



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



MARIA MADALENA ROCHA SILVA TELES

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO FITOQUÍMICO DE *Ocotea gardneri*
(MEISN) MEZ E *Ocotea duckei* VATTIMO

João Pessoa – PB

2016

MARIA MADALENA ROCHA SILVA TELES

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO FITOQUÍMICO DE *Ocotea gardneri*
(MEISN) MEZ E *Ocotea duckei* VATTIMO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

João Pessoa – PB

2016

T269c Teles, Maria Madalena Rocha Silva.
Contribuição ao conhecimento fitoquímico de *Ocotea gardneri* (Meisn) Mez e *Ocotea duckei* Vattimo / Maria Madalena Rocha Silva Teles.- João Pessoa, 2016.
115f.
Orientador: José Maria Barbosa Filho
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Lauraceae. 3. *Ocotea gardneri*.
4. *Ocotea duckei*. 5. Alcaloides. 6. Atividade biológica.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO FITOQUÍMICO DE *Ocotea gardneri*
(MEISN) MEZ E *Ocotea duckei* VATTIMO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
Universidade Federal da Paraíba
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Adriana M. F. de Oliveira
Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Externo)

Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo
Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Interno)

Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa
Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Externo)

Prof^a. Dr^a. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Interno)

Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho
Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Suplente Externo)

Prof^a. Dr^a. Fabiana de Andrade Cavalcante
Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Suplente Interno)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor infinito. Até suas ausências foram provas de amor.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é o resultado visível de um processo de construção em meio a uma conjuração de afetos e amizades. É preciso agradecer àqueles que percebem nossas descrenças, indecisões, medos, tudo o que nos paralisa, e gastam um pouco da sua energia conosco, insistindo. Dando continuidade à história, dedico algumas palavras àqueles que já a percorrem nas entrelinhas e dela fazem parte.

A **Deus**, mais do que me criar, deu propósito à minha vida. Vem dEle tudo o que sou, o que tenho e o que espero. Meu amparo e refúgio, alegria da minha alma, onde encontro esperança e conforto. As mãos que me guiam e acolhem.

Ao **Prof. José Maria Barbosa Filho**, pela oportunidade de crescimento e aprendizado, pela confiança, acessibilidade e gentileza a mim sempre dispensada. Espelho de humildade e generosidade, seus ensinamentos vão além da pesquisa, são lições de vida. Por sua consciência costurada pela experiência e pelo amor à ciência.

A todos os professores da PgPNSB, pela contribuição com a minha formação e construção deste trabalho, em especial a **prof. Josean Fechine Tavares**, sempre disposto a ajudar. Por tantas vezes, seu empenho e preocupação também o fizeram orientador.

Aos **Técnicos de laboratório**, pelos ensinamentos e por sua valiosa contribuição para elaboração deste trabalho, em especial Evandro, Sócrates e Nonato.

A **Vicente Carlos** pela amizade e acessibilidade. Sua generosidade e ensinamentos foram decisivos para meu trabalho.

A **Profa. Bárbara Viviana**, pela amizade, preocupação e disponibilidade.

Ao **Prof. Jnanabrata Bhattacharyya**. Saudades das sábias palavras e da amizade construída.

A **Profa. Tatjana Keesen** e sua aluna **Cíntia Nóbrega**, pela disponibilidade imediata e grande empenho.

Aos meus amados pais, **Silvino Teles** (*in memoriam*) e **Maria Bernardo**, pelo amor incondicional, dedicação, preocupação e orações. Pelos sacrifícios suportados em silêncio para a qualidade da minha educação. Agradeço os exemplos de caráter, coragem e honestidade. Por sempre me guiarem para o caminho do bem, por acreditarem em mim, por muito me amarem.

Às minhas irmãs, **Helena, Silvana e Wanderlea**, pelo amor que sempre nos uniu. A lembrança afetuosa de vocês e o abraço amoroso a cada reencontro me fizeram mais forte. Agradeço pelas vezes que viram seus sonhos adiados para que os meus fossem realizados. Aos meus sobrinhos: **Maria Cláudia, Lucas Silvino e Liz Maria**, luz da minha vida, alegria dos meus dias.

Ao meu esposo, **Kayo**, por todo amor, proteção e cumplicidade. O abraço espontâneo e tão necessário. Obrigada pelo apoio, paciência e compreensão nos momentos que precisei estar ausente.

À **Fabiana Lima** e **Clarice Noletto** pela disponibilidade em contribuir com meu trabalho, pelo carinho e amizade.

Aos **Amigos da pós-graduação** e da **Turma de Doutorado 2012**, em especial a **Ricardo Carneiro**, pela companhia e amizade, por dividir seus conhecimentos, por todo auxílio e pela excelente convivência.

À **Marianne Guedes** (*in memoriam*), pela amizade, companheirismo, pelo exemplo de de força e fé.

À **Comissão Examinadora** pela disponibilidade e contribuição para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao **Programa Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. A **UFPB** pelo suporte técnico e estrutural; ao **CNPq** e **CAPES** pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

TELES, M. M. R. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico de *Ocotea gardnei* (Meisn) Mez e *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae)**. 2016. 115 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos- Farmacoquímica) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

A família Lauraceae é constituída por aproximadamente 70 gêneros e 2500 espécies, com distribuição tropical e subtropical. No Brasil, compreende 400 espécies distribuídas em 25 gêneros. Dentre esses, destacamos o gênero *Ocotea*, com cerca de 350 espécies. O presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico de *Ocotea duckei* Vattimo e *Ocotea gardneri* (Meisn) Mez, bem como, avaliar a atividade antimicrobiana e antileishmania dos constituintes químicos isolados. Para isto, o material botânico foi submetido a processos de extração, partição e métodos cromatográficos para isolamento dos constituintes químicos. As estruturas químicas dos compostos foram determinadas por métodos espectroscópicos e comparações com modelos da literatura. O fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de *Ocotea gardneri* resultou no isolamento do triterpeno 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexeno (esqualeno), do 3,4,5 trimetóxi-benzaldeído e do esteroide glicosilado sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo. Da fase acetato de etila foi isolada a flavona 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona (quercetina) e dois flavonóis 2 - (3,4-di-hidroxifenil) - 4H-cromeno-3,5,7-triol (epicatequina) e 2 - (3,4-di-hidroxifenil) -4H-cromeno-3,5,7-triol (epicatequina). Todos os compostos estão sendo relatados pela primeira vez na espécie. Para obtenção da fração de alcaloides totais (FAT), o extrato etanólico bruto das folhas de *Ocotea duckei* foi submetido à marcha de alcaloides e, posteriormente, ao fracionamento cromatográfico, resultando no isolamento dos alcaloides reticulina e N-óxido de reticulina, sendo este relatado pela primeira vez no gênero. Ainda, a FAT foi analisada por LC-MS e por CG-MS. A LC-MS permitiu a identificação dos alcaloides reticulina, coclaurina, discretamina, tetrahidrocolumbamina e N-óxido de reticulina. A análise da FAT por CG-MS permitiu a identificação dos alcaloides metilreticulina e metilcoclaurina. Destes alcaloides, apenas a reticulina havia sido identificada para FAT das folhas, em estudos anteriores. Os flavonoides isolados foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição, frente às cepas de *S. mutans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A quercetina apresentou uma CIM de 83,5 $\mu\text{g/mL}$ frente à *S. aureus* e a catequina uma CIM de 400 $\mu\text{g/mL}$ frente à *P. aeruginosa*. Os alcaloides reticulina e N-óxido de reticulina foram submetidos ao método de redução de MTT para avaliação da atividade antileishmania frente à *L. amazonensis*, e estes não apresentaram atividade.

Palavras-chave: Lauraceae, *Ocotea gardneri*, *Ocotea duckei*, alcaloides, atividade biológica.

ABSTRACT

TELES, M. M. S. R. **Contribution to the phytochemical study of *Ocotea gardneri* (Meisn) Mez and *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae)**. 2016. 115 p. Thesis (Doctorate in of Natural Products and Synthetic Bioactive- Pharmacchemistry) - Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2016.

The Lauraceae family consists of about 70 genera and 2.500 species, with tropical and subtropical distribution. In Brazil, comprises 400 species in 25 genera. Among these, we highlight the *Ocotea* genus with about 350 species. This study aimed to carry out the phytochemical study *Ocotea duckei* Vattimo and *Ocotea gardneri* (Meisn) Mez, as well as to assess the antimicrobial activity and antileishman of isolated chemical constituents. For this, the plant material was subjected to extraction processes, partition and chromatography methods to isolate the chemical constituents. The chemical structures of the compounds were determined by spectroscopic methods and comparisons with literature data. Chromatographic fractionation of the dichloromethane phase *Ocotea gardneri* resulted in the isolation of triterpene 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexeno (squalene) of 3, 4, 5 trimethoxybenzaldehyde and glycosylated sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside the ethyl acetate phase was isolated flavone steroid 3,5,7,3', 4'-pentaidroxiflavona (quercetin) and two flavonols 2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-4H-chromene-3,5,7-triol (epicatechin) and 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4H-chromene-3,5,7-triol (epicatechin). All compounds are first reported in this species. To obtain the fraction of total alkaloids (FAT), the crude ethanolic extract of leaves of *Ocotea duckei* underwent alkaloid march and then the chromatographic fractionation, resulting in the isolation of reticulín and N-oxide reticulín alkaloid, which is reported for the first time in the genus. Further, the FAT was analyzed by LC-MS and GC-MS. LC-MS allowed the identification of reticulín alkaloids, coclaurina, discretamina, tetrahydrocolumbamina and N-oxide reticulín. The FAT analysis by GC-MS allowed the identification of metilreticulina metilcoclaurina and alkaloids. Of these alkaloids, only reticulín was identified to FAT leaves in previous studies. Flavonoids isolates were evaluated for antimicrobial activity by microdilution technique, compared to strains of *S. mutans*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Quercetin presented a MIC of 83.5 mg / mL against *S. aureus* and catechin one MIC of 400 mg / mL against the *P. aeruginosa*. The reticulín alkaloids and reticulín N-oxide were subjected to MTT reduction method to evaluate the activity antileishmania front of *L. amazonensis*, and they did not show activity

Keywords: Lauraceae, *Ocotea gardneri*, *Ocotea duckei*, alkaloids, activity biologic.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt	Acetato de etila
APT	<i>Attached Proton Test</i>
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada Analítica
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
CG	Cromatografia gasosa
CIM	Concentração inibitória mínima
CH₂Cl₂	Diclorometano
C₂H₃N	Acetonitrila
C₅D₅N	Piridina deuterada
CH₃OH	Metanol
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-DAD	Cromatografia líquida acoplada ao arranjo de diodo
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetil sulfóxido deuterado
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EM	Espectrometria de Massas
EtOH	Etanol

FAT	Fração de Alcaloides Totais
HCl	Ácido clorídrico
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
LABDIC	Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas
LABIAL	Laboratório de Biologia Bucal
<i>m</i>	Multiplete
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol- 2- il)- 2,5-difenil-tetrazólio
Na₂SO₄	Sulfato de sódio
NH₄OH	Hidróxido de amônia
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
PFF	Pirofosfato de Farnesila
ppm	Partes por milhão
σ	Deslocamento químico em ppm
RDA	Retro Diels Alder
Rf	Fator de retenção
RT	Tempo de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Triplete
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UNICAL	Unidade de Caracterização e Análise
UV	Ultravioleta

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Etapas envolvidas na obtenção e particionamento do EEB das duas espécies	34
Esquema 2 Obtenção do extrato e particionamento da <i>Ocotea gardneri</i>	35
Esquema 3 Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase diclorometano do EEB das partes aéreas de <i>Ocotea gardneri</i>	36
Esquema 4 Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase acetato de etila do EEB das partes aéreas de <i>Ocotea gardneri</i>	38
Esquema 5 Marcha de Alcaloides de <i>Ocotea duckei</i>	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa de distribuição da família Lauraceae no mundo representado em verde	5
Figura 2 Distribuição das espécies de <i>Ocotea</i> por domínio fitogeográfico	7
Figura 3 Estrutura química do safrol	8
Figura 4 Estrutura e numeração padrão dos flavonoides.....	11
Figura 5 Flavonoides isolados de <i>Ocotea</i>	11
Figura 6 Imagens do caule, folhas e inflorescências da <i>Ocotea duckei</i> Vattimo	21
Figura 7 Imagens de <i>Ocotea gardneri</i>	25
Figura 8 Estrutura do Esqualeno	48
Figura 9 Espectro de RMN de ^{13}C -APT ^1H de <i>Og-1</i> (200 MHz, CDCl_3).....	49
Figura 10 Espectro de RMN de ^1H de <i>Og-1</i> (50 MHz, CDCl_3)	49
Figura 11 Espectro de RMN ^1H de <i>Og-2</i> (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	51
Figura 12 Espectro de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz) de <i>Og-2</i>	51
Figura 13 Espectro de RMN de ^1H de <i>Og-3</i> (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).....	55
Figura 14 Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Og-3</i> na região de 5,5 a 3,8 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)	55
Figura 15 Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de <i>Og-3</i> na região de 154 a 101 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)	56
Figura 16 Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de <i>Og-3</i> na região de 80 a 45 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)	56
Figura 17 Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de <i>Og-3</i> na região de 44 a 10 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)	57
Figura 18 Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Og-4</i> (CD_3COCD_3 , 200 MHz)....	60
Figura 19 Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Og-4</i> (CD_3COCD_3 , 200 MHz)....	60
Figura 20 Espectro de RMN de ^{13}C de <i>Og-4</i> (CD_3COCD_3 , 50 MHz)	61
Figura 21 Espectro de RMN de ^1H de <i>Og-5</i> (CD_3OD , 200 MHz).	64
Figura 22 Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Og-5</i> (CD_3OD , 200 MHz).	64

Figura 23 Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Og-5</i> (CD_3OD , 200 MHz).	65
Figura 26 Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Og-6</i> (CD_3OD , 200 MHz).	68
Figura 27 Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Og-6</i> (CD_3OD , 200 MHz).	69
Figura 28 Espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Og-6</i> (CD_3OD , 50 MHz).	69
Figura 29 Espectro de RMN ^1H de <i>Od-2</i> (CD_3OD , 500 MHz).....	73
Figura 30 Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>Od-2</i> (CD_3OD , 500 MHz)	74
Figura 31 Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>Od-2</i> (CD_3OD , 500 MHz).....	74
Figura 32 Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>Od-2</i> (CD_3OD , 500 MHz).....	75
Figura 34 Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>Od-2</i> (CD_3OD , 125 MHz)....	76
Figura 35 Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>Od-2</i> (CD_3OD , 125 MHz).....	76
Figura 36 Espectro de HMBC de <i>Od-2</i> (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	77
Figura 37 Expansão do espectro de HMBC de <i>Od-2</i> (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	77
Figura 38 Expansão do espectro de HMBC de <i>Od-2</i> (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	78
Figura 39 Cromatograma LC-MS obtido para a fração de alcaloides totais (FAT) de <i>Ocotea duckei</i>	79
Figura 40 Espectro de massas do composto TR = 16,001 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS).....	80
Figura 41 Espectro de massas do composto TR = 16,001 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS).....	81
Figura 42 Proposta de fragmentação da reticulina (JEONG et al., 2012)	81
Figura 43 Espectro de massas do composto TR = 10,81 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS).....	82
Figura 44 Espectro de massas do composto TR = 10,81 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS).....	83
Figura 45 Proposta de fragmentação da coclaurina	83
Figura 46 Espectros de massas do composto TR = 10,47 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS).....	84
Figura 47 Espectro do composto TR = 10,47 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS)	84

