2,72
<i>A. guianensis</i>	Extrato/ Folhas	-	61,38 ± 2,61
	Extrato/ Galhos	20,56 ± 2,25	17,07 ± 0,90
	FA/ Folhas	47,17 ± 1,27	55,37 ± 2,12
	FA/ Galhos	53,38 ± 0,56	38,43 ± 1,27
<i>A. ferrea</i>	Extrato/ Folhas	24,97 ± 7,62	53,67 ± 4,73
	Extrato/ Galhos	12,18 ± 0,64	14,14 ± 2,00
	FA/ Folhas	72,75 ± 1,29	66,07 ± 7,03
	FA/ Galhos	33,35 ± 6,95	60,16 ± 2,57
<i>A. parviflora</i>	Extrato/ Folhas	89,48 ± 1,32	52,45 ± 0,48
	Extrato/ Galhos	14,09 ± 0,14	39,00 ± 1,41
	FA/ Folhas	> 50	> 50
	FA/ Galhos	63,54 ± 4,85	60,93 ± 2,71
<i>L. martiniana</i>	Extrato/ Folhas	47,63 ± 4,69	36,52 ± 0,40
	Extrato/ Galhos	13,23 ± 1,64	9,45 ± 0,26
	FA/ Folhas	> 50	> 50
	FA/ Galhos	> 50	> 50
<i>L. canella angustata</i>	Extrato/ Folhas	47,05 ± 3,32	23,69 ± 4,60
	Extrato/ Galhos	55,92 ± 5,67	36,73 ± 3,56
	FA/ Folhas	33,27 ± 5,82	37,37 ± 2,53
	FA/ Galhos	> 50	> 50
<i>O.leucoxydon</i>	Extrato/ Folhas	> 50	34,75±3,63
	Extrato/ Galhos	18,17±0,256	35,51±3,93
	FA/ Folhas	> 50	13,30 ± 5,7
	FA/ Galhos	39,34±9,7794	18,17±0,25
		6,65 ± 0,14	8,95 ± 0,07
		Quercetina	Ácido gálico

Legenda: DP = desvio padrão; FA= fração alcaloídica.

Tabela 27- Atividade antioxidante qualitativa e quantitativa (CE₅₀ ± DP) de extratos etanólicos e frações alcaloídica de sete espécies de Lauraceae pelos métodos DPPH[•] e ABTS^{•+}.

Para a varredura de radicais livres pelo método de DPPH[•] foi verificado que os melhores resultados para os extratos brutos foram os provenientes dos galhos da espécie *A. ferrea* (12,18 µg/mL), galhos de *A. martiniana* (13,23 µg/mL) e galhos de *A. parviflora* (14,09 µg/mL). No método envolvendo o cátion radical ABTS^{•+}, os resultados mais expressivos foram para os extratos brutos oriundos dos galhos de *L. martiniana* (9,45 µg/mL), *A. panurensis* (11,05 µg/mL) e galhos de *A. ferrea* (14,09 µg/mL).

Verificando os extratos provenientes dos galhos das espécies *A. ferrea* (CI₅₀ 12,18 µg/mL para folhas e 14,14 µg/mL para galhos) e de *L. martiniana* (CI₅₀ 13,23 para folhas e 9,45 µg/mL para galhos), percebeu-se que estes apresentaram resultados similares de varredura nos dois métodos testados, sendo que a primeira espécie apresentou o melhor resultado entre todos os extratos testados para o método DPPH[•] (12,18 µg/mL) e a segunda espécie exibiu melhor resultado para o método ABTS^{•+} (9,45 µg/mL).

A concentração inibitória (CI₅₀) pelo método DPPH[•] dos extratos etanólicos das folhas e galhos das espécies *A. panurensis*, *L. canella angustata* e *L. martiniana* descrita no trabalho de Yamaguchi *et al.*, (2012), foram superiores aos encontrados nesse estudo tanto para as folhas (14,370 µg/mL, 15,029 µg/mL e 11,168 µg/mL, respectivamente, contra 68,47 µg/mL, 47,05 µg/mL e 47,63 µg/mL, encontrados nesse estudo) quanto para os galhos (27,586 µg/mL; 29,349 µg/mL e 6,956 µg/mL, respectivamente, contra 62,87 µg/mL, 55,92 µg/mL e 13,23 µg/mL, para esse trabalho).

Entretanto, o método de extração utilizado foi por maceração a frio durante 72 horas e neste trabalho foi sonicação três vezes por 20 minutos. Isso indica que o método por maceração é mais seletivo, tendo em vista que o material vegetal fica mais em contato com o solvente e conseqüentemente consegue-se extrair maior quantidade de constituinte químico do que o método por sonicação. Também foram comparados com o trabalho de

Yamaguchi *et al.*, (2012), os valores do CI_{50} pelo método de DPPH^{*} dos extratos etanólicos das folhas e galhos da espécie *O. leucoxydon*. Para as folhas dessa espécie o resultado seguiu o mesmo padrão das outras três espécies citadas anteriormente (*A. panurensis*, *L. canella angustata* e *L. martiniana*). No entanto, o resultado do CI_{50} para os galhos de *O. leucoxydon* foi bem mais expressivo (18,17 µg/mL) em comparação com o de Yamaguchi *et al.*, (2012) (50,88 µg/mL).

O resultado da atividade antioxidante pelo método DPPH^{*} dessa mesma espécie supracitada (*O. leucoxydon*) foi comparado com o resultado de Casian *et al.*, (2010). Eles avaliaram o potencial antioxidante pelo método DPPH^{*} de extratos aquosos e hidroalcoólicos da espécie de *Ocotea odorifera*, da mesma da família (Lauraceae) e do mesmo gênero (*Ocotea*), utilizando para a obtenção desses extratos maceração a frio por 4 ciclos de 24h em ambos os casos.

Neste estudo de Casian *et al.*, (2010), observou-se claramente que a forma de obtenção do extrato influencia na capacidade antioxidante do mesmo, visto que a correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração do extrato utilizado forneceu um CI_{50} de 0,22 mg/mL para o extrato hidroalcoólico e CI_{50} de 0,44 mg/mL para o extrato aquoso, que é a concentração do extrato necessária para causar 50% de atividade antioxidante. Assim, o extrato aquoso necessita do dobro de concentração para obter a mesma atividade antioxidante.

Comparando esses resultados com padrões de referência como o ácido ascórbico ($CI_{50} = 0,002$ mg/mL), pode-se observar que estas concentrações foram elevadas. Como citado anteriormente, para a espécie *Ocotea leucoxydon*, obteve-se um CI_{50} de 18,17 µg/mL utilizando sonicação 3 vezes de por 20 minutos como método de extração. Comparando esse resultado com o padrão quercetina (6,65 µg/mL), observou-se que tal resultado foi

mais expressivo que o de Casian *et al.*, (2010), sugerindo maior potencial antioxidante em nossos extratos.

Como visto, a diferença de resultados observados entre o presente trabalho e os resultados obtidos por Yamaguchi *et al.*, (2012) e Casian *et al.*, (2010), provavelmente poderá ser explicada pela diferença do método de extração utilizado. Nesse sentido, SCHWARZ *et al.*, (2001), destacam a importância de desenvolvimento de procedimentos de extrações como importantes ferramentas para obtenção de antioxidantes provenientes de fontes naturais.

Por isso, determinados extratos que não apresentaram bom potencial antioxidante em DPPH* poderão mostrar bom perfil antioxidante em outros tipos de testes dessa mesma atividade, utilizando outras metodologias (BOSCOLO *et al.*, 2007).

Em relação às frações alcaloídicas, utilizando o método de DPPH, verificou-se que na maioria das frações testadas os resultados foram pouco expressivos, visto que o melhor resultado foi para as folhas de *L. canella angustata* (33,27 µg/mL), seguido da fração oriunda dos galhos de *A. ferrea* (33,35 µg/mL).

No método envolvendo o cátion radical ABTS^{•+}, o resultado mais relevante foi para os as folhas de *L. canella angustata* (37,37 µg/mL) e galhos de *A. guianensis* (38,43 µg/mL). Estes dados sinalizam que a atividade antioxidante observada nos extratos mencionados anteriormente não apresentou relação direta com a presença de alcaloides, o que pode sugerir que a capacidade antioxidante dos extratos pode estar associada a outros compostos presentes na matriz vegetal das espécies estudadas.

No trabalho de dissertação de Yamaguchi, (2011), foi observada uma correlação positiva entre o teste para a atividade sequestrante do radical livre e a presença de fenóis nos extratos de sete espécies de Lauraceae (*Endlicheria citriodora*, *Endlicheria sericea*,

Ocotea ceanothifolia, *Ocotea leucoxylon*, *Ocotea minor*, *Rhodostemonodaphne crenaticupula* e *Rhodostemonodaphne recurva*) evidenciados por meio da prospecção fitoquímica, o que pode sugerir que, neste caso, a capacidade antioxidante dos extratos pode estar associada aos compostos fenólicos, visto que os extratos com CI_{50} inferiores a concentração de 55,11 $\mu\text{g/mL}$ indicaram a presença de compostos fenólicos em todos os extratos.

Em outros três trabalhos também foram verificadas correlações similares. Souza *et al.* (2007), Tiveron (2010) e Oliveira (2010) observaram a correlação entre a ação sequestradora de radicais livres e a presença de altos teores de compostos fenólicos, evidenciadas pelo método de Folin-Ciocalteu, expressos como Equivalentes de Ácido Gálico (EAG). Essa correlação pode ser explicada pelo fato de os compostos fenólicos estarem entre os antioxidantes mais conhecidos juntamente com as vitaminas.

Por outro lado, a literatura relata que entre os vários agentes oxidantes existentes está a apomorfina, um alcaloide semissintético de estrutura catecólica, capaz de formar radicais semiquinonas e quinonas (GARRIDO *et al.*, 2002). Nasrullahe *et al.*, 2013, isolaram quatro alcaloides das cascas de *Cryptocarya nigra* (Lauraceae), dos quais N-metilisococlorina e aterosperminina, mostraram alta atividade antioxidante no ensaio com o radical de DPPH•, com valores de CI_{50} de 29,56 $\mu\text{g/mL}$ e 54,53 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses relatos sugerem que a atividade antioxidante em uma matriz vegetal pode também estar relacionada à presença de alcaloides.

Neste ensaio de varredura de radicais livres pelo método do DPPH• e ABTS⁺⁺ envolvendo sete espécies de Lauraceae da Amazônia, foram obtidos excelentes resultados tanto para o radical DPPH•, como foi o caso dos extratos brutos oriundos de galhos da espécie *A. ferrea* (CI_{50} 12,18 $\mu\text{g/mL}$), galhos de *A. martiniana* (CI_{50} 13,23 $\mu\text{g/mL}$) e galhos

de *A. parviflora* (CI₅₀ 14,09 µg/mL) que alcançaram valores próximos do padrão quercetina (CI₅₀ 6,65 µg/mL), quanto para o cátion radical ABTS•+, como foi o caso dos extratos brutos oriundos dos galhos de *L. martiniana* (CI₅₀ 9,45 µg/mL), *A. panurensis* (CI₅₀ 11,05 µg/mL) e galhos de *A. ferrea* (CI₅₀ 14,09 µg/mL) com resultados próximo ao padrão ácido gálico (CI₅₀ 8,95 µg/mL). Assim, este ensaio serve como ponto de partida para estudos posteriores como o isolamento, purificação e elucidação estrutural das substâncias que funcionam como antioxidantes para fins terapêuticos.

5.8.2 Atividade antimicrobiana

Segundo Souza *et al.*, (2003), as propriedades microbiostáticas e microbiscidas de produtos vegetais têm sido comprovadas graças às pesquisas intensivas em todo o mundo. Geralmente, tais propriedades são estudadas, avaliadas e confirmadas por meio de ensaios biológicos *in vitro* em testes de sensibilidade, como foi o realizado no presente estudo.