Figura 48 Proposta de fragmentação do tipo retro Diels Alder da discretamina (FERREIRA, 2016)	86
Figura 49 Espectros de massas do composto TR = 11,40 min obtido da fração de alcaloides (LC-MS)	87
Figura 50 Espectro de fragmentação do composto TR = 11,40 min obtido da fração de alcaloides (LC-M).....	87
Figura 51 Proposta de fragmentos obtidos da fragmentação do tipo retro Diels Alder da tetrahidrocolumbamina.....	88
Figura 52 Proposta do mecanismo de fragmentação para alcaloides tetrapoberberínicos	89
Figura 53 Espectro de massas da N-óxido de reticulina (LC-MS).....	90
Figura 54 Espectro de massas da N-óxido de reticulina (LC-MS).....	90
Figura 56 Cromatograma CG-MS obtido para a fração de alcaloides totais de <i>Ocotea duckei</i>	92
Figura 57 Espectro de massas da metilreticulina obtido da fração de alcaloides totais (CG-MS).....	93
Figura 58 Proposta de fragmentação da metilreticulina	94
Figura 59 Espectro de massas do composto TR = 14,99 min obtido da fração de alcaloides totais (CG-MS)	95
Figura 60 Proposta de fragmentação da metilcoclaurina	95
Figura 61 Imagem da placa de análise da atividade antileishmania das substâncias..	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Lignoides isoladas de espécies do gênero <i>Ocotea</i>	9
Quadro 2 Principais sesquiterpenos encontrados em <i>Ocotea</i>	10
Quadro 3 Principais esqueletos de alcaloides aporfínicos de <i>Ocotea</i>	13
Quadro 4 Rota biossintética para a formação da estrutura benzilisoquinolínica a partir da <i>L</i> -tirosina	14
Quadro 5 Origem biossintética dos alcaloides isoquinolínicos a partir do esqueleto benzilisoquinolínico	15
Quadro 6 Alcaloides isolados do gênero <i>Ocotea</i>	16
Quadro 7 Substâncias isoladas de <i>Ocotea duckei</i>	23
Quadro 8 Estrutura dos alcaloides identificados na FAT de <i>Ocotea duckei</i>	96
Quadro 9 Estrutura dos flavonoides testados para atividade antimicrobiana e utilizados na comparação dos dados	99
Quadro 10 Estrutura dos alcaloides belzilisoquinolínicos testados para atividade antimicrobiana e utilizados na comparação dos dados.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Alcaloides isolados de espécies de <i>Ocotea</i>	18
Tabela 2 Composição (%) dos óleos essenciais obtidos das folhas e cascas de caule de <i>O. gardneri</i> (Meisn) Mez	26
Tabela 3 Massa do material botânico seco, e massas obtidas após particionamento das partes aéreas de <i>Ocotea gardneri</i>	33
Tabela 4 Condições de análise por CG-EM, utilizando coluna capilar HP5-MS.....	40
Tabela 5 Condições do modo gradiente do UHPLC	41
Tabela 6 Condições do Espectrômetro de Massas no modo ESI positivo.....	41
Tabela 7 Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) de <i>Og-1</i> com dados da literatura (CURSINO et al., 2009) em CDCl_3	48
Tabela 8 Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Og-2</i> em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (200 e 50 MHz, respectivamente).....	50
Tabela 9 Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para <i>Og-3</i> ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δC^* , (δ em ppm e J em Hz) .	54
Tabela 10 Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Og-4</i> em CD_3COCD_3 (200 e 50 MHz, respectivamente).....	59
Tabela 11 Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Og-5</i> em CD_3OD (200 e 50 MHz, respectivamente).....	63
Tabela 12 Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Og-6</i> em CD_3OD (200 e 50 MHz, respectivamente).....	67
Tabela 13 Dados de RMN ^{13}C de <i>Od-2</i> (CD_3OD , 125 MHz) em comparação com dados da literatura.	71
Tabela 14 Atividade antibacteriana de flavonoides isolados de <i>Ocotea gardneri</i>	97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
2.1 Considerações sobre a família Lauraceae.....	5
2.2 O gênero <i>Ocotea</i>	6
2.2.1 Metabólitos secundários do gênero <i>Ocotea</i>	7
2.2.1.1 Fenilpropanoides	8
2.2.1.2 Lignanas e Neolignanas.....	8
2.2.1.3 Terpenoides	10
2.2.1.4 Flavonoides.....	10
2.2.1.5 Alcaloides	12
2.3 <i>Ocotea duckei</i> Vattimo	20
2.4 <i>Ocotea gardneri</i> (Meisn) Mez.....	24
2.5 Importância dos estudos da Atividade Antimicrobiana.....	27
2.6 Importância dos estudos da Atividade Antileishmania	27
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Estudo fitoquímico	32
4.1.1 Material vegetal	32
4.1.2 Processamento do material vegetal.....	32
4.1.3 Obtenção dos extratos.....	32
4.1.4 Particionamento do extrato de <i>Ocotea gardneri</i>	32
4.1.5 Processamento cromatográfico da fase diclorometano das partes aéreas de <i>Ocotea gardneri</i>	35

4.1.6	Processamento cromatográfico da fase acetato de etila do EEB das partes aéreas	37
4.1.7	Marcha de Alcaloides para <i>Ocotea duckei</i>	38
4.1.8	Extração e isolamento dos alcaloides	39
4.1.9	Análise da fração de alcaloides totais (FAT).....	40
4.1.9.1	Análise dos alcaloides por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).....	40
4.1.9.2	Análise dos alcaloides por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-EM)	40
4.1.10	Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados.....	41
4.1.10.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	41
4.1.10.2	Ponto de fusão	42
4.2	Estudo farmacológico	43
4.2.1	Atividade antimicrobiana dos flavonoides isolados de <i>Ocotea gardneri</i>	43
4.2.1.1	Local de Pesquisa	43
4.2.1.2	Métodos	43
4.2.2	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antileishmania dos alcaloides isolados de <i>Ocotea duckei</i>	44
4.2.2.1	Local da pesquisa.....	44
4.2.2.2	Métodos	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Estudo fitoquímico	47
5.1.1	Substâncias isoladas de <i>Ocotea gardneri</i>	47
5.1.1.1	Identificação estrutural do <i>Og-1</i>	47
5.1.1.2	Identificação estrutural de <i>Og-2</i>	50
5.1.1.3	Identificação estrutural de <i>Og-3</i>	52
5.1.1.4	Identificação estrutural de <i>Og-4</i>	58
5.1.1.5	Identificação estrutural de <i>Og-5</i>	62
5.1.1.6	Identificação estrutural de <i>Og-6</i>	66
5.1.2	Substâncias isoladas das partes aéreas de <i>Ocotea duckei</i>	70

5.1.2.1 Determinação estrutural de <i>Od-1</i>	70
5.1.2.2 Determinação estrutural de <i>Od-2</i>	70
5.1.3 Análise da Fração de Alcaloides Totais (FAT) de <i>Ocotea duckei</i>	79
5.1.3.1 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS)	79
5.1.3.1.1 Identificação da reticulina	79
5.1.3.1.2 Identificação da coclaurina	82
5.1.3.1.3 Identificação da discretamina/scoulerina.....	84
5.1.3.1.4 Identificação da Tetrahydrocolumbamina	86
5.1.3.1.5 Identificação de N-óxido de reticulina	89
5.1.3.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS)	92
5.1.3.2.1 Identificação da metilreticulina	93
5.1.3.2.2 Identificação da metilcoclaurina.....	94
5.1.3.3 Estruturas dos alcaloides identificados na FAT <i>Ocotea duckei</i>	96
5.2 Estudo farmacológico	97
5.2.1 Atividade antimicrobiana	97
5.2.2 Atividade antileishmania	100
6. CONCLUSÕES	103
7. REFERÊNCIAS	105



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos fármacos em uso clínico são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma destas alternativas de sucesso, historicamente privilegiada (BARREIRO; SILVA-BOLZANI, 2009). A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o Reino Vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos (MONTANARI; SILVA-BOLZANI, 2001).

A enorme variedade e complexidade de metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas teriam-se formado e evoluído, como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais. As atividades biológicas que as plantas medicinais apresentam, geralmente, são atribuídas a esses metabólitos (FERREIRA; PINTO, 2010).

Há muitos exemplos históricos em que o produto natural não foi apenas o medicamento, mas também ajudou a revelar um novo aspecto da farmacologia. Por exemplo, digitalis da dedaleira mostraram o papel bloqueador da bomba sódio - potássio - ATPase; a morfina apontou o caminho para os receptores afetados por opióides endógenos; muscarina, nicotina e tubocurarina ajudaram a explorar os diferentes tipos de receptores de acetilcolina, e assim por diante. (HARVEY, 2008).

O surgimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana aliado ao desenvolvimento marcante de fármacos sintéticos produzidos pela indústria farmacêutica, logo depois da Segunda Guerra, foram causas marcantes no declínio do uso de plantas medicinais e conseqüentemente, no investimento em fármacos de origem vegetal. Nas últimas décadas, uma importante mudança no paradigma das sociedades ocidentais fez com que os produtos de plantas passassem novamente a ocupar papel de destaque por grandes contingentes das populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento (MONTANARI; SILVA-BOLZANI, 2001).

Segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas. A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de

substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos. A Caatinga apresenta-se como o bioma predominante na Paraíba e caracteriza-se pelo alto endemismo das espécies e tipos vegetais. A Caatinga é o único bioma vegetal brasileiro cujos limites estão restritos ao território nacional. A Mata Atlântica tem distribuição menos expressiva, no entanto é mais estudada devido sua heterogeneidade (BARREIRO; SILVA-BOLZANI, 2009).

Assim, considerando o potencial químico-farmacológico das espécies vegetais encontradas nos biomas paraibanos, em especial da família Lauraceae, este trabalho dá continuidade ao estudo de *Ocotea duckei* Vattimo, e apresenta o estudo de *Ocotea gardneri* (Meisn) Mez, cujos estudos químicos e farmacológicos ainda são pouco conhecidos.

A descoberta de produtos naturais bioativos constitui, portanto, não apenas uma necessidade de sua identificação própria, mas, principalmente, contribui para o conhecimento de novas entidades químicas (NCEs), que podem ser usadas como matrizes para a descoberta de novos fármacos (MONTANARI; SILVA-BOLZANI, 2001).



**FUNDAMENTAÇÃO
TEORICA**

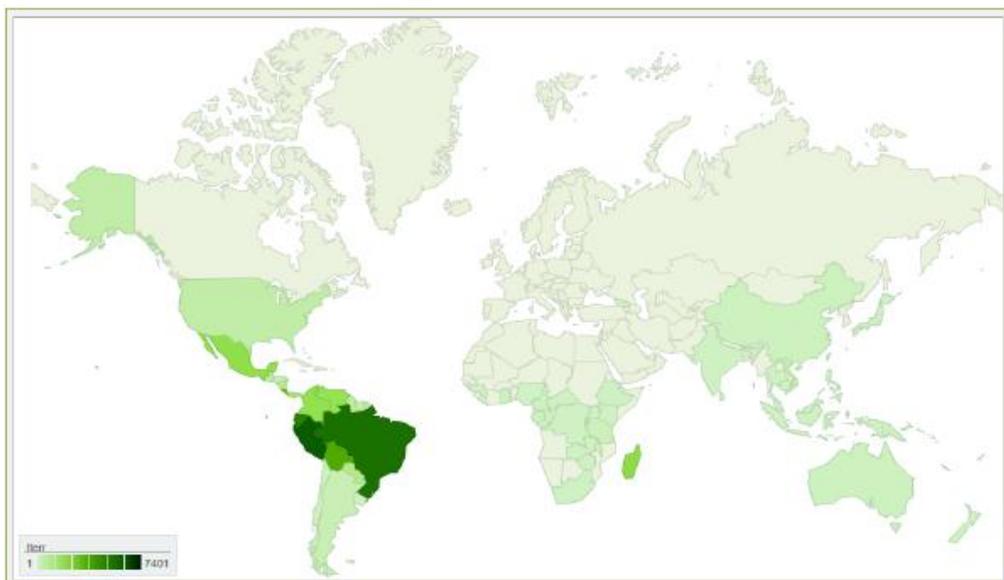
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Considerações sobre a família Lauraceae

A família Lauraceae, pertencente à ordem Laurales, é considerada uma das famílias mais primitivas da divisão Magnoliophyta (STEVENS, 2016). Foi estabelecida por Antoine Laurent de Jussieu em 1789 e o conhecimento de suas espécies data de 2800 a.C., com relatos do uso do óleo de *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl e de outras espécies do gênero na medicina chinesa. As folhas de *laurus nobilis* L., eram usadas como grinaldas pelos antigos gregos e romanos para coroar guerreiros e atletas (GOTTLIEB, 1972).

Suas espécies apresentam distribuição tropical e subtropical (Figura 1), concentradas nas florestas temperadas americanas e asiáticas, incluindo cerca de 70 gêneros com mais de 2500 espécies. São encontradas particularmente em países com focos de biodiversidade. No Brasil ocorrem aproximadamente 400 espécies distribuídas em 25 gêneros. Lauraceae é considerada a família 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 (CUSTÓDIO; VEIGA JUNIOR, 2014).

Figura 1 Mapa de distribuição da família Lauraceae no mundo representado em verde



Fonte: Missouri Botanical Garden, 2015.

As espécies da família Lauraceae são consideradas uma das mais importantes economicamente, dentre aquelas encontradas nas florestas equatoriais e tropicais, em virtude da boa qualidade da madeira, podendo ser usada na marcenaria, fabricação de papel (celulose), construção civil. Os óleos essenciais extraídos de suas espécies possuem um alto valor comercial, podendo ser usado nas indústrias de cosméticos, farmacêuticas, de perfumaria e também na culinária, como condimentos e flavorizantes (SILVA et al, 2009).

A pressão extrativista sobre espécies madeiráveis resultou na diminuição de populações de Lauraceae, e as espécies *Ocotea catharinensis* Mez, *Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer e *Ocotea porosa* (Nees) Barroso, que ocorrem no Paraná, estão incluídas na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (LORENZI; MATOS 2008). A sua importância econômica e a inexistência de programas efetivos de manejo florestal, contribuem para a extinção da maior parte das suas espécies. A exploração econômica deve ser feita de maneira sustentável, como preconiza a Química Verde, a fim de não esgotar o potencial e grande contribuição das espécies para a sociedade (ARAÚJO, 1994).