Para este ensaio foram utilizadas 35 bactérias, sendo 13 Gram-positivas e 22 Gram-negativas testadas frente às sete espécies alvo deste estudo incluindo extrato bruto, fração alcaloídicas e substâncias isoladas. Considerou-se como atividade antimicrobiana a presença de halo de inibição de crescimento de tamanho aleatório, por não existir um padrão de comparação dos resultados. Assim, das sete espécies pertencentes aos três gêneros distintos da família Lauraceae submetidas á varredura preliminar, apenas uma espécie, do gênero *Aniba* (*A. panurensis*), apresentou atividade contra seis bactérias das trinta e cinco testadas. É possível que as outras espécies avaliadas não possuam efeito antimicrobiano ou que o extrato dessas plantas contenha constituintes antibacterianos em

concentrações não suficientes para ser considerado efetivo na concentração utilizada. Entretanto, novos testes devem ser conduzidos utilizando outras espécies bacterianas e cepas padronizadas para comprovação da ausência de atividade antimicrobiana dos extratos dessas espécies.

Das seis bactérias sensíveis ao extrato, fração alcaloídica e alcaloide isolado da espécie *A. panurensis*, cinco são Gram-positivas e apenas uma é Gram-negativa. Isso pode ser justificado devido à diferença de constituição da parede celular bacteriana entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, as quais residem, principalmente, nas suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície (TRABULSI, 2008).

O potencial antimicrobiano foi considerado semelhante tanto para o extrato etanólico das folhas quanto para o extrato dos galhos de *A. panurensis*, visto que o tamanho dos halos para o extrato etanólico oriundo das folhas variou de 14 a 25 mm para as seis bactérias que apresentaram sensibilidade, e nos galhos variou de 14 a 20 mm, para as mesmas bactérias.

Dessa forma, tanto o extrato etanólico das folhas quanto dos galhos da espécie *A. panurensis* exibiram excelente atividade contra as bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* resistente a metilina, *Staphylococcus sumulans*, *Staphylococcus aureus* e contra a bactéria Gram-negativa *Acinetobacter baumannii*, como pode ser observado na figura 74.

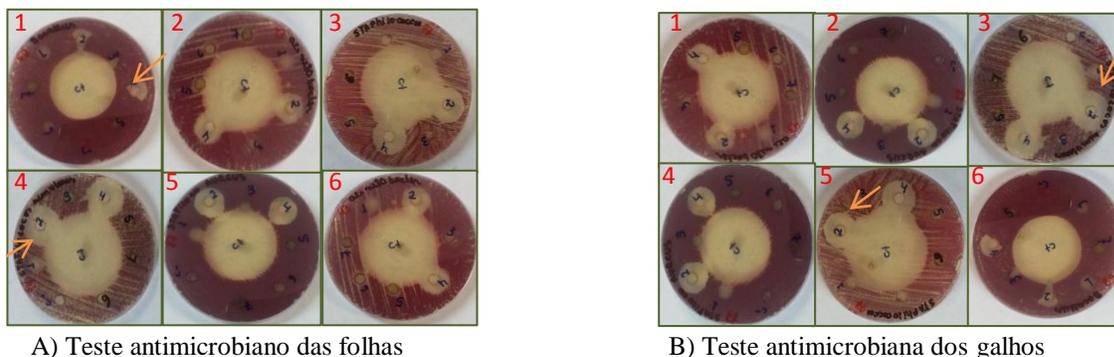


Figura 74- Atividade antimicrobiana das folhas e galhos de *A. panurensis* frente às bactérias: 1) *Bacillus subtilis* 2) *Streptococcus agalactiae* 3) *Staphylococcus* resistente a meticilina 4) *Staphylococcus sumulans* 5) *Staphylococcus aureus* 6) *Acinetobacter baumannii*

A fração alcaloídica proveniente dos galhos de *A. panurensis* apresentou atividade frente às cepas de duas bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis subsp. subtilis* e *Staphylococcus aureus* com halos de inibição medindo 14 e 10 mm, respectivamente (figura 75A). Também foi observado, que a substância isolada dos galhos dessa mesma espécie, apresentou atividade contra 4 bactérias Gram-positivas com halos que variaram de 14 á 20 mm: *Bacillus subtilis subsp. subtilis* (14 mm), *Staphylococcus* resistente a meticilina (20 mm), *Staphylococcus sumulans* (20 mm) e *Staphylococcus aureus* (16 mm) (figura 75B).

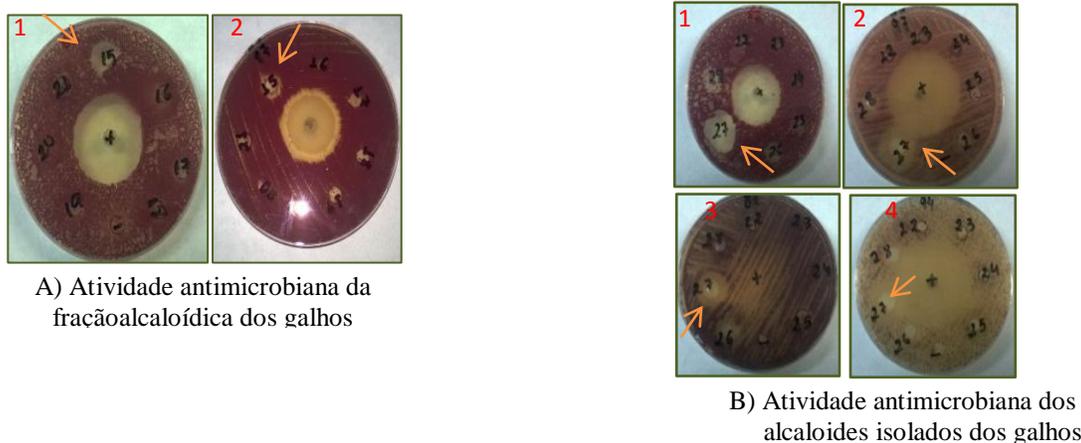


Figura 75- Atividade antimicrobiana da fração alcaloídica e substância isolada dos galhos de *A. panurensis* frente às bactérias: A) 1) *Bacillus subtilis* 2) *Staphylococcus aureus*; B) 1) *Bacillus subtilis* 2) *Staphylococcus* resistente a meticilina 3) *Staphylococcus sumulans* 4) *Staphylococcus aureus*.

Os resultados preliminares de rastreio de atividade antimicrobiana realizado em duplicata estão sumarizados na tabela 28.

Espécie / concentração	Bactéria	Replicata 1 (mm)	Antibiótico (IMP)	Replicata 2 (mm)	Antibiótico (IMP)	Nº e % de cepas sensíveis
<i>A. panurensis</i> (folhas) 5 mg/mL	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> (CT)	14	40	14	40	6/35 (17,14%)
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	20	25	20	25	
	<i>Staphylococcus</i> resistente a meticilina	20	30	17	30	
	<i>Staphylococcus sumulans</i>	21	45	25	45	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	17	29	20	30	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	17	10	15	10	
<i>A. panurensis</i> (galhos) 5 mg/mL	<i>Bacillus subtilis sub sp. Subtilis</i> (CT)	15	40	14	40	
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	20	25	20	25	
	<i>Staphylococcus</i> resistente a meticilina	18	30	19	30	
	<i>Staphylococcus sumulans</i>	23	45	20	45	
	<i>Staphylococcus Aereus</i>	16	29	17	30	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	15	10	15	10	
<i>A. panurensis</i> fração alcooídica (galhos) 5 mg/mL	<i>Bacillus subtilis sub sp. subtilis</i> (CT)	14	40	14	40	2/35 (5,71%)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	29	10	29	
<i>A. panurensis</i> dos Alcaloides isolados (galhos) 1 mg/mL	<i>Bacillus subtilis sub sp. subtilis</i> (CT)	20	40	20	40	4/35 (11,43%)
	<i>Staphylococcus</i> resistente a meticilina	20	40	20	40	
	<i>Staphylococcus sumulans</i>	20	43	20	43	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	16	29	16	29	

Tabela 28- Resultado da atividade antimicrobiana de extratos, frações e substância isolada da espécie *A. panurensis*

A concentração inibitória mínima (CIM₅₀) obtida para os extratos etanólicos das folhas e galhos e da substância isolada dos galhos de *A. panurensis*, foi avaliada a partir de cinco concentrações diferentes: 5,0 mg/L, 2,5 mg/L, 1,25 mg/L e 0,6 mg/L, como pode ser observado na tabela 30.

Concentração Inibitória Mínima (MIC ₅₀)						
Produtos testados	<i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i>	<i>Staphylococcus</i> resistente a metilicina	<i>Staphylococcus sumulans</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Acinetobacter Baumannii</i>
Extrato EtOH (folhas <i>A. panurensis</i>)	0,6 mg/mL	0,6 mg/mL	0,6 mg/ml	1,25 mg/mL	2,5 mg/mL	2, 5 mg/mL
Extrato EtOH (galhos <i>A. panurensis</i>)	0,6 mg/mL	0,6 mg/mL	0,6 mg/mL	1,25 mg/mL	2,5 mg/mL	2, 5 mg/mL
Substância isolada (galhos de <i>A. panurensis</i>)	0, 6 mg/mL	0,6 mg/mL	0,6 mg/mL	0,6 mg/mL	0,6 mg/mL	0,6 mg/mL

Tabela 29- Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM₅₀) dos extratos etanólicos das folhas e galhos e substâncias isoladas de *A. panurensis*

Nos extratos das folhas e galhos verificou-se que contra as cepas de *Bacillus subtilis subsp. subtilis* (CT) ATCC 6051, *Staphylococcus sumulans* ATCC 27851 e *Staphylococcus* resistente a metilicina, a concentração mínima foi de 0,6 mg/mL. Frente a *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 foi de 1,25 mg/mL e contra as cepas *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606-143 e *Staphylococcus aureus* ATCC 80958 obteve-se a concentração mínima de 2,5 mg/mL. Para os alcaloides isolados, verificou-se que a concentração mínima foi de 0,6 mg/mL.

São raros os relatos na literatura sobre testes biológicos envolvendo espécies da família Lauraceae, como por exemplo, testes antimicrobianos. Dos poucos estudos encontrados, visando avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de espécies pertencentes a essa família, todos estão relacionados com o gênero *Ocotea*. Assim sendo, este é o primeiro estudo em que foi realizada uma varredura da atividade antimicrobiana em extratos e frações alcaloídicas para espécies pertencentes aos gêneros *Aniba* e *Licaria* (*A. panurensis*, *A. ferrea*, *A. parviflora*, *Licaria martiniana* e *Licaria canella angustata*).

Souza *et al.*, (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de várias espécies de plantas, inclusive de *Ocotea odorífera* (Lauraceae). Eles observaram que na concentração de 50 mg/mL, o extrato em metanol de *O. odorífera* foi efetivo frente as cepas de *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Saccharomyces cerevisiae*, com halos que variaram de 8 a 11 mm. Contra as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*, os extratos não apresentaram atividade.

Em contrapartida, não foi verificada atividade antimicrobiana para a espécie desse mesmo gênero investigada no presente estudo (*Ocotea leucoxylon*). Por outro lado, frente as cepas de duas bactérias (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), utilizadas no trabalho supracitado de Souza *et al.* (2004), a espécie pertencente ao gênero *Aniba* (*A. panurensis*), exibiu resultados mais eficientes (com halos medindo entre 14 a 17mm) em uma concentração inferior (6 mg/mL).

Antunes *et al.* (2006) testaram a atividade antimicrobiana do extrato de *Ocotea duckei* na concentração de 0,2 mg/mL frente a cepas da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e cepas das bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Eles verificaram que o extrato etanólico de *O. duckei* apresentou atividade sobre 6 (50%) das cepas de *S. aureus* testadas (com halos de inibição que

variaram de 7 a 10 mm de diâmetro). Comparando esse resultado com os encontrados no presente estudo, para cepas de *Staphylococcus aureus*, observou-se que a inibição causada pelos extratos etanólicos de *A. panurensis*, foi mais relevante (com halos que variaram de 16 a 17 mm), porém em uma concentração mais elevada (5 mg/mL). Assim, como no trabalho de Antunes *et al.* (2006), em nosso trabalho não foi observada atividade antimicrobiana para cepas das bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os extratos etanólicos de *Ocotea bracteosa* (louro pinho) e *Ocotea gardenri* (louro branco), foram investigadas por Silveira *et al.*, (2011) quanto à atividade antibacteriana frente as cepas de quatro tipos de bactérias, sendo que duas das espécies testadas foram também utilizadas no presente trabalho: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O resultado indicou que o extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *O. gardenri* apresentou potencial atividade antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus* (na concentração de 5 mg/mL impregnados em disco de papel de 11 mm). Verificou-se que para os extratos de *A. panurensis*, frente a essas duas bactérias, os halos foram de 17 e 16 mm para folhas e galhos, respectivamente, em uma concentração de 5 mg/mL. Não foi observada atividade para as cepas de *Escherichia coli*, concordando com o resultado de Silveira *et al.*, (2011).

Observando a tabela 24, é possível notar que a fração alcaloídica oriunda dos galhos de *A. panurensis* foi eficaz frente às cepas das bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* com halos medindo 14 e 10 mm, respectivamente. Como se trata de uma fração rica em alcaloides é possível que tal atividade seja causada por alcaloides presentes em tal fração. Verificou-se também, que a substância isolada, apresentou excelente atividade frente as cepas de quatro bactérias: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*

resistente a metilina, *Staphylococcus sumulans*, e *Staphylococcus aureus*, com halos que variaram de 16 a 20 mm.

Na literatura foram encontrados estudos de atividade antimicrobiana relacionada aos alcaloides. Lima (2006) comprovou a atividade antimicrobiana de *O. odorifera* em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Escherichia Coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Omar *et al.*, (2013) isolaram um alcaloide oxoaporfínico (lisicamina) e três proaporfínicos das folhas da espécie *Phoebe grandis* (Lauraceae). Eles verificaram que o alcaloide lisicamina apresentou forte atividade antibacteriana em uma concentração de 1 mg/mL contra as cepas de três bactérias, sendo que duas delas também foram avaliadas em nosso trabalho: *Bacillus subtilis* (15,50 mm de halo) e *Staphylococcus aureus* (13,33 mm de halo). Diante desse resultado, verificou-se que o alcaloide isolado dos galhos de *A. panurensis* apresentou atividade mais eficaz, visto que os halos de inibição foram de 16 a 20 mm para *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente, na mesma concentração testada por Omar *et al.*, (2013).

No estudo de Pabon & Cuca (2010), foram isolados quatro alcaloides aporfínicos da espécie *Ocotea macrophylla*, sendo que um deles, 3-metóxi-nordomesticina, apresentou atividade antimicrobiana para duas das quatro bactérias testadas: *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, em uma concentração de 0,5 mg/mL, com halos de 3 mm frente a bactéria *Staphylococcus aureus*. Contra essa mesma bactéria constatou-se um resultado mais expressivo em nosso trabalho, visto que foi verificado um halo de 16 mm frente ao alcaloide isolado de *A. panurensis*, mesmo em uma concentração duas vezes maior.

Klausmeyer *et al.*, (2004) isolaram o alcaloide 6,8-dideca-(1Z)-enil-5,7-dimetil-2,3-diidro-1H-indolizinium a partir da espécie *Aniba panurensis*, a mesma espécie

investigada nesse estudo. Tal alcaloide foi testado frente as bactérias *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, foi observada uma inibição potente (CIM₅₀ equivalente a 0,25 µg/mL) somente contra *Candida albicans*. Frente a bactéria *Staphylococcus aureus*, a inibição não foi considerada eficaz, ao contrário do presente trabalho em que o CIM₅₀ (0,5 mg/mL) foi considerado um bom resultado.

Mediante as comparações com outros estudos encontrados na literatura, este ensaio sinaliza que nas condições adotadas, a espécie *Aniba panurensis* apresentou um excelente potencial antimicrobiano. Esses achados preliminares, porém promissores nos levam a intensificação de estudos complementares futuros que permitam investigações mais minuciosas em busca de possíveis substâncias eficazes no controle da resistência aos antibióticos.

5.8.3 Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais

As porcentagens de inibição causada pelos extratos e frações alcaloídicas das 7 espécies alvos desse estudo e também pelo alcaloide de *m/z* 273 isolado de *A. panurensis* frente às sete linhagens de células testadas, 6 linhagens de células neoplásicas (HT1080- fibrosarcoma humano, HCT116- cólon- humano, MCF-7- mama humano, ACP02- adenocarcinoma gástrico, SKIMEL3 e SKIMEL9- melanomas) e uma linhagem de célula normal (MRC5- fibroblastos de pulmão humano), está apresentado na tabela 30. Os resultados relacionados à linhagem SKAMEL3 não foram apresentados, uma vez que houve proliferação das células neoplásicas. De forma geral, o percentual de inibição mais elevado foi observado para o extrato dos galhos da espécie *A. panurensis* que matou 94,65

% das células pertencentes à linhagem MRC5 (fibroblasto de pulmão- linhagem de células normais) e o resultado menos expressivo foi para a fração alcaloídica oriunda da espécie *A. ferrea* frente à mesma linhagem causando inibição de apenas 0,07 % das células.

Nos extratos, a variação para a linhagem HT1080 foi de 12,42% (folhas de *A. guianensis*) a 74,72% (galhos de *A. panurensis*). Na linhagem HCT116 a variação foi entre 16,88% (*A. parviflora*) a 89,98% (galhos de *A. panurensis*). Para a linhagem MCF7 foi observada a variação entre 13,89% (folhas de *A. guianensis*) e 91,27% (galhos de *A. panurensis*). Verificou-se uma variação de 10,36% (folhas de *L. martiniana*) a 94,65% (galhos de *A. panurensis*) para a linhagem MRC5 referente às células normais. Para a linhagem ACP02 a variação foi de 11,98% (folhas de *L. canella angustata*) a 86,61% (galhos de *A. panurensis*). Para SKAMEL9, a variação foi entre 14,69% (folhas de *L. martiniana*) a 57,32% (galhos de *A. ferrea*).

		HT1080	HCT116	MCF7	MRC5 (normal)	ACP02	SKAMEL 9
Espécie	Parte analisada	% morte celular	% morte celular	% morte celular	% morte celular	% morte celular	% morte celular
<i>A. panurensis</i>	Isolado	8,53	8,46	3,41	3,57	9,39	8,36
	Extrato-Folhas	65,24	46,04	70,45	41,70	39,52	33,08
	Extrato-Galhos	74,73	89,98	91,28	94,65	86,61	64,99
	FA -Folhas	33,67	18,25	48,69	10,13	13,79	8,11
	FA- Galhos	28,69	22,31	52,79	16,89	17,47	15,69
<i>A. guianensis</i>	Extrato-Folhas	12,42	26,47	13,89	18,24	17,49	21,13
	Extrato-Galhos	67,83	34,68	46,52	36,29	20,20	25,81
	FA- Folhas	4,96	11,07	20,67	5,752	9,011	11,34
	FA-Galhos	19,03	14,43	20,79	7,85	8,08	11,87
<i>A. ferrea</i>	Extrato-Folhas	71,46	46,44	70,60	45,43	23,60	30,78
	Extrato-Galhos	72,30	85,07	88,79	84,12	50,05	57,32
	FA-Folhas	11,09	11,99	14,57	7,18	6,88	10,55
	FA-Galhos	17,59	8,71	27,51	0,08	2,28	2,87
<i>A. parviflora</i>	Extrato-Folhas	43,01	16,88	50,36	14,41	13,53	23,92
	Extrato-Galhos	73,54	78,38	84,94	76,61	45,31	53,61
	FA- Galhos	28,00	15,53	25,71	10,18	10,01	13,68
<i>L. martiniana</i>	Extrato-Folhas	36,75	17,79	39,37	10,36	13,35	14,69
	Extrato-Galhos	69,84	65,33	78,90	61,83	39,61	32,21
	FA-Folhas	14,78	13,69	4,83	4,34	5,01	12,39
	FA-Galhos	28,30	30,88	26,86	8,77	13,59	23,84
<i>L. canella angustata</i>	Extrato-Folhas	49,17	23,45	38,66	16,56	11,99	26,89
	Extrato-Galhos	37,84	32,09	42,36	16,77	17,45	20,39
	FA- Folhas	22,08	41,97	52,38	24,15	15,76	19,15
	FA-Galhos	28,19	20,84	36,61	10,98	11,48	13,67
<i>O. leucoxylon</i>	Extrato-Folhas	22,47	30,84	33,62	21,39	24,04	35,66
	Extrato-Galhos	25,37	27,49	37,81	20,34	21,01	28,76
	FA-Folhas	18,16	21,12	23,52	18,11	19,75	27,71
	FA-Galhos	21,61	23,09	33,71	19,99	24,51	27,76

Legenda: FA=fração alcaloídica 0%: sem atividade; 1 – 50%: pouca atividade; 51 – 75%: atividade moderada; 76 – 100%: atividade alta.

Tabela 30- Percentual de inibição para extratos etanólicos, frações alcaloídicas substância isolada sete espécies de Lauraceae contra seis linhagens de células tumorais: HT1080 (fibrosarcoma humano), HCT116 (côlon - humano), MCF-7 (mama - humano), MRC5 (fibroblastos de pulmão humanos), ACP02 (adenocarcinoma gástrico) e SKIMEL 9 (Melanomas).

Nas frações alcaloídicas, observou-se uma variação de 4,96% (folhas de *A. guianensis*) a 33,66% (folhas de *A. panurensis*) para a linhagem HT1080. Já para a linhagem HCT116 a variação observada foi entre 8,70% (galhos de *A. ferrea*) e 41,97% (folhas de *L. canella angustata*). Verificou-se que para a linhagem MCF7 a variação ocorreu de 4,83% (folhas de *L. martiniana*) a 52,79% (galhos de *A. panurensis*). Na linhagem MRC5, referente às células normais, a percentagem de inibição foi de 0,07% (galhos de *A. ferrea*) a 24,15% (folhas de *L. canella angustata*). Foi observada que para a linhagem ACP02 a variação foi de 2,28% (galhos de *A. ferrea*) a 24,51% (galhos de *O. leucoxylon*). Para a SKAMEL9, a variação ocorreu 2,86% (galhos de *A. ferrea*) a 27,76% (galhos de *O. leucoxylon*).

No alcaloide isolado proveniente dos galhos da espécie *A. panurensis*, o percentual de inibição foi de 8,53%, 8,46%, 3,40%, 3,57%, 9,38% e 8,35% para as linhagens HT1080, HCT116, MCF7, MRC5, ACP02 e SKAMEL9 respectivamente.

Na espécie *A. panurensis*, foi observado que o extrato dos galhos foi mais ativo que o extrato das folhas na inibição de todas as linhagens testadas, sendo que contra quatro linhagens (HCT116, MCF7, MRC5 e ACP02) a inibição causada pelo extrato dos galhos foi acima de 85%. Destes, o mais elevado foi de 94,65% frente à linhagem MRC5, o que indica que, na concentração testada, esse extrato é tóxico para a linhagem de células normais.

Comparando extratos, frações alcaloídicas e alcaloide isolado da espécie *A. panurensis*, notou-se que houve uma inibição mais expressiva dos extratos das folhas e dos galhos em relação às frações alcaloídicas oriundas desses mesmos órgãos em todas as linhagens testadas. O potencial de inibição do alcaloide isolado da espécie em discussão também foi bem inferior ao do extrato em todos os casos, com um percentual de inibição

abaixo de 10% para todas as linhagens, o que é considerado um resultado baixo, como pode ser observado na figura 76.