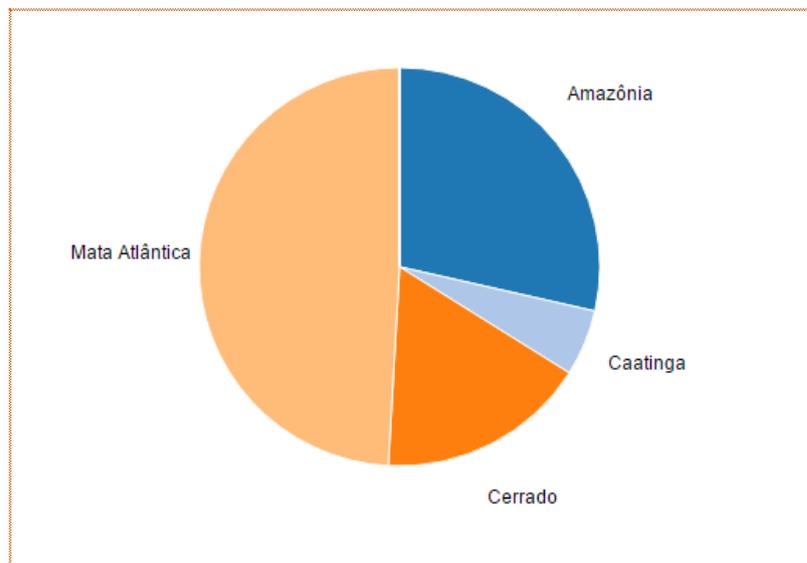
2.2 O gênero *Ocotea*

O gênero *Ocotea* foi estabelecido por Aublet em 1775 com a espécie *Ocotea guianensis*, sendo considerado o maior gênero da família Lauraceae. Apresenta cerca de 350 espécies, a maioria nas Américas tropical e subtropical. Estima-se que o Brasil abriga aproximadamente 160 espécies vegetais deste gênero (QUINET et al., 2016). Suas espécies não possuem constância na frutificação, fato que dificulta sua propagação (ZANIN; LORDELLO, 2007).

Em relação às suas características botânicas, compreende árvores ou arbustos, com flores monoclinais ou diclinas, com 6 tépalas, as flores estaminadas, androceu com 9 estames férteis, anteras quadriloculares, locelos dispostos em pares superpostos; estames das primeiras e segundas séries com três estames cada, anteras introrsas; estames de terceira série com três estames, par de glândulas na base dos filetes, reduzidos, anteras extrorsas; quarta série estaminodial ausente ou quando presente com três estaminódios, em geral reduzidos, filiformes, ou raramente estaminódios bem desenvolvidos, cordados ou sagitados; pistiloide presente ou ausente. Flores pistiladas com estaminódios reduzidos. Fruto bacáceo, sobre ou parcialmente envolvido pela cúpula, em geral com margem simples e tépalas decíduas (QUINET; ANDREATA 2002).

O gênero *Ocotea* desperta o interesse fitoquímico devido a sua distribuição em todo território nacional (Figura 2), e pelas inúmeras atividades farmacológicas atribuídas às lignanas e alcaloides presentes em suas espécies (SOUZA et al., 2004).

Figura 2 Distribuição das espécies de *Ocotea* por domínio fitogeográfico



Fonte: Flora do Brasil, 2016

Segundo pesquisa realizada no banco de dados Natural Products Alert (NAPRALERT) em 2009, as espécies do gênero *Ocotea* apresentam propriedades medicinais variadas como tônico e estomáquico (*O. aciphyla*), úlceras (*O. caparrapi*), dor de cabeça (*O. bullata*), febre, tosse (*O. species*), cólicas menstruais (*O. nicaraguensis*), diarreia (*O. quixos*), antihipertensivo (*O. foetens*), antimalárico (*O. usambarensis*), dentre outras.

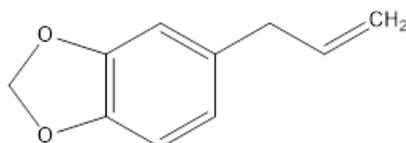
2.2.1 Metabólitos secundários do gênero *Ocotea*

Diversas pesquisas têm sido conduzidas com diferentes espécies de *Ocotea*, visando o isolamento e a caracterização de compostos químicos. Quimicamente este gênero caracteriza-se por apresentar, em sua composição, metabólitos secundários, fenilpropaídeos, alcaloides isoquinolínicos, indólicos e aporfínicos; lignanas, neolignanas, além de terpenóides (FUNAZAKI, 2006).

2.2.1.1 Fenilpropanoides

Os fenilpropanoides são de ocorrência muito frequente no gênero e frequentemente estão presentes nas frações voláteis obtidas junto com mono e sesquiterpenos. São normalmente do tipo alil ou propenilfenóis, cujo precursor básico é a fenilalanina que através de uma série de transformações, os quais incluem a formação do ácido cinâmico, resulta na formação de aldeídos, cetonas e álcoois. O fenilpropanoide mais comum no gênero é o safrol (Figura 3), constituinte principal do óleo de sassafrás obtido de *O. odorífera*, *O. pretiosa* e *O. fragrantíssima* (COSTA, 2000).

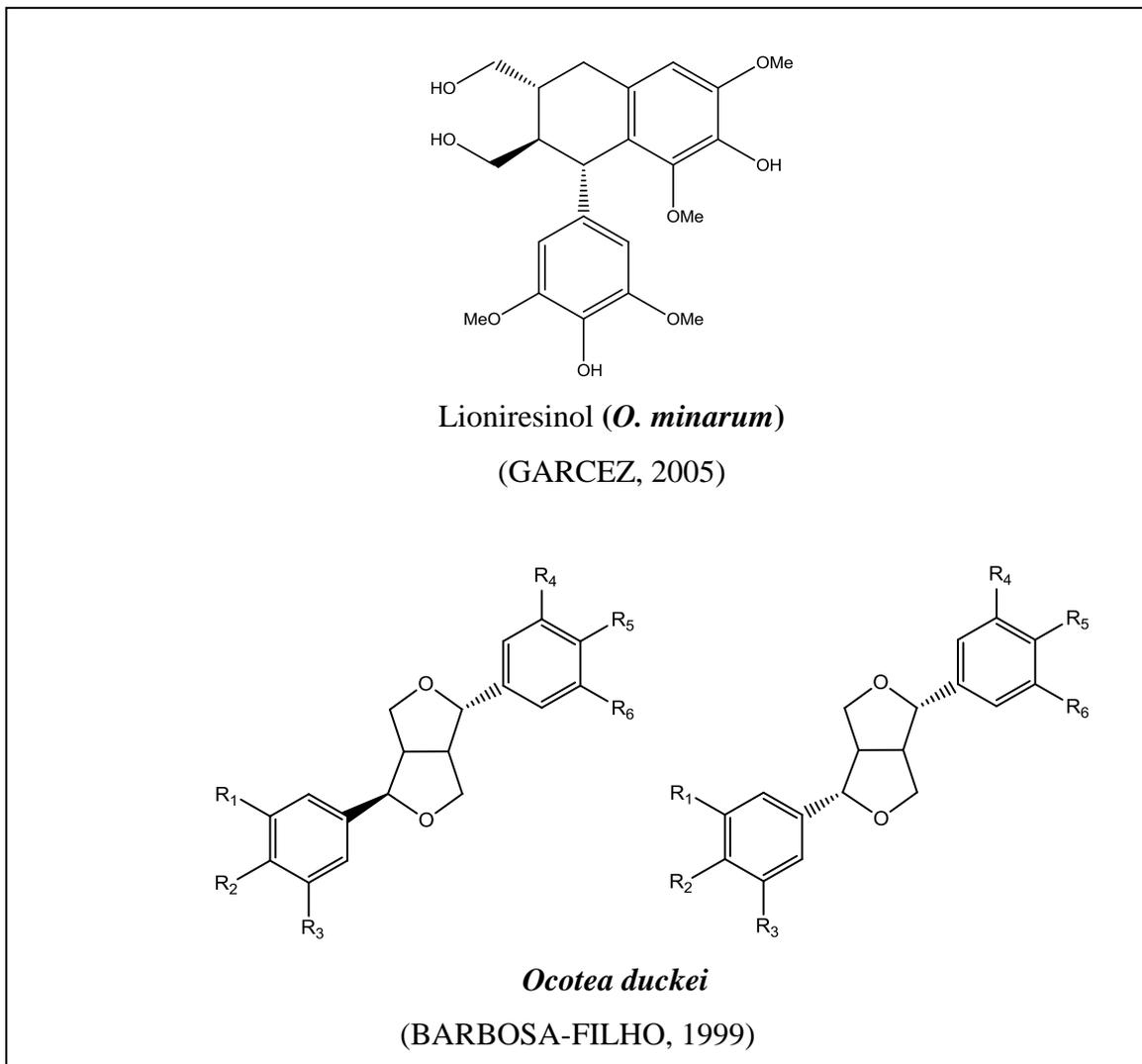
Figura 3 Estrutura química do safrol



2.2.1.2 Lignanas e Neolignanas

Os lignoides são produtos naturais que possuem sua estrutura básica formada por grupos fenilpropanoides (do tipo C₆C₃), condensados em algumas unidades (BARBOSA-FILHO, 2007).

Destacam-se as lignanas furofurânicas isoladas de *O. duckei* (Quadro 1) (BARBOSA-FILHO et al., 1999). As neolignanas constituem-se no principal grupo biogenético de Lauraceae, devido a elevada frequência, e apresentam grande variedade de constituintes e configurações (GOTTLIEB; YOSHIDA, 1984).

Quadro 1 Lignoides isoladas de espécies do gênero *Ocotea*

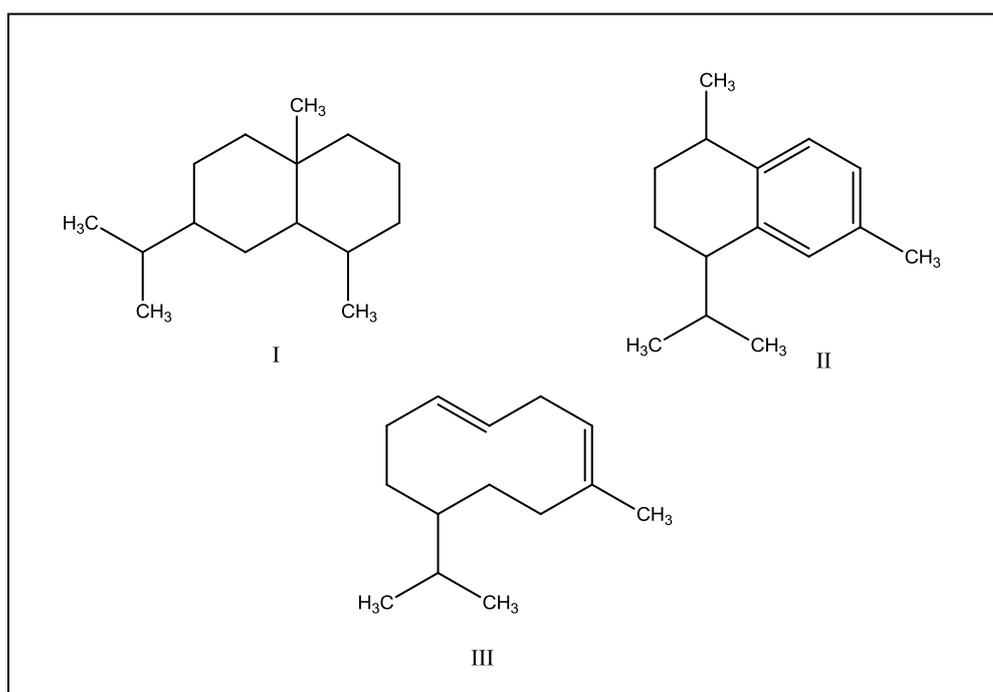
A distinção precisa entre lignanas e neolignanas foi motivo de controvérsias. Várias propostas de acoplamento e dímeros foram sugeridas para a formação desses metabólitos. Gottlieb (1972) estudando a química da Lauraceae, introduziu o termo neolignana, que posteriormente foi definido como metabólitos formados a partir da condensação oxidativa de alifenois e propenilfenois, entre si ou de forma cruzada, sem oxigenação no C-9. As lignanas são dímeros de ácidos cinâmicos e/ou álcoois cinamílicos, apresentando o carbono 9 da cadeia lateral oxigenado.

2.2.1.3 Terpenoides

Os terpenoides ocorrem com frequência no gênero, e na maioria das vezes são constituintes típicos de óleo essencial. A composição química dos óleos essenciais de várias espécies de *Ocotea* já foi descrita, revelando a presença de uma grande diversidade de monoterpenos, com predominância de α -pineno e β -pineno, além dos sesquiterpenos β -cariofileno e germacreno-D (TAKAKU et al., 2007; GARRETT et al., 2010; FARAGO et al., 2010).

Também foram encontrados em extratos de folhas e cascas de espécies de *Ocotea* outros sesquiterpenos, principalmente com esqueletos eudesmânicos (I), calamenênicos (II) e cadinânicos (III) (Quadro 2)) (LORDELLO et al., 2000).

Quadro 2 Principais sesquiterpenos encontrados em *Ocotea*

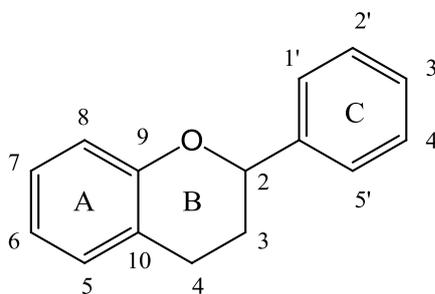


2.2.1.4 Flavonoides

São compostos aromáticos de baixo peso molecular caracterizado por um núcleo flavânico e um esqueleto carbonado com configuração C6-C3-C6. A estrutura básica dos flavonoides consiste em dois anéis de benzeno (A e B) ligados por um anel pirano que contém oxigênio (anel C). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato-polimalato, enquanto o anel

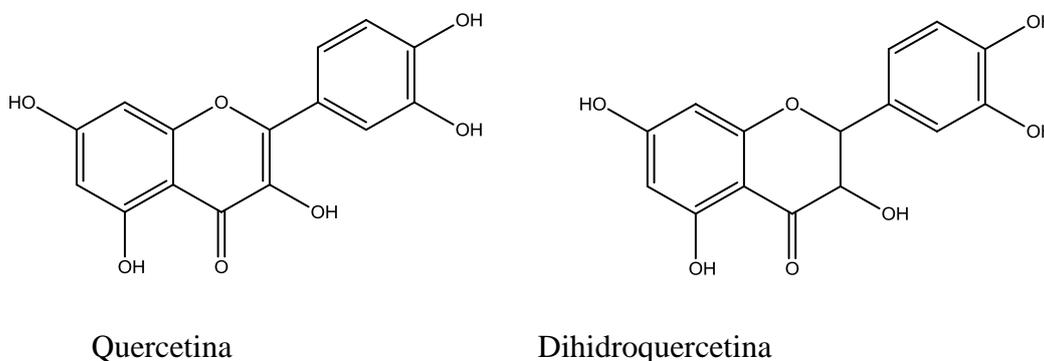
B é derivado da fenilalanina. A numeração individual do esqueleto flavonoide está representada na Figura 4 (MARTENS; MITHÖFER, 2005).