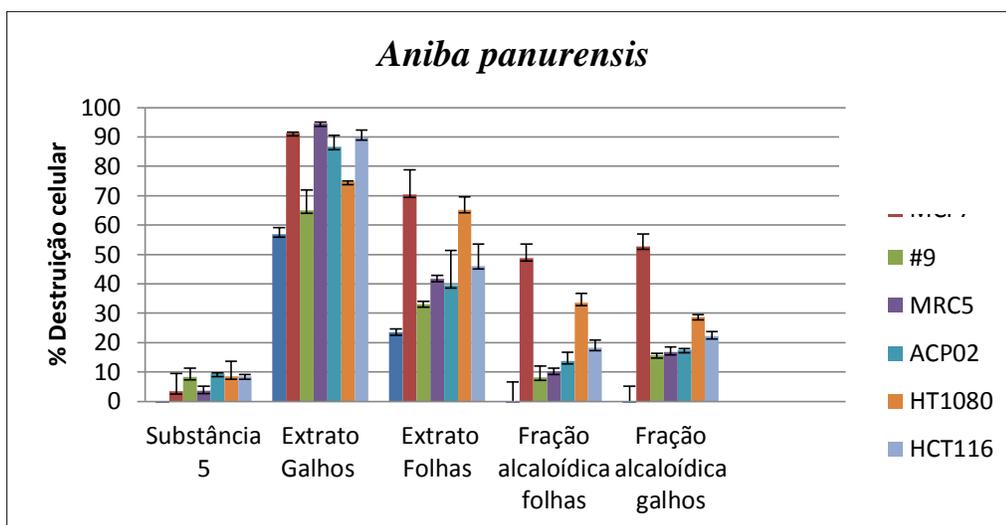


Figura 76- Inibição dos extratos brutos e frações alcaloídicas de *A. panurensis* frente a sete linhagens de células testadas.

Resultado semelhante foi verificado na espécie *A. guianensis*, onde houve maior atividade citotóxica dos extratos das folhas e galhos em relação às frações alcaloídicas correspondentes. Apenas em uma linhagem a destruição celular causada pela fração alcaloídica foi maior que a do seu extrato de origem: na linhagem MCF7 (em que o extrato das folhas inibiu 13,89%, enquanto a fração alcaloídica oriunda desse órgão inibiu 20,66%). Todos os extratos apresentaram baixa atividade, inferior a 50%, inclusive para a linhagem de células normais MRC5 (18,24% e 36,29% para extrato de folhas e galhos respectivamente), com exceção da linhagem HT1080, visto que o extrato dos galhos exibiu atividade moderada, com inibição de 67,83%. O extrato dos galhos foi mais ativo em todas as linhagens testadas e as frações apresentaram baixa atividade com inibição celular abaixo de 25%. Esses resultados podem ser observados na figura 77.

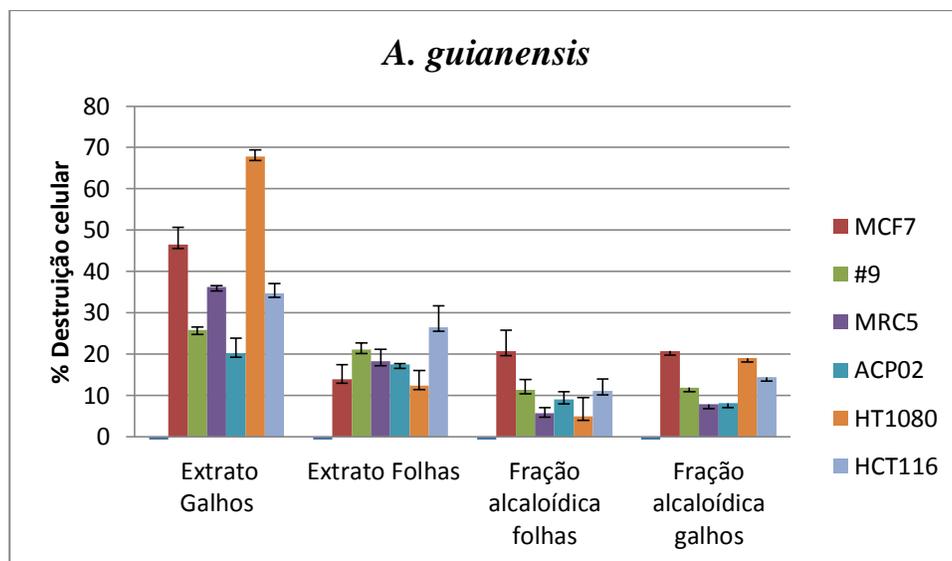


Figura 77- Inibição dos extratos brutos e frações alcaloídicas de *A. guianensis* frente a sete linhagens de células testadas.

O extrato dos galhos da espécie *Aniba ferrea* também foi mais ativo do que o extrato das folhas em todos os casos. Contra três linhagens (HCT116, MCF7 e MRC5), a destruição celular do extrato dos galhos foi elevada (85,07%, 88,79% e 84,12%) e para as outras quatro linhagens a atividade foi moderada (72,30%, 50,05% e 57,32% para as linhagens HT1080, ACP02 e SKAMEL9 respectivamente). Nas folhas a atividade para duas linhagens foi moderada (71,45% e 70,60% para as linhagens HT1080 e MCF7 respectivamente).

Para as outras linhagens a atividade de inibição do extrato das folhas foi considerada baixa (< que 50%). Em todas as linhagens, verificou-se que a atividade citotóxica das frações alcaloídicas foram inferiores a seus extratos brutos de origem e em todos os casos tais frações apresentaram inibição abaixo de 30%, sendo o melhor resultado para a fração dos galhos frente a linhagem MCF7 com 27,51% de inibição (figura 78).

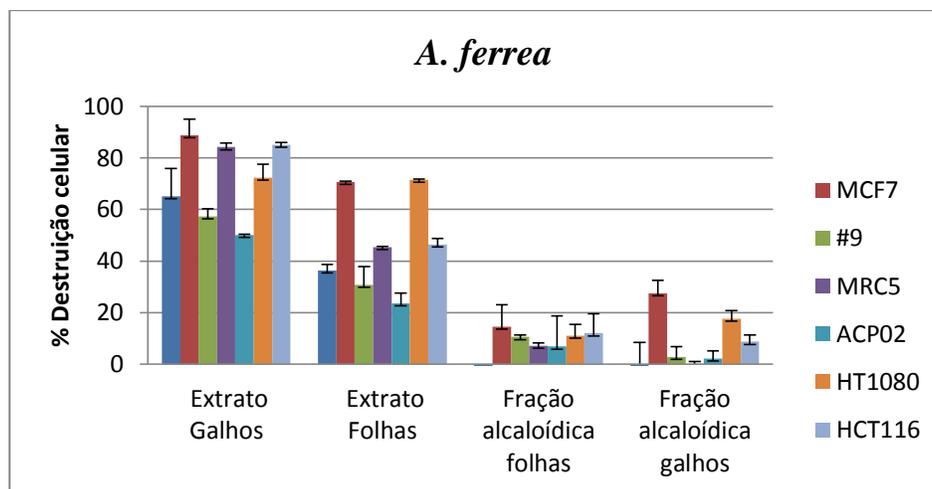


Figura 78- Inibição dos extratos brutos e frações alcaloídicas de *A. ferrea* frente a sete linhagens de células testadas.

De forma similar às outras espécies discutidas anteriormente, o extrato etanólico dos galhos da espécie *A. parviflora* apresentou um percentual de inibição maior do que para o extrato das folhas. O melhor resultado do extrato dos galhos foi frente à linhagem MCF7 (84,93 % de inibição), seguido das linhagens HCT116, MRC5, HT1080, SKAMEL9 e ACP02 com inibição de 78,38%, 76,61%, 73,54%, 53,60 e 45,30%, respectivamente.

O extrato das folhas exibiu baixa atividade, com exceção de uma linhagem (MCF7), cujo extrato inibiu 50,35% das células. A fração alcaloídica dos galhos apresentou resultado inferior a de seu extrato precursor em todos os casos, sendo que o resultado mais expressivo foi frente à linhagem de célula HT1080 com 28% de inibição (figura 79).

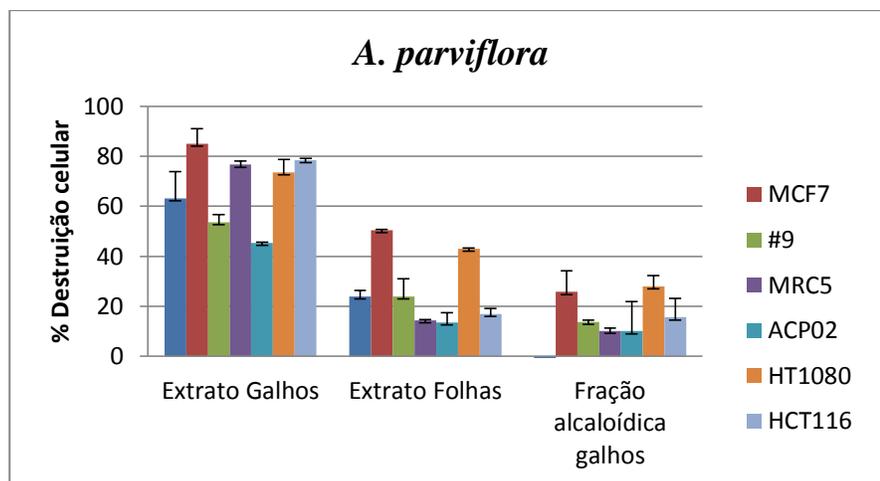


Figura 79- Inibição dos extratos brutos e frações alcaloídicas de *A. parviflora* frente às sete linhagens de células testadas.

Quanto à espécie *L. martiniana*, foi verificado que o extrato dos galhos exerceu maior atividade que as folhas em todos os casos. Nas linhagens SKAMEL9 e ACP02, a inibição foi baixa (32,21% e 39,61% respectivamente). Para quatro linhagens (HT1080, HCT116 e MRC5), a inibição foi considerada moderada (69,83%, 65,32% e 61,83% respectivamente). Em uma linhagem (MCF7) a atividade foi alta, 78,90 % de destruição celular. No extrato das folhas, observou-se que a atividade de inibição celular foi baixa em todos os casos (< que 50%) com o resultado mais expressivo de 39,37% de inibição contra a linhagem MCF7.

Com relação às frações alcaloídicas, percebeu-se que houve inibição mais efetiva da fração originada dos galhos em todos os casos. No entanto, a atividade para os galhos foi baixa, visto que o melhor resultado foi de 30,88% de inibição frente à linhagem HCT116. O melhor resultado da fração alcaloídica originada das folhas foi de 14,77% de inibição para a linhagem HT1080. Na figura 80 é possível observar o resultado de destruição celular causada pelos extratos e frações alcaloídicas da espécie *L. martiniana* frente às linhagens de células testadas.

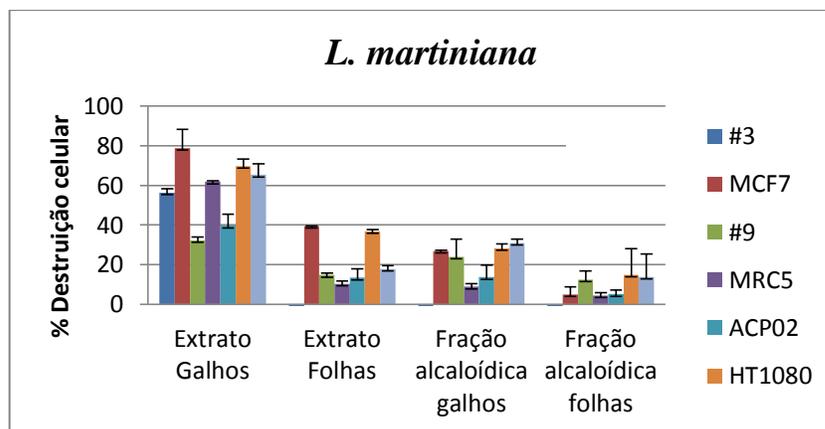


Figura 80- Inibição dos extratos brutos e frações alcaloídicas de *L. martiniana* frente às sete linhagens de células testadas.

No perfil de inibição celular da espécie *L. canella angustata* (figura 65), foi possível observar que o extrato bruto dessa espécie causou menor percentual de morte celular se comparado com as outras anteriores. Verificou-se que apesar da baixa inibição, o extrato das folhas matou maior quantidade de células que os galhos contra as linhagens HT1080 (49,17% - melhor resultado dos extratos) e SKAMEL9 (26,89%). Para o extrato dos galhos o percentual mais elevado de inibição foi também frente à linhagem HT1080 (37,84% de morte).