Figura 4 Estrutura e numeração padrão dos flavonoides



Os flavonoides são uma classe biossintética frequente no reino vegetal, mas a diversidade tem ocorrência restrita em Lauraceae. Encontram-se catequina, epicatequina, e flavonoides glicosilados (Figura 5). A maioria dos flavonoides isolados até o momento em *Ocotea* são derivados das agliconas quercetina e de dihidroquercetina e essa característica parece ser comum para o gênero (FUNASAKI, 2006).

Figura 5 Flavonoides isolados de *Ocotea*



Relatos apontam que os flavonoides possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica antitumoral, efeitos no tratamento de doenças neurodegenerativas e ação vasodilatadora. São ainda conhecidos por inibir a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária e a atividade enzimática das enzimas ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) (ASIF; KHODADADI, 2013).

Os flavonóides tem sido identificados e caracterizados como agentes antifúngicos, antivirais e antibacterianos, e estudos também mostram que existe um sinergismo entre estes diferentes compostos. Alguns trabalhos mostram que a sua ação dá-se principalmente através de sua capacidade de interação com a membrana plasmática, inibindo sua função, e

consequentemente levando a destruição da integridade celular. Por outro lado, alguns flavonóides podem inibir a atividade de DNA girase, e outros podem inibir o metabolismo energético bacteriano (CUSHNIE & LAMB, 2006).

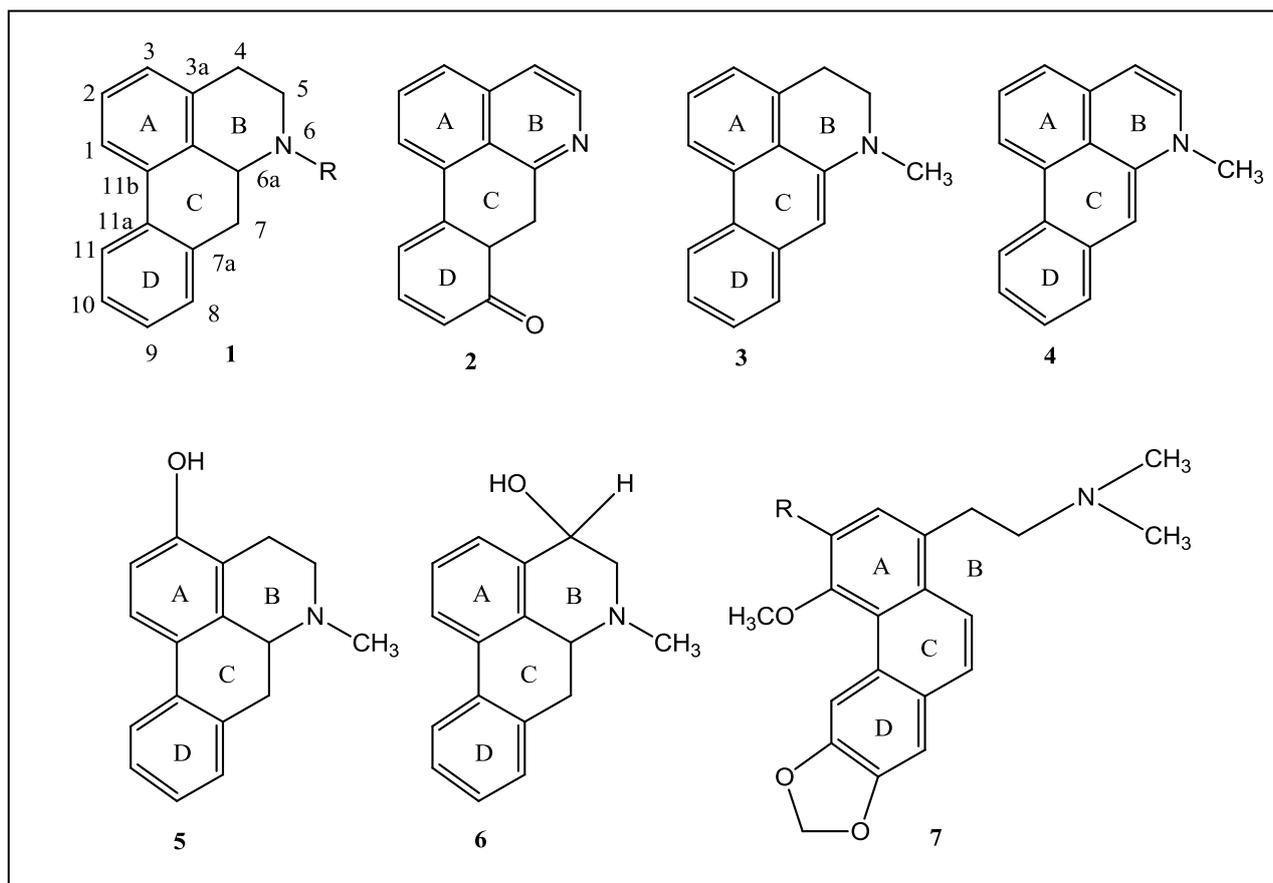
2.2.1.5 Alcaloides

Os alcaloides constituem um grupo de substâncias bastante frequente em suas espécies (Tabela 1, página 18). Foram identificados alcaloides isoquinolínicos, benzilisoquinolínicos, bisbelzilisoquinolínicos (CUSTÓDIO; VEIGAS JUNIOR, 2014). Os aporfínicos *strictu sensu* representam o grupo predominante (ZANIN; LORDELLO, 2007). No Quadro 3 temos os principais esqueletos de alcaloides encontrados em *Ocotea*.

Os alcaloides aporfínicos são encontrados somente em espécies das famílias: Annonaceae, Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Ranunculaceae, Papaveraceae e Rhamnaceae (RINALDI, 2007).

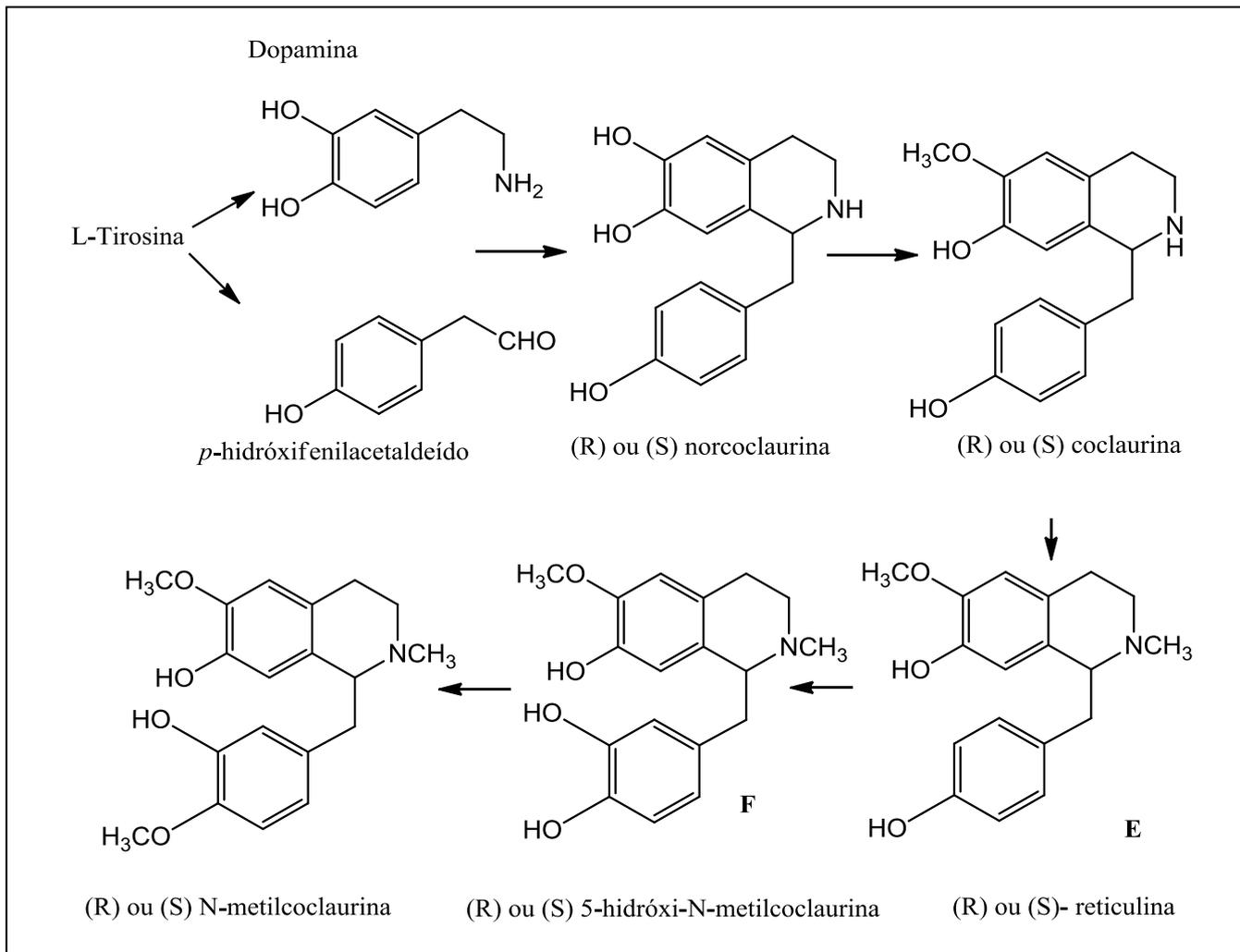
A origem biossintética dos alcaloides isoquinolínicos se inicia pela rota do ácido chiquímico a partir de carboidratos. O ácido chiquímico é responsável pela formação dos aminoácidos aromáticos como a *L*-fenilalanina e *L*-tirosina, sendo esses os precursores dos alcaloides isoquinolínicos. A formação biossintética do esqueleto benzilisoquinolínico tem início com a reação de condensação de duas unidades fenólicas, ambas derivadas do aminoácido *L*-tirosina, a dopamina e o *p*-hidróxi-fenilacetaldeído. A rota biossintética a partir de *L*-tirosina para formação de estrutura benzilisoquinolínica é mostrada no Quadro 4 (RINALDI, 2007). A origem desses alcaloides, a partir de seu provável precursor, a reticulina, é mostrada na Quadro 5 (CAVÉ, 1985).

Vários alcaloides aporfínicos comumente encontrados no gênero *Ocotea* apresentam pronunciada bioatividade, como a nantenina (bloqueador de contração muscular, translocação de Ca^{2+}), derivados da nantenina (antagonista $\alpha 1$ -adrenoreceptor), coclaurina (anti-HIV), glaucina (citotóxica), derivados halogenados da predicentrina (agonista dos receptores dopaminérgicos D1), dicentrina (inibição da topoisomerase II, atividade antineoplásica), dicentrinona (inibição da topoisomerase I), inclusive vários deles tendo sido alvo de patentes, o que tem acarretado um grande interesse nessa classe de compostos (ZANIN; LORDELLO, 2007). No Quadro 6 observamos os principais alcaloides encontrados em *Ocotea*.

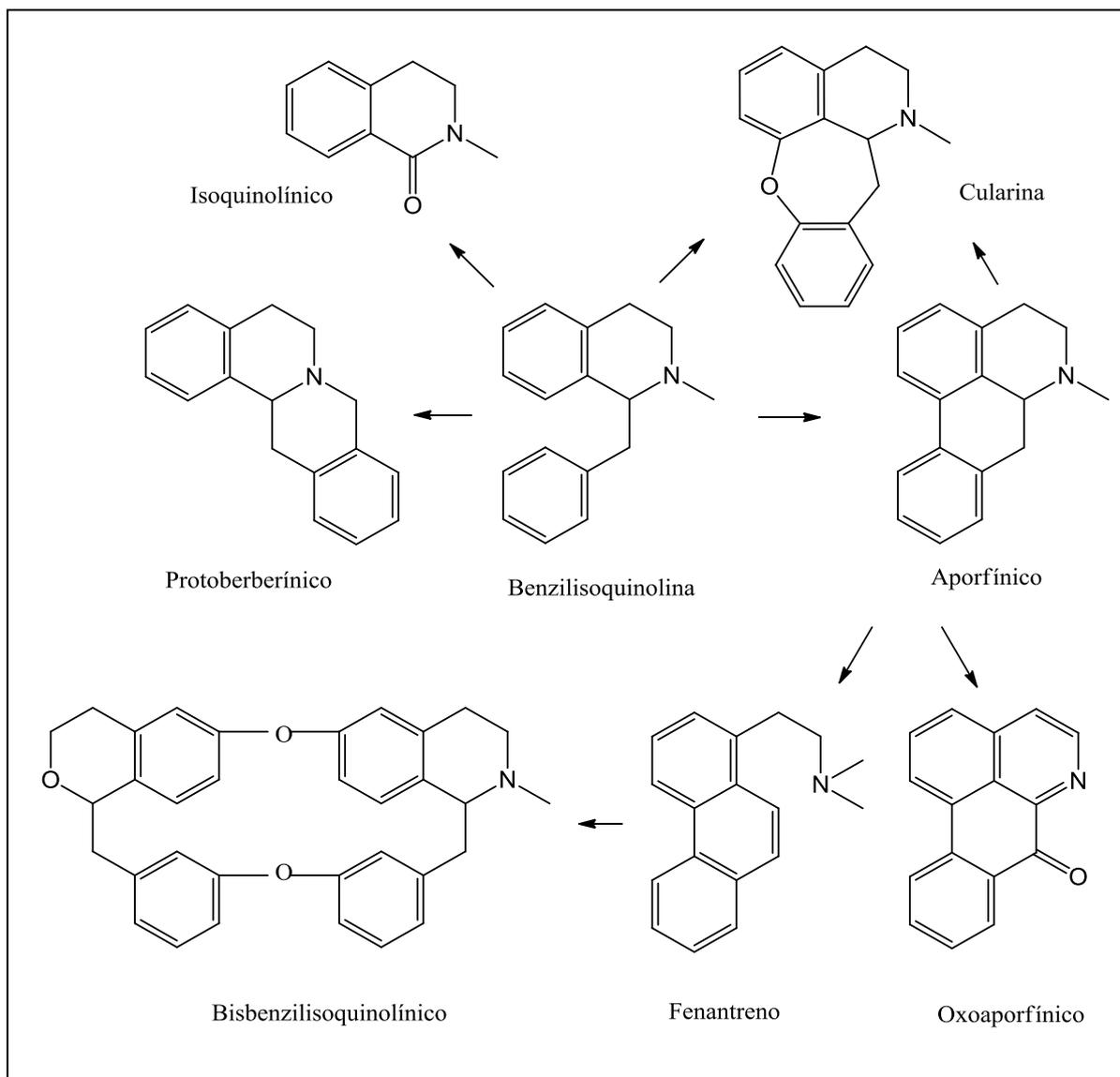
Quadro 3 Principais esqueletos de alcaloides aporfínicos de *Ocotea*

1-Aporfínico *strictu sensu*; **2-**Oxoaporfínico; **3-**Dihidroaporfínico, **4-**Didehidroaporfínico, **5-**C-3-aporfínico; **6-**C-4-aporfínico; **7-**Fenantreno (RINALDI, 2007).

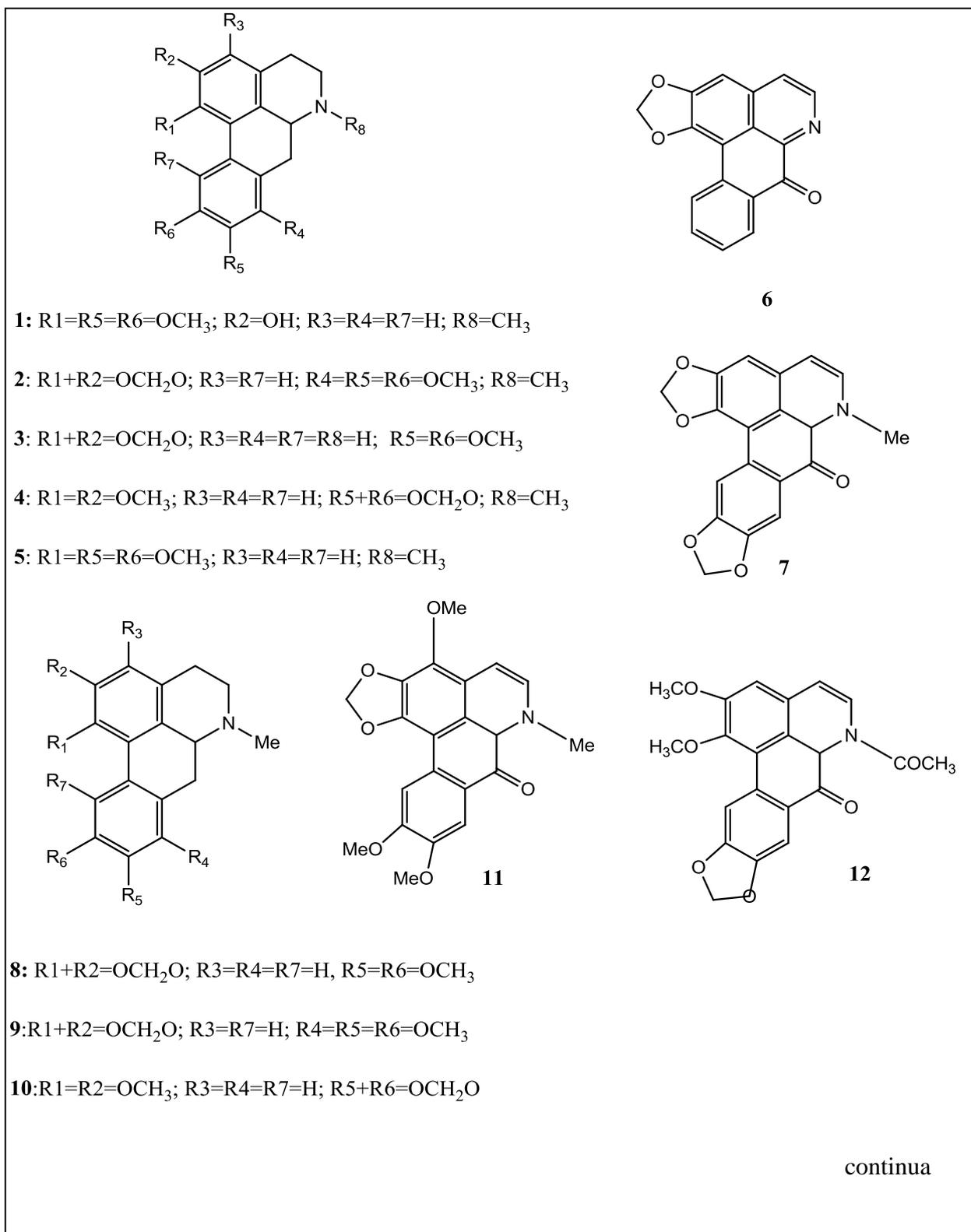
Quadro 4 Rota biossintética para a formação da estrutura benzilisoquinolínica a partir da *L*-tirosina (RINALDI, 2007)



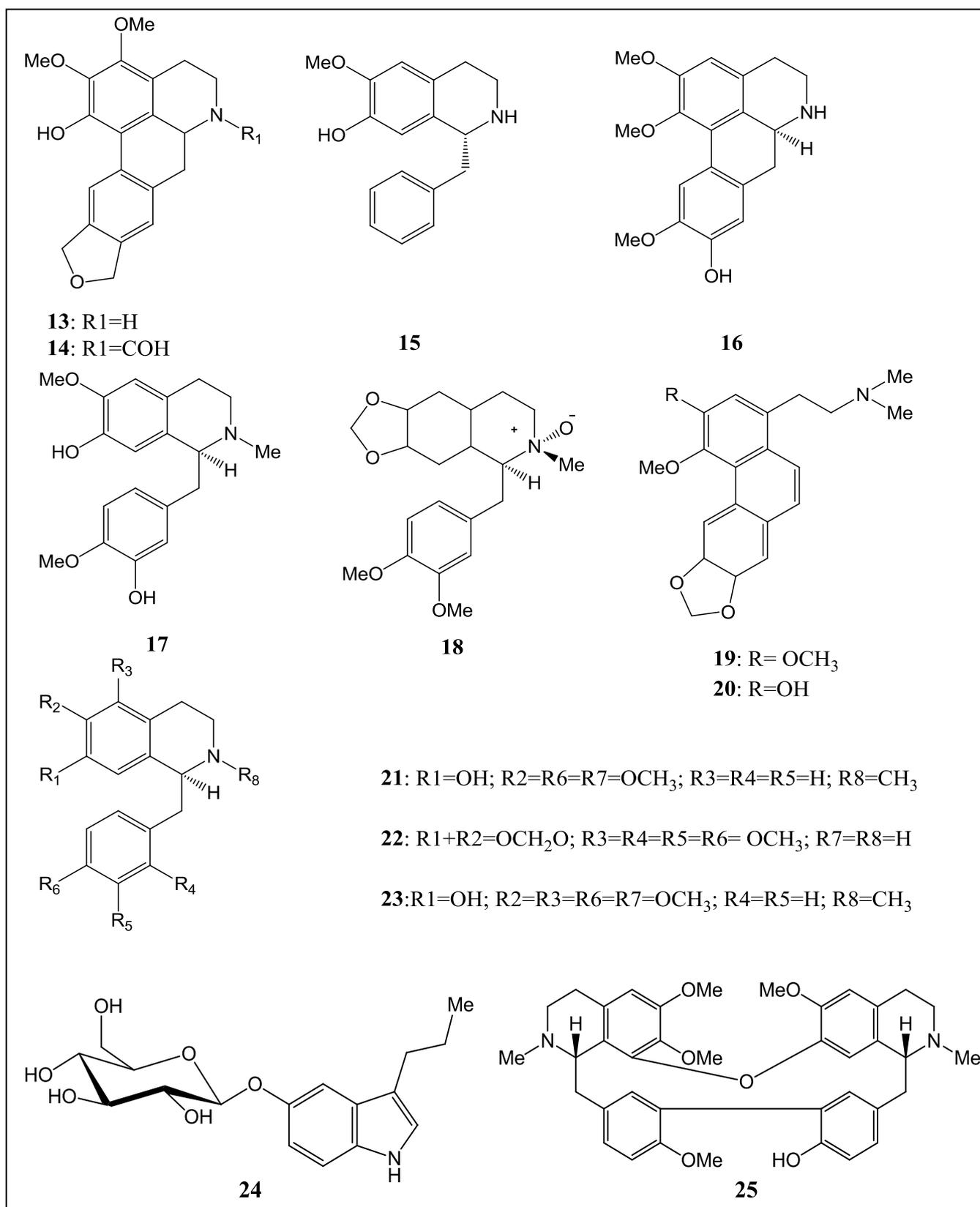
Quadro 5 Origem biossintética dos alcaloides isoquinolínicos a partir do esqueleto benzilisoquinolínico (CAVÉ, 1985)



Quadro 6 Alcaloides isolados do gênero *Ocotea* (CUSTÓDIO; VEIGAS JÚNIOR, 2014; ZANIN; LORDELLO, 2007).



Continuação do Quadro 6



1-Predicentrine; 2-Ocopodine, 3-Nordicentrine; 4-Natenine; 5-Glaucine; 6-Dicentrinona; 7-Neolitsine; 8-Dehidrodicentrina; 9-Dehidroocopodina; 10-Dehidronantenina; 11-

Dehidrocoteína; 12-N-acetil-nornatenine; 13-(S)-3-metoxinordomesticina; 14-N-formil-3-metoxinordomesticina; 15-Coclauina; 16-Laurotetanina; 17-Reticulina; 18-(+) -6S-N-óxido de coteína; 19-Talictuberine; 20-3-o-dimetiltalictuberine; 21-Coridina; 22-Norleucoxilonina; 23-Isoconovina; 24-Triptofol-5-O- D-glicopiranosídeo; 25-Rodiasina.

Tabela 1 Alcaloides isolados de espécies de *Ocotea*

Espécie	Alcaloide	Parte da planta	Referências
<i>O. acutangula</i>	S-O-metilpalidina	Folhas	VECCHIETTI, 1981
	(S)-(-)-palidinina	Folhas	VECCHIETTI, 1981
	(S)-O-metilpalidinina	Folhas	VECCHIETTI, 1981
<i>O. acutifolia</i>	Neolitsina	Folhas	GARCEZ et al, 2011
	(+)-6S-N-óxido de ocoteína	Folhas	GARCEZ et al, 2011
	(+)-Norocoxilonina	Folhas	GARCEZ et al, 2011
	(+)-Talicsimidina	Folhas	GARCEZ et al, 2011
<i>O. brachybotra</i>	Predicentrina	Folhas	VECCHIETTI, 1977
	Ocopodina	Folhas	VECCHIETTI, 1977
	Cassitidina	Folhas	VECCHIETTI, 1977
	Glaziovina	Folhas	VECCHIETTI, 1977
	Leucoxina	Folhas	VECCHIETTI, 1977
	Cassiticina	Folhas	VECCHIETTI, 1977
	Sinacutina	Folhas	VECCHIETTI, 1977
	Palidina	Folhas	VECCHIETTI, 1977
	Ocobotrina	Folhas	VECCHIETTI, 1977
	14-episiomenina	Folhas	VECCHIETTI, 1977
<i>O. brenesii</i>	3-hidroxi-6a,7-dihidronuciferina	Folhas	LOPES et al., 1996
	Isocoridina	Folhas	LOPES et al., 1996
	3-hidroxinuciferina	Folhas	LOPES et al., 1996
<i>O. bucherii</i>	Talbaicalidina	Folhas	GUINAUDEAU, 1988
	Talictuberina	Folhas	
<i>O. caesia</i>	Zenkerina	Caules	VILEGAS et al., 1989
	Laureliptina	Caules	VILEGAS et al., 1989
	Nororientidina	Caules	VILEGAS et al., 1989
	Pulcina	Caules	VILEGAS et al., 1989
<i>O. duckei</i>	Reticulina	Folhas/caule /frutos/raízes	MORAIS et al., 1998
	Coclaurina	Caule/raízes	DIAS et al., 2003
	Coclaurina + N-metilcoclaurina	Caule	DIAS et al., 2003
<i>O. glaziovii</i>	Glaziovina	Folhas	SILVA et al., 2002
	Assimilobina	Folhas	SILVA et al., 2002
	Caaverina	Folhas	SILVA et al., 2002
	Liridinina	Folhas	

<i>O. holdridgeana</i>	O,O-	Folhas	CASTRO; RUIZ, 1994
	dimetilcorituberina		
	3-hidroxinuciferina	Folhas	CASTRO; RUIZ, 1994
	3-metóxinuciferina	Folhas	CASTRO; RUIZ, 1994
<i>O. insularis</i>	3-O-	Folhas	GUINAUDEAU, 1994
	dimetiltalictuberina		
<i>O. lancifolia</i>	Coclaurina	Caule	FOURNET et al., 2007
	N-metilcoclaurina	Folhas	FOURNET et al., 2007
	Glaziovina	Folhas	FOURNET et al., 2007
	Caaverina	Folhas	FOURNET et al., 2007
<i>O. macrophylla</i>	Isocoridine	Folhas	FRANCA et al., 1975
	Glaucina	Caule	FRANCA et al., 1975
	Dehidronantenina	Folhas	FRANCA et al., 1975
	Dicentrina	Folhas	FRANCA et al., 1975
	Dehidroocopodina	Folhas	BARRERA; SUAREZ, 2009
	Nantenina	Folhas	BARRERA; SUAREZ, 2009
	Neolitsina	Folhas	BARRERA; SUAREZ, 2009
	N-acetilnornantenina	Folhas	BARRERA; SUAREZ, 2009
<i>O. macropoda</i>	Ocopodina	Folhas	CAVA; 1971
	Nordicentrina	Folhas	CAVA; 1971
	Dicentrinona	Folhas	CAVA; 1971
	Dehidrodicentrina	Folhas	CAVA; 1971
	Dehidroocopodina	Folhas	CAVA; 1971
<i>O. minarum</i>	Dicentrina	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	Predicentrina	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	Dicentrinana	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	Leucoxina	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	O-metilcassifilina	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	Ocotominarina	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	Talicminina	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	Ocominaina	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	Norleucoxilonina	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	Isoconovina	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	Hidroxidicentrina	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	Ocominarona	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	Triptofol-5-O- β -D-glicopiranosídeo	Folhas	VECCHIETTI, 1979
	<i>O. puberula</i>	Laurotetanina	Folhas
Predicentrina		Folhas	ZANIN et al., 2012
Didehidroocoteína		Folhas	ZANIN et al., 2012
N-óxido de dicentrina		Folhas	ZANIN et al., 2012
Dehidroocoteína		Folhas	ZANIN et al., 2012
3-hidroxidicentrina		Folhas	ZANIN et al., 2012
Boldina		Folhas	ZANIN et al., 2012
Dicentrina		Folhas	ZANIN et al., 2012
Leucoxina		Folhas	ZANIN et al., 2012
Isodomeesticina		Folhas	MONTRUCCHIO et al.,

2012			
<i>O. pulchela</i>	O-metilcassifilina	Folhas	BOTEGA et al., 1993
<i>O. rodiaei</i>	Ocoteamina	Caule	HEARST, 1964
	Demerarina	Caule	HEARST, 1964
	Norrodianina	Caule	HEARST, 1964
	Ocotamina	Caule	HEARST, 1964
<i>O. sinuata</i>	Isocoridina	Folhas	CAVA et al., 1968
	Oconovina	Folhas	GUINADEAU, 1979
	Ocoxilonina	Folhas	GUINADEAU, 1983
<i>O. variabilis</i>	Natenina	Folhas	CAVA et al., 1972
	Apoglaziovina	Folhas	CAVA et al., 1972
	Variabilina	Folhas	CAVA et al., 1972
<i>O. vellosiana</i>	Reticulina	Frutos	GARCEZ et al., 1995
	Predientrina	Ramos	GARCEZ et al., 1995
	Nordicentrina	Ramos	GARCEZ et al., 1995
	Ocoteína	Caule	GARCEZ et al., 1995
	Leucoxilonina	Ramos	GARCEZ et al., 1995
	Ocominarina	Folhas	GARCEZ et al., 1995
	Coridina	Frutos	GARCEZ et al., 1995

2.3 *Ocotea duckei* Vattimo

Ocotea duckei Vattimo é uma espécie popularmente conhecida como “louro-de-cheiro”, “louro-pimenta” e “louro-canela”, encontrada nos estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará, Sergipe e Bahia e em áreas remanescentes da Floresta Atlântica (BARRETO, 1990).