As frações alcaloídicas das folhas apresentaram um perfil bem interessante em comparação com as outras frações relacionadas às outras espécies, visto que houve resultado mais pronunciado da fração alcaloídica das folhas em relação aos galhos contra cinco linhagens de células: HCT116, MCF7, MRC5 e ACP02, com os percentuais de inibição de 41,97%, 52,38%, 24,15%, e 15,76%, respectivamente. O resultado mais expressivo para a fração alcaloídica oriunda dos galhos foi de 36,61% de inibição frente à linhagem MCF7. Todos os outros resultados para a fração alcaloídica dos galhos foram abaixo de 30% de morte celular, como pode ser visto na figura 81.

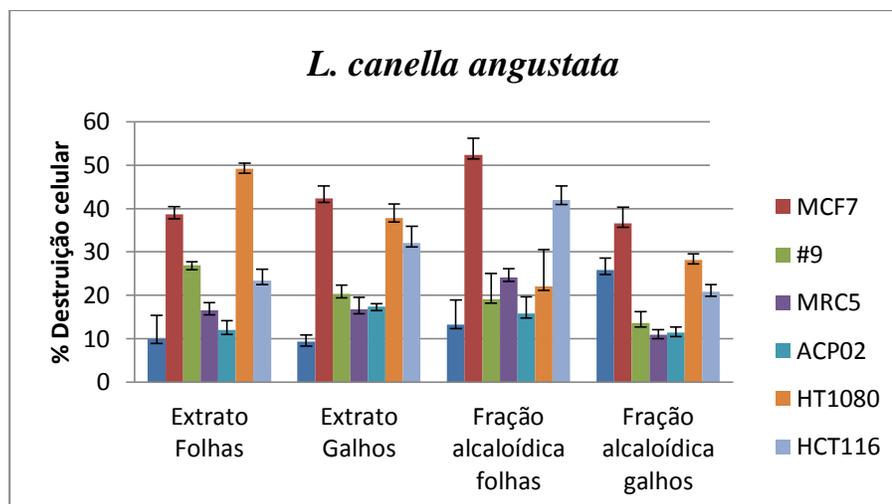


Figura 81- Inibição dos extratos brutos e frações alcaloídicas de *L. canella angustata* frente às sete linhagens de células testadas.

O resultado mais expressivo dos extratos de folhas e galhos da espécie *O. leucoxyton* foi de 37,80% para o extrato dos galhos frente à linhagem MCF7. Assim como na espécie *L. canella angustata*, o extrato das folhas foi mais efetivo em inibir quatro linhagens de células: HCT116 (30,84% de inibição celular, em relação a 27,49% dos galhos), MRC5 (21,39% de inibição celular em relação a 20,33% dos galhos), ACP02 (24,03 % de inibição celular em relação a 21,01% dos galhos) e SKAMEL9 (35,66% de inibição celular, em relação a 28,76% dos galhos).

Todas as frações alcaloídicas tiveram o potencial de inibição inferior a de seus extratos de origem. O resultado mais expressivo foi 33,70% de inibição da fração dos galhos sob a linhagem MCF7. Os maiores percentuais de inibição foram verificados para a fração dos galhos da espécie em discussão. O melhor percentual de inibição observado para a fração das folhas que inibiu 27,71% das células da linhagem SKAMEL9. O resultado da inibição dos extratos das folhas e galhos, bem como das frações alcaloídicas correspondentes está apresentado na figura 82.

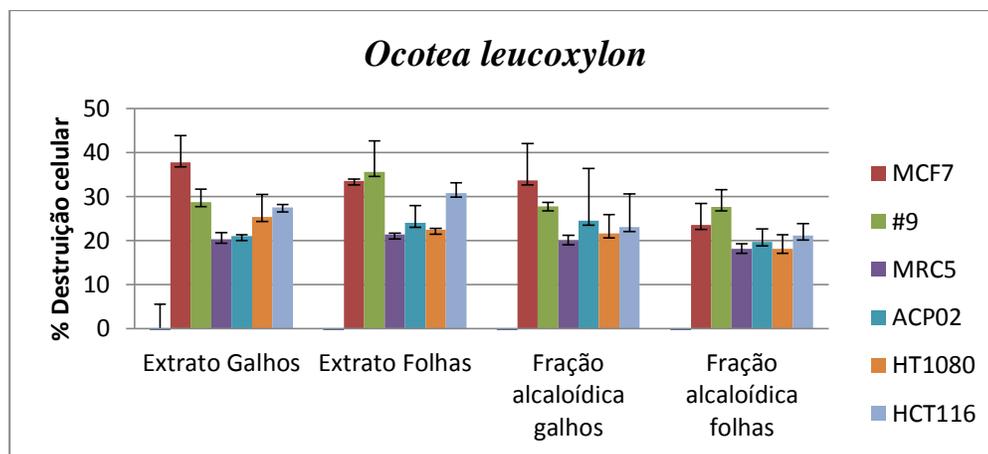


Figura 82- Inibição dos extratos brutos e frações alcaloídicas de *L. canella angustata* frente às sete linhagens de células testadas.

Há relatos na literatura que comprovam que o potencial citotóxico de uma determinada espécie de planta está relacionado a presença de alcaloides. Nesse sentido, Levin (1976) enfatiza que os alcaloides são especialmente efetivos em seus efeitos farmacológicos e se encontram amplamente distribuídos em diferentes espécies de plantas tropicais. Um exemplo é a espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, fonte de pelo menos 60 alcalóides, dos quais dois deles, a vincristina e a vinblastina, são efetivos no tratamento de leucemia infantil (GUERRA; NODARI, 2003). Nos trabalhos de Pereira *et al.*, (2008) e Silva *et al.*, (2007) foi verificada a capacidade de alguns extratos, que apresentaram teste positivo para alcaloides, de inibirem linhagens de células tumorais.

Omar *et al.*, (2013) isolaram os alcaloides lisicamina e litsericinona das folhas de *Phoebe grandis* (Lauraceae) e ambas apresentaram atividade citotóxica significativa contra a linhagem de célula MCF7 com valores de CI_{50} 26 e 60 $\mu\text{g/mL}$ para lisicamina e litsericinona, respectivamente. Das folhas de *Ocotea acutifolia* (Lauraceae), Garcez, *et al.*,

(2011) isolaram os alcaloides ocoteína, dicentrina, neolitsina e talicminina, que foram ativos contra pelo menos uma das linhagens de células testadas.

No presente estudo, foi verificado que alguns extratos causaram inibição celular com alguns resultados significativos como no caso dos extratos *Aniba panurensis* e *Aniba ferrea*. Tal dado poderia ser relacionado à presença dos alcaloides. No entanto, observou-se que os extratos exibiram potencial de inibição maior que de suas frações alcaloídicas correspondentes. Isto pode significar que a atividade citotóxica em ambos os extratos (galhos e folhas) das espécies investigadas podem também estar associadas a outros constituintes presentes na matriz vegetal.

Outro importante ponto observado foi que em alguns casos como nos galhos de *A. panurensis*, a destruição celular foi bastante significativa. No entanto, o maior percentual de morte celular (94,65%) causado pelo extrato em questão foi observado frente à linhagem normal MRC5 (fibroblastos de pulmão humano). Isto significa que na concentração testada o extrato é tóxico para células saudáveis. Em estudo mais aprofundado, em nível de doutoramento, pode ser realizado teste de seletividade com diferentes concentrações, utilizando esse e outros extratos e/ou frações que apresentaram resultado similar para comprovar tal resultado.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia utilizada nesse estudo, que teve como ponto de partida uma investigação prévia dos extratos em busca de espécies em potencial, foi eficiente para se alcançar os objetivos propostos. Dessa forma obteve-se:

- Das sete espécies selecionadas, os extratos dos galhos de *A. ferrea*, *A. martiniana* e *A. parviflora* foram as que apresentaram resultados diferenciados na varredura frente ao radical livre DPPH• (CI₅₀ 12,18 µg/mL, 13,23 µg/mL e 14,09 µg/mL, respectivamente) e os extratos dos galhos de *L. martiniana*, *A. panurensis* e *A. ferrea* (CI₅₀ 9,45 µg/mL, 11,05 µg/mL e 14,09 µg/mL) foram os que mais se destacaram frente ao radical ABTS^{•+}.
- O resultado pouco expressivo das frações alcalóidicas sinaliza que não há relação direta da atividade antioxidante com a presença de alcaloides, o que pode sugerir que a capacidade antioxidante desses extratos pode estar associada a outros compostos presentes na matriz vegetal dessas espécies.
- O extrato de folhas e galhos de *A. panurensis* apresentou expressiva atividade contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* resistente a metilina, *Staphylococcus sumulans*, *Staphylococcus* e *Acinetobacter baumannii* com halos medindo de 15 a 20 mm.
- A fração alcalóidica oriunda dos galhos de *A. panurensis* foi eficaz frente às cepas das bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* com halos medindo 10 e 14 mm, respectivamente. Como se trata de uma fração rica em alcaloides é possível que tal atividade seja causada por alcaloides presentes em tal fração.

- No teste de citotoxicidade, o melhor resultado também foi observado para os extratos dos galhos da espécie *A. panurensis*, com percentuais de inibição acima de 85% frente a quatro linhagens de células (HCT116, MCF7, MRC5 e ACP02). Verificou-se que o percentual mais elevado foi de 94,65% frente à linhagem MRC5, o que indica que, na concentração testada, esse extrato é tóxico para a linhagem de células normais. Em estudo mais aprofundado pode ser realizado teste de seletividade com diferentes concentrações, utilizando esse e outros extratos e/ou frações que apresentaram resultado similar para comprovar tal resultado.
- Foram isolados cinco alcaloides: dois de esqueletos aporfínicos de m/z 328 e 356 (isolados de *A. ferrea* e *O. leucoxydon*, respectivamente), um de esqueleto benziltetraidroisoquinolínico (m/z 330, de *A. ferrea*) e dois indólicos de m/z 273 e 289 (isolados de *A. panurensis*).
- O alcaloide indólico de m/z 273 apresentou destacada atividade frente às bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* resistente a metilina, *Staphylococcus sumulans* e *Staphylococcus aureus* (CIM 0,6 mg/mL) confirmando a atividade observada para a fração alcaloídica dessa espécie.
- Os resultados obtidos sinalizam a importância da metodologia adotada neste trabalho como forma de orientação de pesquisas mais aprofundadas para as espécies que obtiveram resultados expressivos, visto que resultados positivos em extratos, com ação semelhante ao padrão, mostram-se promissores quanto à presença de substâncias que podem ser muito mais ativas, quando isoladas.