Compreende uma árvore de grande porte, com cerca de 10 m de altura, de copa arredondada, caule e ramos cilíndricos, verdes quando jovens tornando-se marrons na planta adulta (Figura 6) (COUTINHO, 2006).

Figura 6 Imagens do caule, folhas e inflorescências da *Ocotea duckei* Vattimo

Fotos: Sandro Leal, 2011

Estudos do ponto de vista fitoquímico e farmacológico com esta espécie começaram no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), no início da década de 90, sob a coordenação do Prof. José Maria Barbosa Filho.

Para essa espécie são relatadas várias lignanas como: iangambina, epiiangambina, sesartemina, episesartemina, siringaresinol, 4'-*O*- demetilepimagnolin A e (+) - 4''-*O*- demetilepimagnolin A (MORAIS et al., 1996; MORAIS et al., 1998a).

Foram isolados três alcaloides benzilisoquinolínicos: reticulina (MORAIS et al., 1998b), coclaurina (SILVA et al., 2002) e N-acetilnorjuzifina (DIAS et al., 2003). Também foi isolado um alcaloide aporfínico, a laureiptina (DIAS et al., 2003).

A análise dos óleos essenciais extraídos de diversas partes de *O. duckei* mostrou que são formados por misturas complexas de monoterpenos e sesquiterpenos. O teor das folhas tem como componente majoritário, o *trans*-cariofileno. Os sesquiterpenos, α -humuleno e δ -selineno, também representaram um teor significativo. O fruto apresenta D-limoneno em concentrações elevadas. No caule, há predominância de β -eudesmol, enquanto na raiz o

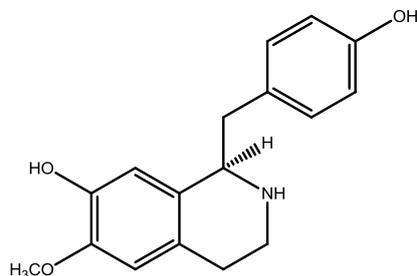
principal constituinte foi o elemol (LACERDA, 2004). No Quadro 7 observa-se alguns constituintes químicos isolados desta espécie.

Castro Faria-Neto e colaboradores (1995a e 1995b) evidenciaram que a iangambina inibe a agregação plaquetária induzida pelo PAF (fator de agregação plaquetária) em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Estudos farmacológicos feitos por Herbert e colaboradores (1997) observaram que existem dois subtipos diferentes de receptores de PAF em plaquetas e leucócitos, estudos esses realizados com a iangambina. O trabalho mostra que a iangambina é um antagonista seletivo para o receptor de PAF em plaquetas, e esta lignana falhou em inibir o PAF em leucócitos humanos. Esses estudos forneceram evidências que a iangambina exibe propriedade antagonista sobre os receptores do PAF e também sobre outros receptores, podendo ser uma importante ferramenta na conduta de algumas doenças alérgicas (SERRA et al., 1997).

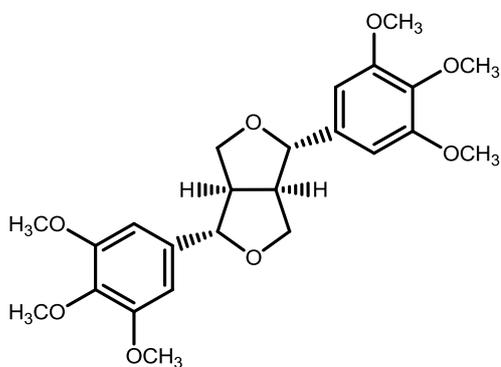
Trabalhos recentes realizados *in vitro* por Monte-Neto e colaboradores (2007) com parasitas das espécies de *Leishmania chagasi* e *L. amazonensis* mostraram que a iangambina apresenta uma significativa atividade antipromastigota e antiastigota em macrófagos murinos infectados com *L. chagasi*. Penha, (2010), demonstrou que a iangambina apresentou um efeito antileishmania *in vivo*, em camundongos suíços infectados com *L. amazonensis*, traduzido pela diminuição da carga parasitária nos animais tratados via oral com esta lignana.

Em relação às atividades farmacológicas dos alcaloides isolados, estudos realizados com a reticulina demonstraram que a substância produziu alteração de comportamento nos animais testados, além de aumentar o tempo de sono induzido pelo pentobarbital; reduziu a incoordenação motora e a hipermotilidade induzida por anfetamina, indicando com estes resultados que a reticulina tem atividade depressora do sistema nervoso central (MORAIS et al., 1998b). Dias et al., (2004), através de ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstrou-se que a reticulina apresenta atividade hipotensora, provavelmente por diminuição da resistência vascular periférica.

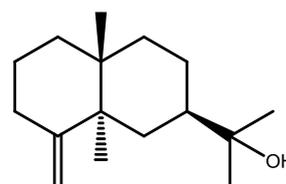
Quadro 7 Substâncias isoladas de *Ocotea duckei*



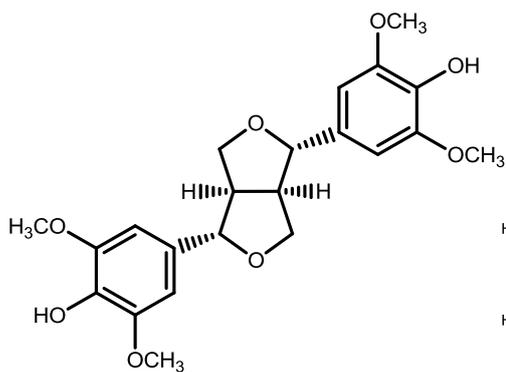
Reticulina
(MORAIS et. al., 1999)



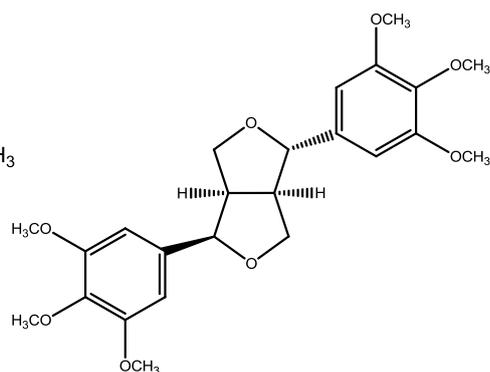
Iangambina
(MORAIS et al., 1996)



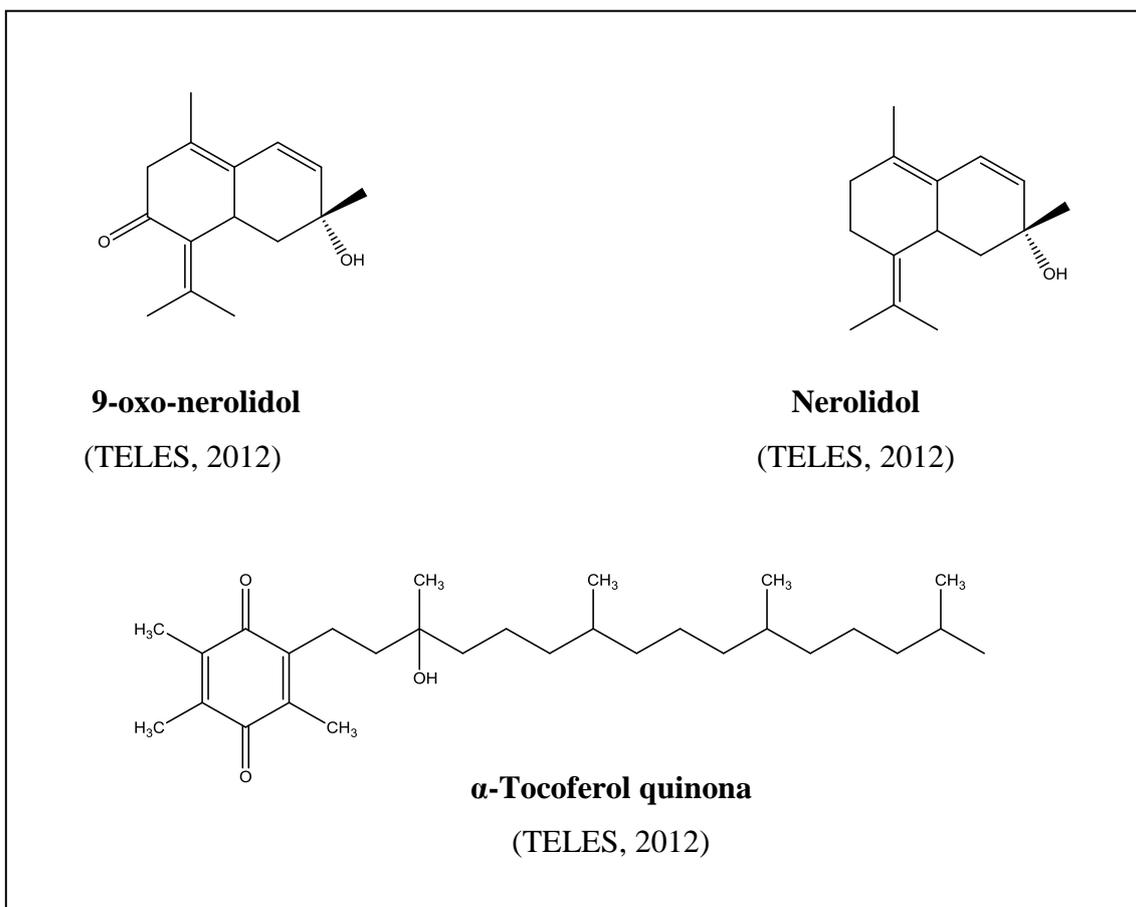
β -eudesmol
(LACERDA, 2004)



(+)- 4''-O-dimetilepimagnolin A
(MORAIS et al., 1998a)



4'-O- Dimetilepiiangambina
(MORAIS et al., 1996)

Continuação do Quadro 7- Substâncias isoladas de *Ocotea duckei***2.4 *Ocotea gardneri* (Meisn) Mez**

Ocotea gardneri (Meisn) Mez é uma espécie encontrada no Nordeste brasileiro, especialmente nos estados de Paraíba, Pernambuco. É conhecida como “louro babão” ou “louro branco” (BARRETO, 1990).

A descrição de Barreto (1990) relata ser uma árvore de 6 a 18 m, folhas ovóides e elípticas, com nervuras principais e secundárias pouco proeminentes nas duas faces. Apresenta flores díclinas, com tépalas ovóides. Estaminóides muito pequenos, flores pistiladas, ovário oblongo, estilete quase lateral e estigma discoide. Fruto ovóide, incluso em cúpula hemisférica (Figura 7).

Figura 7 Imagens de *Ocotea gardneri*

Fonte: Madalena

Quinet e Andreatta (2002) descrevem esta espécie como sendo sinónmia de *Ocotea nonata* Mez, e Rohwer já a descrevia assim. De acordo com esses autores, estas espécies se diferenciam pela forma das folhas e principalmente pelo tipo de habitat, sendo *O. gardneri* típica da Floresta Atlântica e *O. nonata* resrita à restinga (COUTINHO, 2007). Há estudos da composição dos óleos essenciais obtidos das folhas e cascas do caule dessa espécie (Tabela 2).

O estudo do óleo essencial das folhas de *O. gardneri* apresentou toxicidade frente ao ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch, que é considerado uma das principais pragas de hortaliças e várias outras culturas no Brasil, revelando-se um produto promissor no manejo integrado dessa praga, minimizando assim, perdas significativas aos pequenos agricultores (MORAES et al., 2010).

Tabela 2 Composição (%) dos óleos essenciais obtidos das folhas e cascas do caule de *O. gardneri* (Meisn) Mez.

Composto	Folhas (%)	Cascas de caule (%)	IK
α- copaeno	2,5	1,7	1376
β-elemeno	-	1,2	1390
<i>Trans</i>- β-cariofileno	29,2	10,9	1410
α- humuleno	5,5	3,0	1454
Germacreno D	7,1	4,9	1485
α- muuroleno	-	1,3	1507
-(-) globulol	-	1,4	1587
viridiflorol	-	1,2	1595
T-muurolol	-	13,2	1645
α- muurolol	1,0	4,3	1507
α- cadinol	-	2,7	1647
(+)-espatulenol	-	0,6	1657
α- pineno	15,4	1,2	1578
β-pineno	9,0	0,3	0937
Mirceno	1,3	-	0990
Limoneno	4,2	-	1025
Kaur-16eno	18,3	6,0	2015
Zingibereno	-	3,5	1490
Cariofileno	-	0,4	1580
α- santalol	-	6,6	1680

Fonte: Adaptado de Coutinho, 2006

2.5 Importância dos estudos da Atividade Antimicrobiana

O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Outro ponto a ser ressaltado é a utilização desse estudo na descoberta da atividade farmacológica dos constituintes de *O. gardneri*, sendo de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma imensa biodiversidade. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes na corrida contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (OSTROSKY et al., 2008)

A atividade antimicrobiana é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM). Um aspecto bastante relevante na determinação da CIM de extratos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (PINTO et al., 2003). A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA et al., 2001)

2.6 Importância dos estudos da Atividade Antileishmania

A Leishmaniose pertence a um grupo de doenças classificado como doenças tropicais negligenciadas (DTN). Neste grupo também encontramos a doença de Chagas, esquistossomose, tuberculose. São causadas por vários agentes infecciosos e responsáveis por altos níveis de mortalidade e morbidade em todo o mundo. Doenças negligenciadas são doenças que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países (CALLEJON et al., 2014).

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por várias espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Afeta cerca de 12 milhões de pessoas em áreas tropicais e subtropicais no mundo e está presente em quatro formas clínicas: leishmaniose visceral ou calazar e leishmaniose tegumentar americana que inclui a leishmaniose cutânea, mucocutânea e leishmaniose cutânea difusa (LOISEAU et al., 2011).

Todas as estratégias medicamentosas disponíveis a serem utilizadas para o tratamento da leishmaniose não são exclusivas drogas antileishmania. Além disso, são em sua grande

maioria medicamentos caros, altamente tóxicos e que apresentam graves efeitos secundários (PENHA, 2010).

Existem vários relatos na literatura de produtos de origem natural que demonstraram eficácia farmacológica como agentes potencialmente novos e seletivos para o tratamento de diversas doenças tropicais causadas por protozoários e outros parasitas, dentre elas a leishmaniose. Como exemplo temos a iangambina isolada de *O. duckei* (MONTE-NETO, 2007). Na literatura é possível encontrar cerca 850 compostos, listados com atividades anti-protozoária em pelo menos um das DNTs. Destes, 20% do total de compostos com essa atividade eram alcaloides, o que fundamenta a importância do estudo da atividade antileishmania (LÚCIO, 2015).



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Contribuir com o estudo fitoquímico da família Lauraceae, por meio do estudo fitoquímico de *Ocotea duckei* Vattimo e *Ocotea gardneri* (Meisn) Mez.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Extrair os constituintes químicos de *Ocotea duckei* e *Ocotea gardneri* utilizando métodos de maceração usuais;
- ✓ Isolar e purificar os constituintes químicos majoritários *Ocotea duckei* e *Ocotea gardneri* utilizando métodos cromatográficos, tais como, cromatografia em coluna (CC), cromatografia líquida em média pressão (CLMP), cromatografia em camada delgada (CD) e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).
- ✓ Caracterizar estruturalmente os constituintes químicos isolados de *Ocotea duckei* Vattimo e *Ocotea gardneri* através de métodos espectroscópicos, tais como, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (^1H e ^{13}C).
- ✓ Analisar a fração de alcaloides totais (FAT) de *Ocotea duckei* por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS);
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana por meio do método de microdiluição em caldo dos flavonoides isoladas de *Ocotea gardneri*;
- ✓ Avaliar a atividade antileishmania por meio do ensaio de MTT das substâncias isoladas de *Oocotea duckei*.



MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estudo fitoquímico

4.1.1 Material vegetal

O material vegetal (folhas) de *Ocotea duckei* e *Ocotea gardneri* foi coletado no município de Santa Rita, em fevereiro de 2012, estado da Paraíba. A identificação botânica do material vegetal foi realizada pela Prof^ª. Dra. Maria de Fátima Agra, do Centro de Biotecnologia (Cbiotec/UFPB). Exsiccatas destas espécies encontram-se depositadas no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN / UFPB) sob o códigos AGRA 4309 e AGRA 4310, respectivamente.

4.1.2 Processamento do material vegetal

As partes aéreas das espécies vegetais foram desidratadas em estufa, com ar circulante, durante 72 horas, à temperatura média de 40 °C, sendo, em seguida, trituradas com auxílio de moinho mecânico.

4.1.3 Obtenção dos extratos

Após triturado, o material obtido pó foi submetido à maceração com etanol a 95% por 72 horas, separadamente. Após extração, as soluções foram concentradas em rota-evaporador sob pressão reduzida à temperatura de 45 °C obtendo-se o Extrato Etanólico Bruto (EEB) de *Ocotea duckei* e *Ocotea gardneri*. O EEB de *Ocotea gardneri* foi submetido à particionamento e o EEB de *Ocotea duckei* à Marcha de Alcaloides (Esquema 1, página 34).

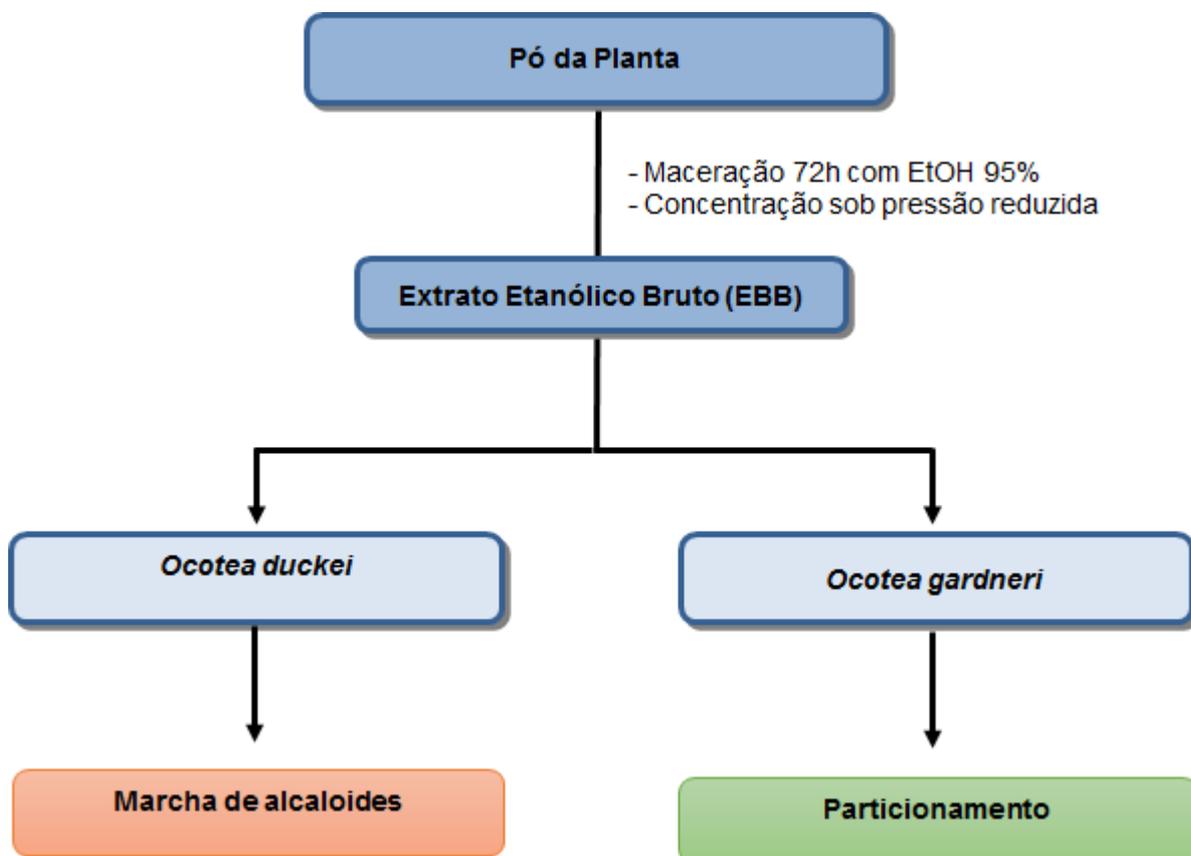
4.1.4 Particionamento do extrato de *Ocotea gardneri*

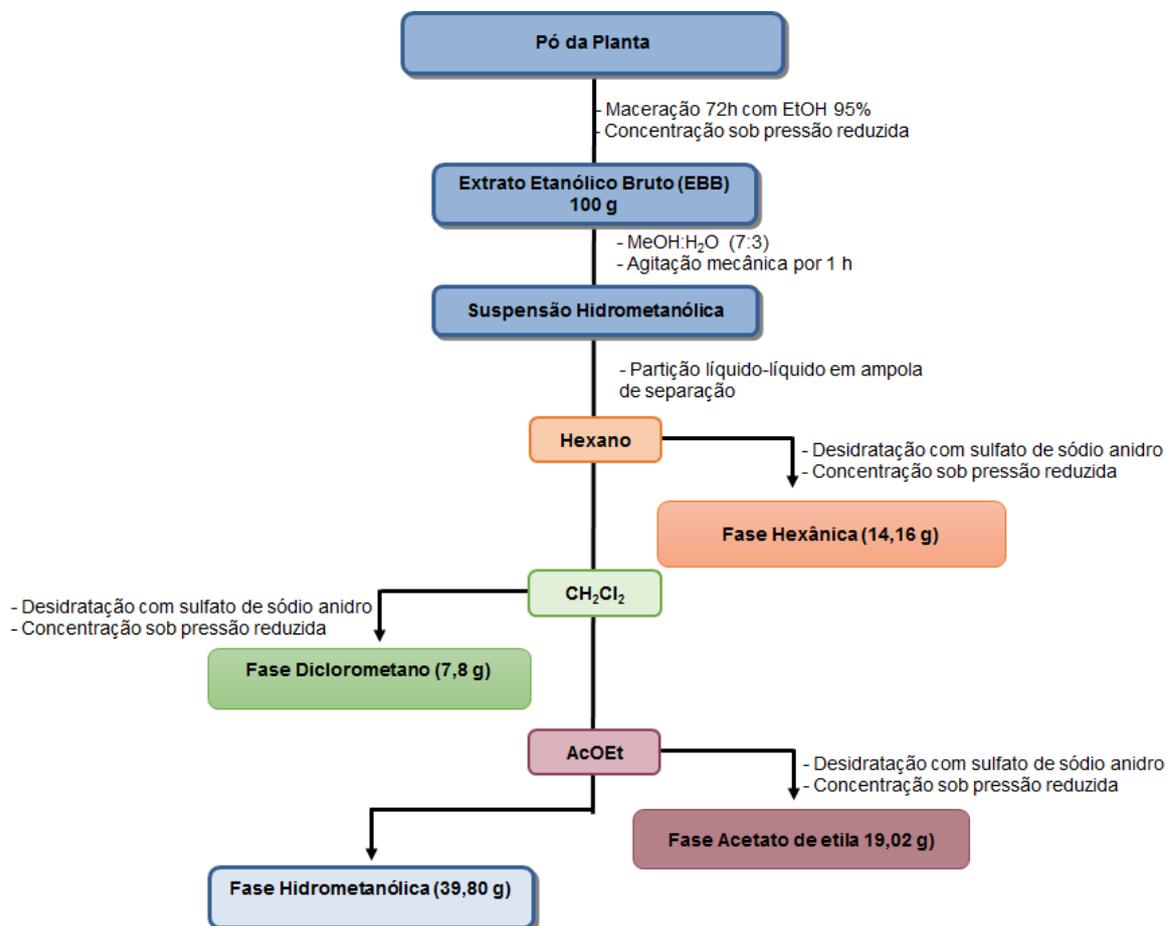
Uma alíquota do EEB de *Ocotea gardneri*, foi dissolvida em MeOH:H₂O (7:3), e homogeneizado sob agitação mecânica por uma hora, para obtenção da solução hidrometanólica que foi submetida sequencialmente a um particionamento em ampola de

separação com hexano, diclorometano e acetato de etila. As fases foram, então, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida (Esquema 2, página 35).

Tabela 3 Massa do material botânico seco, e massas obtidas após particionamento das partes aéreas de *Ocotea gardneri*

	Massa em gramas
Material vegetal	3000
EEB	211,4
EEB (partição)	100
Fase hexânica	14,16
Fase diclometano	7,8
Fase Acetato de etila	19,02
Fase hidrometanólica	39,80

Esquema 1 Etapas envolvidas na obtenção e particionamento do EEB das duas espécies

Esquema 2 Obtenção do extrato e particionamento da *Ocotea gardneri*

4.1.5 Processamento cromatográfico da fase diclorometano das partes aéreas de *Ocotea gardneri*

Uma alíquota de 6,0 g da fase diclorometano do EEB das partes aéreas de *Ocotea gardneri* foi submetida a uma cromatografia em coluna (CC), utilizou-se como fase estacionária Sílica gel 60 (Silicycle® de partículas com dimensões entre 0,063-0,2 mm) e como fase móvel os solventes hexano, CH₂Cl₂ e MeOH, puros ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade, sendo suas frações concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida (Esquema 3, página 36).

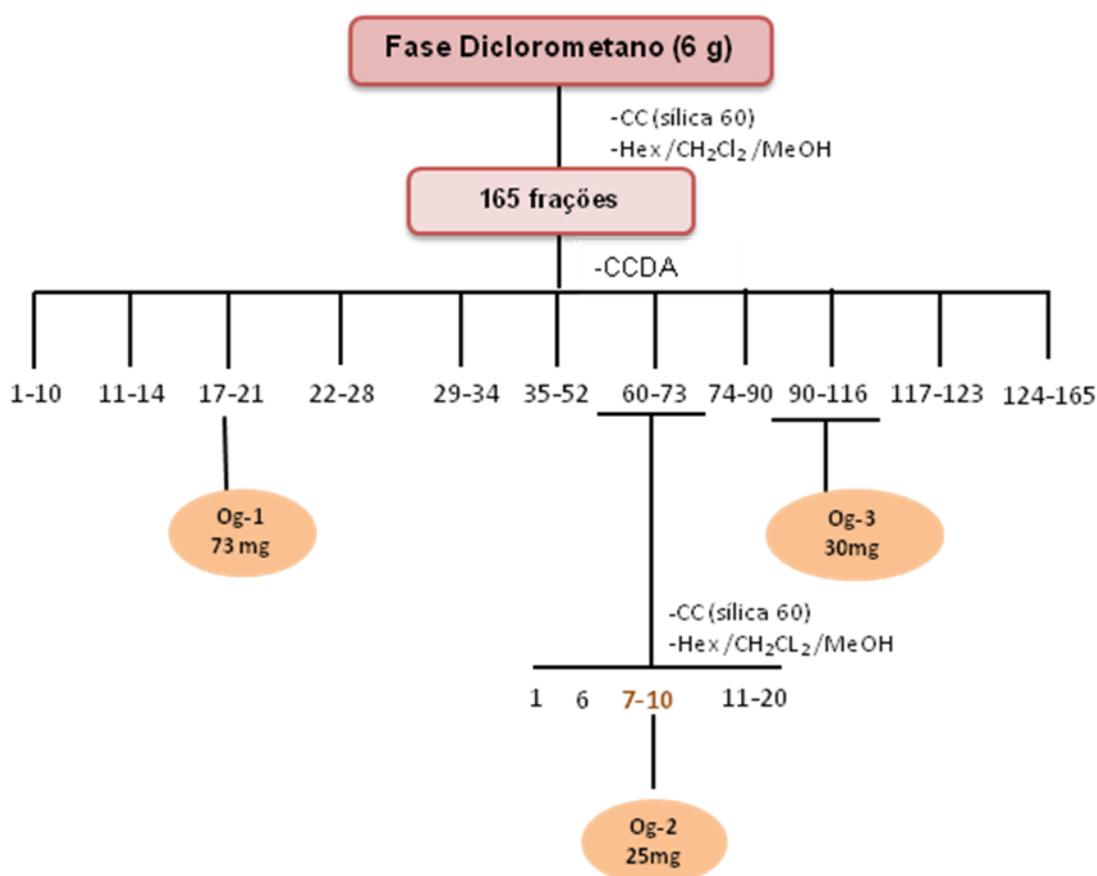
As frações foram analisadas através de CCDA, utilizando diferentes sistemas de eluição e reunidas, quando semelhantes e de acordo com seus fatores de retenção (R_f), após visualização na luz ultravioleta e impregnação com vapores de iodo foram reunidas em 11 grupos (Esquema 3, página 36).