7. REFERÊNCIAS

1. AGUIAR, Leila M. G.; BRAZ-FILHO, Raimundo; GOTTLIEB, Otto R.; MAIA, J. Guirherme S.; PINHO, Sonildes L. V.; SOUZA, José R. de. **The chemistry of Brazilian Lauraceae. Part LX. Cecilin, a 1-benzyl- β -carboline from *Aniba santalodora*.** *Phytochemistry*, v. 19, n. 8, p. 1859-1860, 1980.
2. AHMAD, Roshan; CAVA, Michael P. **Leucoxylophine and ocoxylophine-hexaoxygenated aporphines from *Ocotea leucoxylo*.** *Heterocycles*, v. 7, p. 927, 1977.
3. AIBA, C. J. *et al.* **Benzofuranoid neolignans from *Licaria armeniaca*.** *Phytochemistry*, v. 1, p. 2038-2039, 1978.
4. AIBA, C. J.; CORRÊA, R. G. C.; GOTTLIEB, O. R. **Natural occurrence of Erdtman's dehydrodiisoeugenol.** *Phytochemistry*, v. 12, p. 1163-1164, 1973.
5. ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. de L.; VEIGA JUNIOR, V. F.; **Composição química de óleos essenciais de espécies de *Aniba e Licaria* e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária.** *Quim. Nova*, vol. 33, n. 1, p. 141-145, 2010b.
6. ALCÂNTARA, J. Moreira; YAMAGUCHI, K. K. de Lima.; VEIGA JUNIOR, V. Florêncio. **Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae).** *Acta Amazonica*, v. 40, n. 3, p. 567 – 572, 2010^a.
7. ALEGRIO, L. V. *et. al.*, **Lignans and neolignans from *Licaria armeniaca*.** *Phytochemistry*, v. 20, n. 8, p. 1963-1965, 1981.
8. Almeida, V. L.; Leitão, L. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P.; **Câncer e agentes neoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.** *Química Nova*, Vol. 28, No. 01, Pp. 118-129, 2005.
9. ANDRADE, C. H. S.; BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. \. **Phytochemistry**, v. 19, n. 6, p. 1191-1194, 1980.
10. ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M. S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; BARBOSA, T.P.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; SILVA, T.M.S.; **Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.16, n. 4, p. 517-524, 2006.
11. ARAUJO, A.J.; **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2000.**

12. ARNAO, M.B. **Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case.** Trends in Food Science & Technology, n. 11, p. 419-421, 2000.
13. ARTS, M.J.T.J.; DALLINGA, J.S.; VOSS, H.P.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. **A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay.** Food Chemistry, v. 88, p. 567-570, 2004.
14. AUBLET, J. B. C. F. **Histoire des Plantes de la Guiane Française.** London, 1: 327, pl. 124, 1775.
15. BABCOCK, Philip A.; SEGELMAN, Alvin B. **Alkaloids of *Lindera benzoin* (L.) Blume (Lauraceae) I: isolation and identification of lauretetanine.** *J Pharm Sci*, v. 63, p. 1495-1496, 1974.
16. BARBOSA FILHO, J. M. *et al.* **Neolignans from *Licaria aurea*.** *Phytochemistry*, v. 28, n. 8, p. 2209-2211, 1989.
17. BARBOSA FILHO, J. M; VARGAS, M. R. W. ; SILVA, I. G, FRANCA; MORAIS, L. C. S. L; CUNHA, E. V. L. da; SILVA, M. S. da; SOUZA, M. F.V Chaves MCO; ALMEIDA, R. N; AGRA, M. F. ***Ocotea duckei* excepcional fonte de iangambina e outras lignanas furofuran.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 71, n. 2, p. 231-238, 1999.
18. BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M; BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. **Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae.** *Acta Amazonica*, v. 18, n. 1-2, p. 91-94, 1988.
19. BARBOSA-FILHO, J. M ; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. **Neolignans from the fruits of *Licaria armeniaca*.** *Phytochemistry*, v. 26, n. 1, p. 319-321, 1987.
20. BARBOSA-FILHO, J. M.; Lignanas, neolignanas e seus análogos. In: C.M.O. Simões *et al.* (eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento.** Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 22, Florianópolis, 2004.
21. BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, R.M.; DIAS, C.S. *et al.*, . **GC-MS Analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 1, p. 37-41, 2008.
22. BOLZANI, E.J.; BARREIRO, Vanderlan da Silva. Biodiversidade: **Fonte Potencial para a descoberta de fármacos.** *Química Nova*, 32(3), 679-688 (2009).
23. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafrás, na síntese de compostos bioativos na cascata do ácido**

araquidônico: antiinflamatório, analgésicos e anti-trombóticos. Química Nova, v. 22, p. 5, 1999.

24. BARREIROS, A. L. B. S.; David, J. M.; **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química Nova, Vol.29, No.1, Pp. 113-123, 2006.

25. BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L.; **Sistemática de Angiosperma do Brasil.** Vol. 01, 2º Edição, EDUSP, Pp. 255, São Paulo, 2002.

26. BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G.; **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** Revista de Nutrição, v. 12. n. 2, p. 123-130, 1999.

27. BOSCOLO. O. H.; Mendonça-Filho, R.F.W.; Menezes, F.S.; Senna-Valle, L.; Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Vol.09, No 01, Pp.8-12, 2007.

28. BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. **Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.** Plant Science, n. 161, p. 839-851, 2001.

29. BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J. A. P. DAVID, J. M. **Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas.** Química Nova, Vol. 33, No. 06, Pp. 1359-1369, 2010.

30. BRAVO, José Antônio; SAUVAIN, Michel; BALDERRAMA, Luisa; MORETTI, Christian; RICHOMME, Pascal; BRUNETON, Jean. **Alkaloids from *Aniba muca*.** Revista Boliviana de Química, v. 13, n. 1, p. 19-22, 1996.

31. BRAZ-FILHO *et al.* **Neolignans from *Licaria rigida*.** Phytochemistry, v. 20, n. 8, p. 2049- 2050, 1981.

32. BRUNI; Renato; MEDICI, Alessandro; Andreotti, Elisa; FANTIN, Carlo; MUZZOLI, Mariavittoria; DEHESA, Marco; ROMAGNOLI, Carlo; SACCHETTI, Gianni. **Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices.** Food Chemistry, vol. 85, n. 3, p. 415-421, 2004.

33. CARTERLE, L., **Erva-mate e atividade antioxidante.** Dissertação de Mestrado, UFSM, RS, p. 99, 2005.

34. CASTRO, R.D.; LIMA, E.O. **Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*.** Rev. Bras. Pl. Med., v. 13, n. 2, p.203-208, 2011.

35. CAVA, M.P.; Rao, K.V.; Douglas, B.; Weisbach, J.A. **Alkaloids of *Cassytha americana***. J. Org. Chem. V. 33, p. 2443-2446, 1968.
36. CAVA, M. P.; WAtANABE, Y.; BESSHO, K.; MITCHELL, M.J.; ROCHA, A. I. **Ocotea alkaloids: the characterization and structures of four new aporphine bases**. Tetrahedron Letters, v. 20, p. 2437-2442, 1968.
37. CHANDERBALI, A. S. ***Endlicheria*. Flora Neotropica, Monograph**, v. 91, p. 1-141, 2004.
38. CHAVERRI, C.; DÍAZ, C.; CICCIO, José F. **Chemical analysis of essential oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) collected at “Reserva Biológica Alberto M. Brenes” in Costa Rica and their cytotoxic activity on tumor cell lines**. J. Braz. Chem. Soc., v. 22, n. 4, p. 741-745, 2011.
39. CORDELL, G. A. QUIRN-BEATTIE, M. Lou; FARNSWORTH, Norman R. **The potential of alkaloids in drug discovery**. Phytotherapy Research, v. 15, n. 3, p. 183-205, 2001.
40. COSTA, Emmanoel Vilaça; DUTRA; Lívia Macedo; NEPEL; Angelita; BARISON, Andersson. **Isoquinoline alkaloids from the leaves of *Xylopia laevigata* (Annonaceae)**. Biochemical Systematics and Ecology, v. 51, p. 331–334, 2013.
41. COSTA, Emmanoel V.; PINHEIRO, Maria Lúcia B.; XAVIER, Clahildek M.; SILVA, Jefferson R. A.; AMARAL, Ana Cláudia F.; SOUZA, Afonso D. L.; BARISON, Andersson; CAMPOS, Francinete R.; FERREIRA, Antonio G.; MACHADO, Gézia M. C.; LEON, Leonor L. P. **A Pyrimidine-â-carboline and Other Alkaloids from *Annona foetida* with Antileishmanial Activity**. Journal of Natural Products, v. 69, n. 2, p. 292-294, 2006.
42. COUTINHO, Denise F.; AGRA, Maria de Fátima; BARBOSA-FILHO, José M; BASÍLIO, Ionaldo J.L. Diniz. **Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroideae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia, p. 178-184, 2006.
43. COWAN, M.M., **Plant product as antimicrobial agentes**. Clin. Microbiol. Rev., 2 (4). 564-82, 1999.
44. COY, E. D.; CUCA, L. E.; SEFKOW, M. Macrophylin. **Type bicyclo [3.2.1] octanoid neolignans from the leaves of *Pleurothyrium cinereum***. Journal of Natural Products, v. 72, n. 7, p. 1245-1248, 2009b.
45. COY, Ericsson David Barrera; CUCA, Luís Enrique Suárez. **Aporphine alkaloids from leaves of *Ocotea macrophylla* (Kunth) (Lauraceae) from Colombia**. Biochemical Systematics and Ecology, vol. 37, p. 522–524, 2009a.
46. DEWICK, P. M. Medicinal natural product: a biosynthetic approach. 2º edição, John Wiley & Sons, 2002.

47. DIAS, C.S.; SILVA, I.G.; CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S.; BRAZ-FILHO, Raimundo; BARBOSA-FILHO, J.M. **Isolamento e identificação de novos alcalóides de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). Ver. Bras. Farmacognosia, vol. 13, p. 62-63, 2003.**
48. DIAS, K.L.; SILVA, C.; BARBOSA-FILHO, J.M. et al. **Cardiovascular effects induced by reticuline in normotensive rats.** *Planta Medica*, v. 70, p.328-333, 2004.
49. DIAZ, Aura M. P.; GOTTLIEB, Hugo E.; GOTTLIEB, Otto R. **Dehydrodieugenols from *Ocotea cymbarum*.** *Phytochemistry Reviews*, v. 19, p. 681, 1980.
50. DRÖGE, W.; **Free radicals in the physiological control of cell function.** *Physiological Reviews*, 2002.
51. Duarte, J. A.; Appell, H. J.; Carvalho, F., Bastos, M. L.; Soares, J. M.; **Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage.** V.14, n. 08, p. 440-443, 1993.
52. ELOFF, J. N. **A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria.** *Planta Medica*, v. 64, p. 711-713, 1988.
53. FENNEL, C. W. et al. **Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology.** *J. Ethnopharmacol* 94: 205-217, 2004.
54. FARIA-NETO, H.C.; ARAUJO, C.V.; MOREIRA, S. et al. **Yangambin, a new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: in vivo pharmacological studies.** *Planta Medica*, v.61, p.106-112, 1995.
55. FARIA-NETO, H.C.; TIBIRICA, E.V.; BARBOSA-FILHO, J.M. et al. **Ecdysis and diuresis.** *Phytochemistry*, v. 55, p. 611-616, 2000.
56. FERRAZ, A. et al. **Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*.** *Phytomedicine*. v. 12, p. 112-115, 2005.
57. FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, nº 1, p. 61-68, 1997.
58. FILHO, Cechinel, V., Yunes, R.A. **Estrategias for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants.** Concepts about structural modification for improve the activity. *Química Nova*, v.21,n.1, p.99-105, 1998.
59. FILHO, Valdir Cechinel. **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade.** *Química Nova*, vol. 21, n. 1, 1998.

60. FRANCA, N. C.; GOTTLIEB, O. R. **Macrophyllin, a neolignan from *Licaria macrophylla***. *Phytochemistry*, v. 13, p. 2839-2842, 1974.
61. FRANCA, N. C.; GIESBRECHT, A. M.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, A. F.; MAGALHAES, E. G.; MAIA, J. G. S. **Chemistry of Brazilian Lauraceae. 32. Benzylisoquinolines from *Ocotea* species**. *Phytochemistry*, v. 14, p. 1671, 1975.
62. GARCEZ, Fernanda R.; GARCEZ, Walmir S.; MARTINS, M.; MATOS, M. F. C.; GUTERRES, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; MISU, C. K.; NAKASHITA, S.T. **Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis***. *Planta Médica*, v. 71, p. 923, 2005.
63. GARCEZ, Fernanda R.; SILVA, Ana Francisca G. da; GARCEZ, Walmir S.; LINCK, Gabriela; MATOS, Maria de Fatima C.; SANTOS, Evelyn C. S.; QUEIROZ, Lyara M. M. **Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia***. *Planta Médica*, vol. 77, p. 383-387, 2011.
64. GARCEZ, Walmir S.; **Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellsiana***. *Phytochemistry*, v. 39, n. 4, p. 815-816, 1995a.
65. GARCEZ, F. **Yangambin, a new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: binding and *in vitro* studies**. *Planta Medica*, v.61, p.101-105, 1995b.
66. GARRIDO, J.M.P.J.; DELERUE-MATOS C.; BORGES M.F.M.; MACEDO, T.R.A.; OLIVEIRA-BRETT, A.M. **Oxidative behaviour of apomorphine and its metabolites**. *Bioelectrochemistry*, v. 55, n. 1-2, p. 113-114, 2002.
67. GIANG, Phan Minh; SON, Phan Tong; MATSUNAMI, Katsuyoshi; OTSUKA, Hideaki. **New neolignans and lignans from vietnamese medicinal plant *Machilus odoratissima* NEES**. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 54, n. 3, p. 380-383, 2006.
68. GIESBRECHT, A. M.; FRANCA, N. C.; GOTTLIEB, O. R. **The neolignans of *Licaria canella***. *Phytochemistry*, v. 13, p. 2285-2293, 1974.
69. GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J.A.; **Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)**. *Química Nova*, Vol. 31, No. 8, Pp 2042-2046, 2008.
70. GOODWIN, S.; SMITH, A. F.; HORNING, E. C. **Leucoxine and leucoxine**. *Chemistry and Industry*, v. 11, p. 691-692, 1960.
71. GOTTLIEB, O. R. & YOSHIDA, M.; **Neolignanas antitumorais**. *Ciência e Cultura*, Vol. 32, Pp. 93-100, 1978.
72. GOTTLIEB, O. R. *et al.* **Óleos essenciais da Amazônia VII**. *Acta Amazonica*, v. 11, n. 1, p. 143-148, 1981.

73. GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. **Lignóides, com atenção especial à química das neolignananas**. Química Nova, v.7, p. 250-273, 1984.
74. GOULART, E. G; JOURDAN, M.C; BRAZIL, B. G; GILBERT, B.; LOPES, J. N. C.; SARTI, S. J.; VICHNEWSKY, W.; THAMES, A. W. **Atividade bloqueadora de produtos naturais na evolução externa de *Strongyloides stercoralis* e ancilostomídeos**. Rev Bras Farm. V. 56, n. 9-12, p. 123-137, 1975.
75. Guinaudeau, H. **Aporphinoid alkaloids III**. Journal of Natural Products, v. 46, n. 6, p. 761-835, 1983.
76. GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. **Aporphine alkaloids**. Lloydia, v. 38, p. 275-288, 1975.
77. HALLIWELL, B.; **Free radicals and antioxidants: a personal view**. Nutrition Reviews, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.
78. HARTMANN, T. **From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism**. Phytochemistry, n. 68, p. 2831-2846, 2007.
79. HENRIQUES, A. T.; Limberger, R. P.; Kerber, V. A.; Moreno, P.R.H. **Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos**. In In: C.M.O. Simões *et al.* (eds.). Farmacognosia da planta ao medicamento. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 29, Florianópolis, 2004.
80. HIRANTHI, Jayasuriya; KITHSIRI, Herath B; Ondeyka John G; POLISHOOK, Jon D; BILLS, Gerald F; DOMBROWSKI, Anne W; SPRINGER, Marty S; SICILIANO, Sal; MALKOWITZ, Lorraine; SANCHEZ, Manuel. **Isolation and structure of antagonists of chemokine receptor (CCR5)**. Journal of natural products, v. 67, n. 6, p. 1036-1038, 2004.
81. HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. EdUFSCar: São Paulo, 2003.
82. HOULIHAN, W. J. Part One. In: **The chemistry of heterocycle compounds: a series of monographs**. , Wiley-Interscience, Taylor, 1972.
83. IMLER, Michael J.; MENACHERY, Mary D.; RAJARAMAN, R.; CAVA, Michael P.; FREYER, Alan J.; SHI, Stone. D. **Lequesnamine: A new oxoaporphine alkaloid from *Ocotea leucoxydon***. America Chemical Society, v. 225, p.23-27, 2003.
84. JAWETZ, E; MELNICK, J. L; ADELBERG, E. A.: Microbiologia Médica. 24^a. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
85. JOPPA, Lucas N.; ROBERTS, David L.; MYERSD, Norman; PIMME Stuart L. **Biodiversity hotspots house most undiscovered plant species**. PNAS, vol. 108, n. 32, p. 13171-13176, 2011.

86. KLAUSMEYER, Paul; CHMURNY, Gwendolyn N; MCCLOUD, Thomas G; TUCKER, Kenneth D; SHOEMAKER, Robert H. **A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from *Aniba panurensis***. Journal of natural products. V. 67, n. 1732-1735, 2004.
87. KUBITZKI, K. & RENNER, S. **Lauraceae I (*Aniba* and *Aiouea*)**. Flora Tropical, v. 31, New York, New York Botanical Garden, 1982.
88. KURTZ, B. C. **Composição florística e estrutura do estrato arbóreo de um trecho de Mata Atlântica situado na Estação Ecológica Estadual de Paraíso, Município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brasil**. Rodriguésia. 51(78-79): p. 69-112, 2000.
89. LARA, A.; VALVERDE, R.; GÓMEZ, L.; HIDALGO, N. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. **Agronomía Costarricense**, v. 27, n. 2, p. 7-20, 2003.
90. LIMA, M.R.F. *et al.* **Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants**. Journal of Ethnopharmacology, v. 105, p.137–147, 2006.
91. LIMA, Maria Raquel Ferreira de *et al.* **Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants**. Journal of Ethnopharmacology, v. 105, p.137–147, 2006.
92. LORENZI, H. **Árvores Brasileiras - Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. V. 2, 2 ed., Editora Plantarum, Nova Odessa- SP, p. 368, 2002.
93. MA, W. W.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J. L. **Bioactive neolignans from *Endlicheria dysodantha***. Journal of Natural Products. v. 54, n. 4, p. 1153-1158, 1991.
94. MACHADO, Hussen; NAGEM Tanus Jorge; PETERS Vera Maria; FONSECA, Cristiane Sampaio; OLIVEIRA, Tânia Toledo de. **Flavonóides e seu potencial terapêutico**. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.
95. MADRIÑÁN, S.; *Rhodostemonodaphne* (Lauraceae). **Flora neotropical**. Monografía 92, New York. New York Botanical Garden, 2004.
96. MAIA, J. G. S.; RAMOS, L. S.; LUZ, A. I. R. **Estudo do óleo essencial do puxuri por cromatografia de gás/ espectrometria de massa (CG/EM)**. Acta Amazonica, v. 15, n. 1-2, p.179-183, 1985.
97. MANOSALVA, Loreto; MUTIS, Ana; DÍAZ, Juan; URZÚA; Alejandro; FAJARDO, Víctor; QUIROZ, Andrés. **Identification of isoquinoline alkaloids from *Berberis microphylla* BY HPLC ESI-MS/MS**. Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas, v. 13, n. 4, p. 324-335, 2014.

98. MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 7 ed. São Paulo: Nobel, Tomo II, 466 p. 1983.
99. MARQUES, C. A. **Importância Econômica da Família Lauraceae**. Floresta e Ambiente, Universidade Federal de Viçosa, vol. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.
100. MARTINEZ, Sabrina T.; ALMEIDA, Márcia R.; PINTO, Angêlo C. **Alucinógenos naturais: um voo da Europa medieval ao Brasil**. Quim. Nova, vol. 32, n. 9, p. 2501-2507, 2009.
101. MENSOR, L. L.; **Screening of brazilian plant extract for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method**. Phytotherapy Research, v. 16, p. 127, 2001.
102. MOLLATAGHI; Abbas; HADI, A. Hamid A.; CHEAH, Shiau-Chuen. **(-)-Kunstleramide, a New Antioxidant and Cytotoxic Dienamide from the Bark of *Beilschmiedia kunstleri* Gamble**. Molecules, v. 17, p. 4197-4208, 2012.
103. MOLYNEUX, P. **The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity**. Songklanakarinn Journal of Science and Technology, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
104. MONTRUCCHIO, Deise Prehs; MIGUEL, Obdulio Gomes; ZANIN, Sandra Maria Warumby; SILVA, Gabriel Araujo da; CARDOZO, Alcibia Maia; SANTOS, Adair Roberto Soares. **Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula***. Planta Medica, vol. 78, p. 1543–1548, 2012.
105. MORAIS, A. A de; REZENDE, C. M. A. M.; BÜLOW, M. V. von; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; ROCHA, A. I.; MAGALHÃES, M.T. **Óleos essenciais do gênero *Aniba***. Acta Amazonica, v. 2, n. 1, p. 41-44, 1972.
106. 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, p.57-61, 1998.
107. MOSS, G. P. **Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000)**. Pure Appl. Chem., vol. 72, n. 8, p. 1493- 1523, 2000.
108. M. R. Mukhtar, M.-T. Martin, M. Domansky, M. Pais, A. Hamid, A. Hadi and K. Awang. **Phoebgrandines A and B, proaporphine-tryptamine dimers, from *Phoebe grandis***. Phytochemistry, v. 45, p. 1543-1546, 1997.
109. MUKHERJEE, A. K.; BASU, S.; SARKAR, N.; GHOSH, A. C. **Advances in cancer therapy with plant based natural products**. Curr Med Chem. v. 8, n. 12, p. 1467-1486, 2001.

110. NASRULLAH, Ayu Afiqah; ZAHARI Azeana ; MOHAMAD , Jamaludin; AWANG, Khalijah. **Antiplasmodial Alkaloids from the Bark of *Cryptocarya nigra* (Lauraceae)**. *Molecules*, v. 18, p. 8009-8017, 2013.
111. OBÓN, J.M.; CASTELLAR, M.R.; CASCALES, J.A.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.A. **Assesment of the TEAC method for determining the antioxidant capacity of synthetic red food colorants**. *Food Research International*, v. 38, n 8-9, p. 842-845, 2005.
112. Oscar Castro, C.; José López, V.; Armando Vergara, G. **Aporphine Alkaloids from *Phoebe pittieri***. *Phytochemistry*. V. 24, p. 203-204, 1985.
113. OGER, Jean Michel; DUVAL, Oliver; RICHOMME, Pascal; BRUNETON, Jean; GUINAUDEAU, Helene; FOURNET, Alain. **(R)-(+)-Noranicanine a new type of trioxygenated benzylisoquinoline isolation and synthesis**. *Heterocycles*, v. 34, n. 1, p. 17-20, 1992.
114. OGER, Jean Michel; FARDEAU, Agnes; RICHOMME, Pascal; GUINAUDEAU, Helene; FOURNET, Alain. **Novel isoquinoline alkaloids from Bolivian Lauraceae: *Aniba canelilla* H.B.K.** *Canadian Journal of Chemistry*, v. 71, n. 8, p.1128-1135, 1993.
115. OMAR, Hanita; HASHIM, Najihah Mohd.; ZAJMI, Asdren; NORDIN, Noraziah, ABDELWAHAB, Siddiq Ibrahim; AZIZAN, Ainnul Hamidah Syahadah; HADI, A. Hamid A.; ALI, Hapipah Mohd. **Aporphine alkaloids from the leaves of *Phoebe grandis* (Nees) Mer. (Lauraceae) and their cytotoxic and antibacterial activities**. *Molecules*, v. 18, p. 8994-9009, 2013.
116. PABON, Ludy Cristina; CUCA, Luis Enrique. **Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (LAURACEAE)**. *Quim. Nova*, vol. 33, n. 4, p. 875-879, 2010.
117. PALAZZO, M. C.; AGIUS, B. R.; WRIGHT, B. S.; HABER, W. A.; MORIARITY, D. M.; SETZER, W. N.; **Chemical Compositions and Cytotoxic Activities of Leaf Essential Oils of Four 138 Lauraceae Tree Species from Monteverde, Costa Rica**. *Records Natural Products*, V. 03, n. 1, p. 32-37, 2009.
118. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a Espectroscopia**. Tradução da 4ª edição Norte americana. São Paulo editora: Cengage Learning, 2010.
119. PIETTA, P.G. **Flavonoids as antioxidants**. *J. Nat. Prod.*, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.
120. PINTO, Ângelo C. **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e perspectivas**. *Quim. Nova*, v. 25, suplemento 1, p. 45-61, 2002.

121. QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. **Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo**, Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia, Rio de Janeiro, v. 53, n. 82, p. 59-121, 2002.
122. Q. Z. ZHAO, Y. M. Zhao; K. J. WANG, *Yao Xue Xue Bao*. **Alkaloids from the root of *Lindera angustifolia***. v. 40, n. 4, p. 931-934, 2005.
123. RAIMUNDO BRAZ. **Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente**. Química Nova, vol. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
124. RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENT, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C.; **Antioxidant activity applying an improved ABTS+ radical cation decolorization assay**. Free Radicals in Biology and Medicine, v. 26, n. 09- 10, p. 1231–1237, 1998.
125. RIBEIRO, J. E. L. S. *et al.* **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, p. 816, 1999.
126. RIBEIRO, R.A.; CARMO, L.G.; VLADIMOROVA, I. *et al.* **Nantenine blocks muscle contraction and Ca²⁺ transient induced by noradrenaline and K⁺ in rat vas deferens**. European Journal of Pharmacology, v.470, p.37-43, 2003.
127. RICHTER, H. G. **Wood and bark anatomy of Lauraceae I. *Aniba* Aublet**. IAWA Bulletin n. s., v. 2, n. 2-3, p. 79-87, 1981.
128. ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Williams & Wilkins, Baltimore, 1996.
129. RODRIGUES, Marili Villa Nova; REHDER, Vera Lúcia Garcia; SARTORATTO, Adilson; BOAVENTURA JÚNIOR, Sinésio; SANTOS, Adriana da Silva. **O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais**. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 2006.
130. RODRÍGUEZ, M.; HASEGAWA, M.; González-Mújica, F.; MOTTA, N.; CASTILLO, A.; CASTILLO, J.; ZEA, E.; MORA, K.; SOUSA, A. G.; CAMEJO, D.; **Antidiabetic and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon**. Revista Brasileira de Farmacognosia. Vol. 18, No. 03, Pp. 331-338, 2008.
131. ROHWER, J.G.; Lauraceae. In: Kubitzki, K.; Rohwer, J.G. & Bittrich, V. (Eds.). **The families and genera of vascular plants**. Springer-Verlag, Berlim, Vol. 2, Pp. 366-391, 1993.
132. SALDANA, M. D. A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R. S. **Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com C supercrítico**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 17, n. 4, p. 371-376, 1997.

133. SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: C.M.O. Simões *et al.* (eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 5ª edição rev., Porto Alegre, capítulo 16, Florianópolis, 2004.
134. SANTOS, Sócrates Golzio dos; QUEIRONGA, Karine Fernandes; OLIVEIRA, Adriana Maria Fernandes de; TAVARES, Josean Fechine; GUTIERREZ, Stanley Juan Chaves; DINIIZ, Maria de Fátima Formiga Melo; BARBOSA-FILHO, José Maria; Silva, Marcelo Sobral da. **Blood matrix effects for male and female Wistar rats, in simultaneous HPLC-UV determination of riparin I and III from *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae)**. *Talanta*, v. 86, p. 233-240, 2011.
135. SCHMIDT, J.; RAITH, Klaus; BOETTCHER, Chotima; ZENK, Meinhart H. **Analyses of benzylisoquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization**. *Eur. J. Mass Spectrom*, v. 11, p. 325-333, 2005.
136. SERRA, M.F.; DIAZ, B.L.; BARRETO, E.O. *et al.* **Anti-allergic properties of natural PAF antagonist yangambin**. *Planta Médica*, v. 63, p. 207-212, 1997.
137. SHAMA, M. **The isoquinoline alkaloids: chemistry and pharmacology**. Academic Press, Nova York, 1972.
138. SHOEI-SHENG, Lee; YI-CHUN Lai; CHIEN-KUANG, Chen; LI-HONG, Tseng; CHEN-YU, Wang. **Characterization of isoquinoline alkaloids from *Neolitsea sericea* var. *aurata* by HPLC-SPE-NMR**. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 637-642, 2007.
139. SILVA, Ana F. Gomes. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Largo, Brasil, 2010.
140. SILVA, G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; LACERDA, C. D. G.; CUNHA, E. V. L. **Coclaurina from *Ocotea duckei***. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, p. 881, 2002.
141. SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. **Arylpropanoids from *Licaria puchury-major***. *Phytochemistry*, v. 12, p. 471-472, 1973.
142. SILVA, R. *et al.* **Lactones from *Mezilaurus synandra***. *Phytochemistry*, v. 22, n. 3, p. 772- 773, 1983.
143. SILVEIRA, Luiz Mário da Silva; MORAES, Denise Coutinho; OLEA, Roberto Sigfrido Gallegos; CRUZ, América de Lourdes Nogueira da; MENDES; Janice Corrêa; MORAES, Leandro Sousa de. **Atividade antibacteriana de duas espécies Vegetais do gênero *Ocotea***. *Revista Florence*, n. 1, 2011.

144. SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro editora: Livros Técnicos e Científicos, 2007.
145. SOLER-RIVAS, C.; ESPIN, J. C.; WICHERS, H. J.; **An Easy and Fast Test to Compare Total Free Radical Scavenger Capacity of Foodstuffs**. *Phytochemical Analysis*, V. 11, p. 330-338, 2000.
146. SOUZA, G. Coelho de; HAAS, A.P.S; POSER, G. L. von; ELISABETSKY, E. **Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil**. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.
147. SOUZA, G. Coelho de; HAAS, A.P.S; POSER, G. L. von; ELISABETSKY, E. **Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil**. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.
148. SOUZA, Vinícius C. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 85, 2008.
149. SOUZA, Vinícius. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.
150. SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M.B.; KRUEGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R. C. **Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos**. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. *Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*. Itajaí: Ed Univali; p. 239, 2003.
151. STÉVIGNY, Caroline; JIWAN, Jean-Louis Habib; ROZENBERG, Raoul; HOFFMANN, Edmond de; QUETIN-LECLERCQ; Joëlle. **Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry**. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* Vol. 18p. 523-528, 2004.
152. SULAIMAN, S. N.; MUKHTAR, M. R.; HADI, A. H. A.; AWANG, K.; HAZNI, H.; ZAHARI, A.; LITAUDON, M.; ZAIMA, K.; MORITA, H.; **Lancifoliaine, a new bisbenzylisoquinoline from the bark of *Litsea lancifolia***. *Molecules*, v. 16, p.3119-3127, 2011.
153. SCHWARZ, K.; BERTELSEN, G.; NISSEN, L.R.; GARDNER, P.T.; HEINONEN, M.I.; HOPIA, A.; HUYNH-BA, T.; LAMBELET, P.; MCPHAIL, D.; SKIBSTED, L.H.; TIJBURG, L. **Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds**. *European food research and technology*, v. 212, n. 3, p. 319-328, 2001.

154. TAGLIAFERRO, A.R.; HEIM, K.R.; BOBILYA, D.J.; Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 2002. v. 13, p.572-584.
155. TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
156. TORRES, Omar; SANTAFE, Gilmar; ÂNGULO, Alberto; VILL, Hiltony; JUAN, Zuluaga; DORIA, Maria. **Obtención de alcaloides a partir de corteza y madera de la especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae)**. Scientia et Technica Año XIII, n. 33, 2007.
157. TORSEL, K. B. G, 1997 apud FILHO, Raimundo Braz. **Contribuição da Fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente**. Quim. Nova, vol. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
158. TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F. et al. **Microbiologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.
159. UPRETY, Hema D. S. Bhakuni; DHAR, Bhakuni M. M. **Aporphine alkaloids of *Litsea sebifera*, *Litsea wightiana* and *Actinodaphne obovata***. *Phytochemistry*, v. 11, p. 3057-3059, 1972.
160. VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Química Nova, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
161. WARD, R. S. **Lignans, neolignans and related compounds**. Natural Products Reports, v.16, n.1, p.75-96, 1999.
162. WERFF, H. van der. **A revision of the genus *Pleurothyrium* (Lauraceae)**. Annals of the Missouri Botanical Garden, n. 80, p. 39-118, 1993.
163. WONG, Su-Ling; CHANG, Hsun-Shuo; WANG, Guei-Jane; CHIANG, Michael Y.; HUANG, Hung-Yi, CHEN, Chu-Huang, TSAI, Shiow-Chwen, LIN, O Chu-Hung; CHEN, Ih-Sheng. **Secondary metabolites from the roots of *Neolitsea daibuensis* and their anti-inflammatory activity**. Journal of Natural Products Article, v. 74, p. 2489-2496, 2011.
164. WU, W.; HUANG, C.; **Structural Elucidation of Isoquinoline, Isoquinolone, Benzylisoquinoline, Aporphine, and Phenanthrene Alkaloids using API-ion spray Tandem Mass Spectrometry**. The Chinese Pharmaceutical Journal, v. 58, p. 51-55, 2006.
165. WU, Yong-jiang; ZHENG, Yun-liang; Luan; Lian-jun; LIU, Xue-song; HAN, Zheng; REN, Yi-ping ; GAN, Li-she; ZHOU, Chang-xin. **Development of the fingerprint for the quality of *Radix Linderae* through ultrahigh pressure liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization mass spectrometry**. J. Sep. Sci., v. 33, p. 2734–2742, 2010.

166. YAMAGUCHI, Klenicy Kazumy de Lima; ALCÂNTARA, Joelma Moreira; VEIGA JUNIOR, Valdir Florêncio da. **Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae.** Acta Amazonica, vol. 42, p. 541-546, 2012.
167. YAMAGUCHI, Klenicy Kazumy de Lima. **Estudos biológicos dos extratos e composição química dos óleos essenciais de espécies da família Lauraceae.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil, 2011.
168. YAMAGUCHY, T; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAQ, J. **HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.** Biosci. Biotechnol. Biochem, v. 62, n. 6, p. 1201-1204, 1998.
169. YANEZ, R. X; DIAZ, A. M. P; DIAZ, P.P. **Neolignans from *Mezilaurus itauba*.** Phytochemistry, v. 25, n. 8, p. 1953-1956, 1986.
170. ZAHARI, Azeana, CHEAN, Foo; MOHAMAD, Jamaludin; SULAIMAN, Syazreen Nadia; LITAUDON, Marc; LEONG, Kok Hoong; AWANG, Khalijah Awang. **Antiplasmodial and antioxidant isoquinoline alkaloids from *Dehaasia longipedicellata*.** Planta Medica, 2014.
171. ZANIN, Sandra Maria Warumby. **Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (LAURACEAE).** Quim. Nova, vol. 30, n. 1, p. 92-98, 2007.
172. ZHANG, Chao-feng; NAKAMURA, Norio; TEWTRAKUL, Supinya; HATTORI, Masao; SUN, Qi-shi; WANG, Zheng-tao, FUJIWARA, Tamio. **Sesquiterpenes and Alkaloids from *Lindera chunii* and Their Inhibitory Activities against HIV-1 Integrase.** Chemical & Pharmaceutical Bulletin, v. 50, n. 9, p. 1195-1200, 2002).
173. ZHOU, Bing-Nan; JOHNSON; Randall K.; MATTERN, Michael R.; WANG, Xiangyang; HECHT, SIDNEY M.; BECK, Hans T.; ORTIZ, Alonzo; KINGSTON, David G. I. **Isolation and biochemical characterization of a new Topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxylo*.** Journal of Natural, v. 63, n. 2, p. 217-221, 2000.
174. ZSCHOCKE, S.; DREWES, S.E.; PAULUS, K. et al. **Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves.** Journal of Ethnopharmacology, v.71, p.219-230, 2000a.
175. ZSCHOCKE, S.; VAN STANDEN, J.; PAULUS, K. et al. **Stereostructure and antiinflammatory activity of three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea*.** Phytochemistry, v.54, n.591-595, 2000b.
176. ZUANAZZI, J. A. S.; Montana, J. A.; Flavonóides. In: C.M.O. Simões *et al.* (eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento.** Porto Alegre. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, 5ª edição, capítulo 16, Florianópolis, 2004.