A fração 17-21(73,0 mg) apresentou-se na forma de um óleo amarelo, e após análise por CCDA revelou uma única mancha, sendo então submetida a espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C e codificada como **Og-1**.

A fração 60-73 (200,0 mg), foi submetida a CC, utilizando como fase estacionária sílica flash (0,04-0,063 mm) e como eluentes hexano, CH_2Cl_2 e MeOH puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 20 frações, A subfração 7-10 apresentou-se na forma de cristais brancos e amorfos, esta foi submetida a espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C , sendo codificada como **Og-2** (25 mg).

A fração 90-116 (30,0 mg) apresentou-se como cristais brancos em formato de agulha, e após análise por CCDA revelou uma única mancha, sendo submetida a espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C , sendo então codificada como **Og-3**.

Esquema 3 Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase diclorometano do EEB das partes aéreas de *Ocotea gardneri*



4.1.6 Processamento cromatográfico da fase acetato de etila do EEB das partes aéreas

Uma alíquota de 5,0 g da fase AcOEt foi submetida à CLMP. Para a CLMP utilizou-se o cromatógrafo da Büchi® com um sistema de bomba e injetor de solventes automático, equipado com dois módulos de bombas (C-601 e C-605), módulo controlador (C-615) e coluna empacotada com sílica gel 60 (Silicycle® de partículas com dimensões entre 0,063-0,2 mm ou 0,04-0,063 mm) (Esquema 4, página 38).

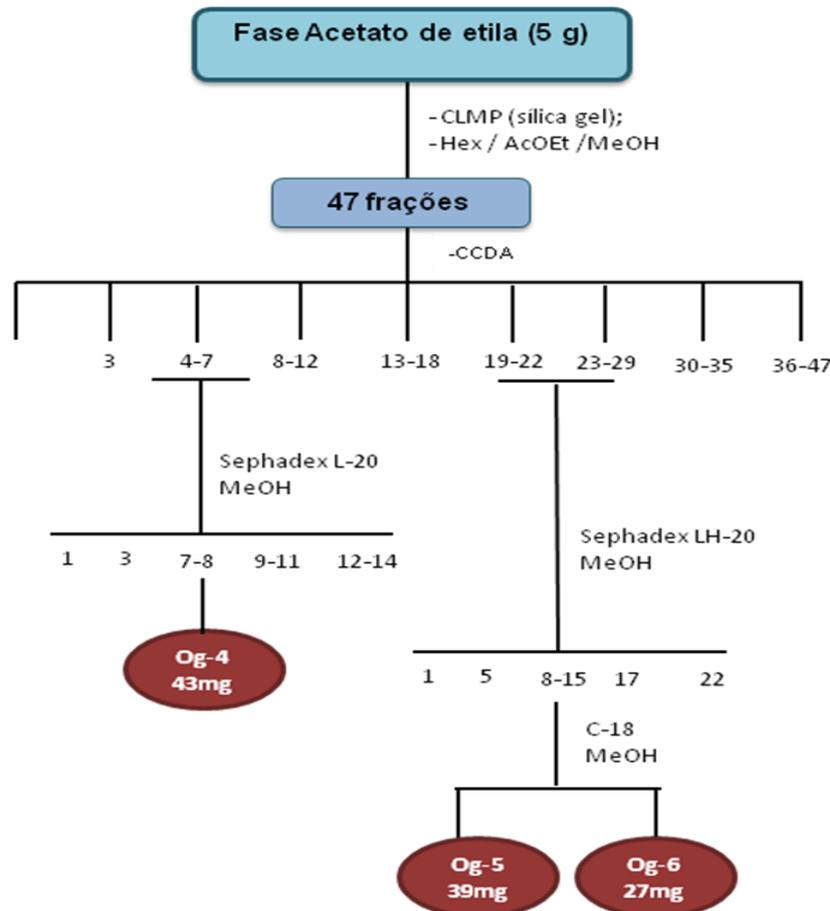
Utilizou-se coluna empacotada com sílica gel 60 (0,063 – 0,2 mm), utilizando o fluxo de 30 mL/min e como fase móvel os solventes CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 47 frações de 50 mL cada. Posteriormente as frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Em seguida, as frações foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos (Esquema 4; página 38).

A fração 4-7 (200 mg) foi submetida a CC utilizando sephadex-LH20 como fase fixa e MeOH como fase móvel, obtendo-se 14 subfrações que foram reunidas em 5 grupos após monitoramento por CCDA. Deste processo cromatográfico obteve-se um pó amarelo que após análise de RMN ¹H e ¹³C, a substância foi codificada como **Og-4** (43 mg).

A fração 19-29 (350mg) também foi submetida a CC utilizando sephadex-LH20 como fase fixa e MeOH como fase móvel, obtendo-se 22 subfrações que foram reunidas em 5 grupos após monitoramento por CCDA (Esquema 4).

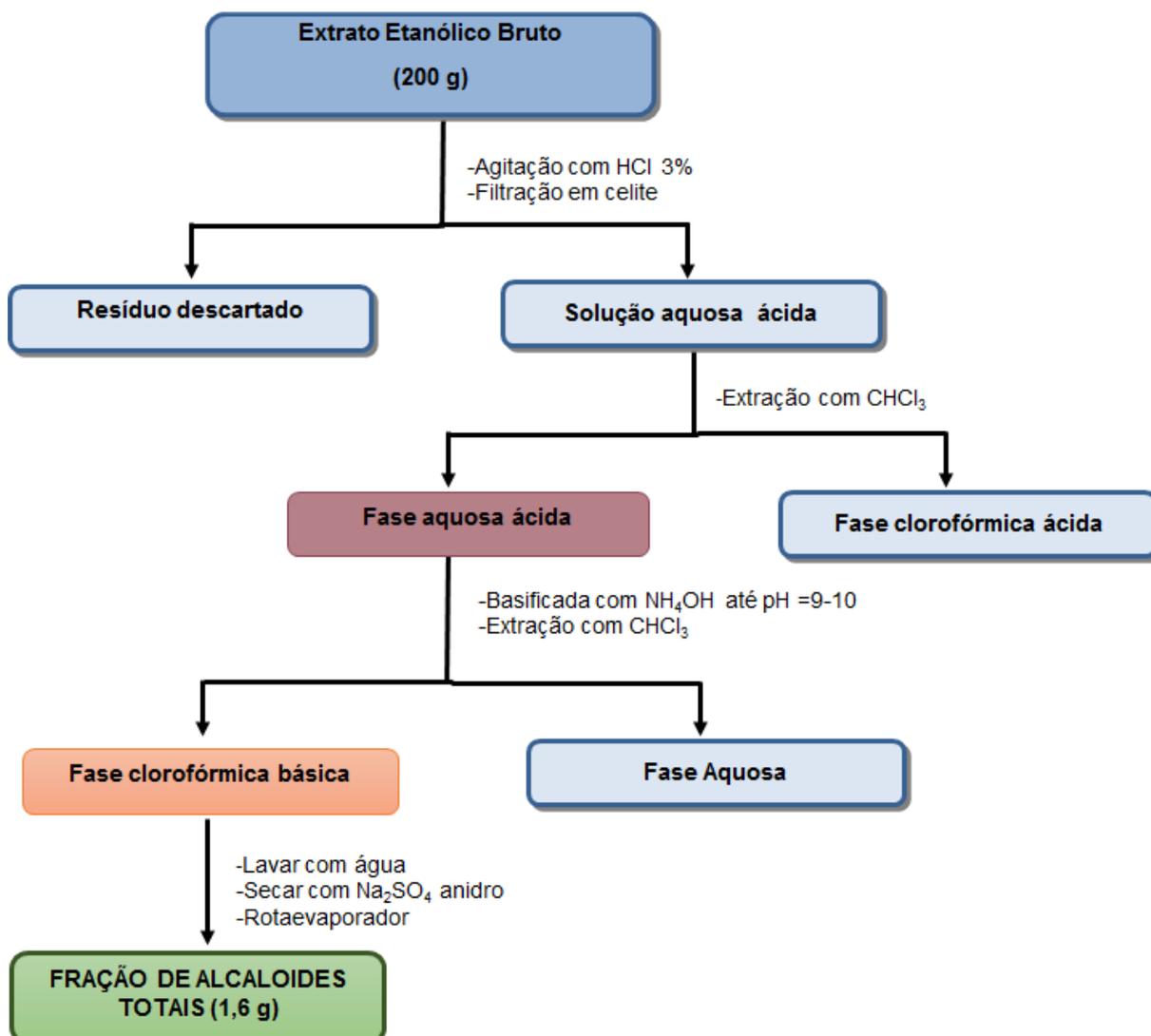
A fração 8-15 (150 mg), por sua vez, foi submetida à nova CC utilizando para esse procedimento foi usado cartucho de fase reversa C18 (strata C18-E) e como eluente MeOH, obtendo-se 7 subfrações de 10 mL cada, que foram analisadas por CCDA. As frações 3 e 4 da subfração 10 após análise por CCDA foram codificadas como **Og-5** (39 mg) e **Og-6** (27 mg).

Esquema 4 Etapas envolvidas no processo cromatográfico da fase acetato de etila do EEB das partes aéreas de *Ocotea gardneri*



4.1.7 Marcha de Alcaloides para *Ocotea duckei*

Parte do EEB (200 g) foi tratada com uma solução de ácido clorídrico a 3%, sob agitação mecânica e filtrado em celite, fornecendo um precipitado que foi descartado e uma solução ácida que foi extraída com clorofórmio, obtendo-se a fase clorofórmica ácida e a fase aquosa ácida. A fase aquosa ácida foi alcalinizada, a frio, com uma solução de hidróxido de amônia até pH 9-10 e extraída com clorofórmio, até reação negativa com reagente de Dragendorff, obtendo-se a fase clorofórmica básica. Posteriormente, essa fase foi tratada com água, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida, resultando um resíduo de 1,6 g, denominada Fração de Alcaloides Totais (FAT) (Esquema 5).

Esquema 5 Marcha de Alcaloides de *Ocotea duckei*

4.1.8 Extração e isolamento dos alcaloides

Uma alíquota (150 mg) da Fração de Alcaloides Totais foi submetida a Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), utilizando como sistema de solventes acetato de etila. Depois da eluição, as placas foram visualizadas na luz ultravioleta (254 e 360 nm) para identificação das faixas que absorveram a luz e os alcaloides foram revelados com reagente Dragendorff. As faixas foram raspadas da placa e extraídas com mistura binária de solventes, CH₂Cl₂: MeOH (90:10). Os compostos isolados foram filtrados e codificados como *Od-1* (36 mg) e *Od-2* (18 mg).

foi de 2 μ L. A fase móvel A consistiu de água e a B – acetonitrila (CH₃CN), com 0,2 % de ácido fórmico, usando um sistema de gradiente descrito na Tabela 5.

Os espectros de massas foram adquiridos utilizando fonte de íons Eletrospray (ESI) no modo positivo, em condições descritas na Tabela 6. Os espectros obtidos foram comparados com os dados da literatura e os padrões de fragmentação foram propostos baseados na fragmentação de alcaloides aporfínicos e protoberberínicos.

Tabela 5 Condições do modo gradiente do UHPLC

	Tempo	Fluxo (mL/min)	A	B
1	0,0	0,150	95	5
2	1,0	0,150	95	5
3	16,0	0,150	0	100
4	21,0	0,150	0	100
5	22,0	0,150	95	5
6		0,150	95	5

Tabela 6 Condições do Espectrômetro de Massas no modo ESI positivo

Voltagem	4 KV
Temperatura do capilar	275 °C
Temperatura da fonte	250 °C
Fluxo de gás-bainha	25 mL/min
Fluxo do gás auxiliar (N)	21 00 mL/min
Fullscan	220-1000 <i>m/z</i>

4.1.10 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados

A identificação e/ou elucidação estrutural das substâncias isoladas foi realizada através de métodos espectroscópicos e comparações com modelos da literatura e biblioteca dos espectrômetros de massas.

4.1.10.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C, que informam sobre os diferentes tipos de hidrogênios e carbonos da molécula, respectivamente, foram obtidos em espectrômetros VARIAN SYSTEM 500 MHz e VARIAN MERCURY 200 MHz, ambos da Unidade de

Caracterização e Análise (UNICAL) da UFPB. As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se pequena quantidade das mesmas em solventes deuterados da marca Cambridge Isotope Laboratories: clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e dimetilsulfóxido (DMSO). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz foram referenciados para RMN de ^1H pelos sinais característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas dos solventes: CDCl_3 (δ_{H} 7,24), CD_3OD (δ_{H} 3,31) e DMSO- d_6 (δ_{H} 2,50). Para os espectros de RMN de ^{13}C , os deslocamentos químicos foram referenciados pelos sinais dos carbonos dos solventes deuterados: CDCl_3 (δ_{C} 77,0), CD_3OD (δ_{C} 49,0), DMSO- d_6 (δ_{C} 39,5).

As multiplicidades dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (singleto), *sl* (singleto largo), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *dl* (dubleto largo), *t* (triplete), *q* (quarteto) e *m* (multipeto). Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos pela técnica APT com a seguinte convenção: os sinais de carbonos não-hidrogenados (C) e metilênicos (CH_2) acima da linha base e sinais de carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3) abaixo da linha base. Os espectros de RMN também foram otimizados para as técnicas bidimensionais: HMQC, espectro de correlação heteronuclear, que permite fazer uma correlação entre hidrogênios e seus respectivos carbonos; HMBC que permite fazer uma correlação entre hidrogênios e carbonos a duas (2J) e três (3J) ligações; (KAISER, 2000).

4.1.10.2 Ponto de fusão

O ponto de fusão de cada substância foi determinado em aparelho digital para ponto de fusão (MAQPF-302) DA Microquímica Equipamentos LTDA, com temperatura variando de 0-350 °C.

4.2 Estudo farmacológico

4.2.1 Atividade antimicrobiana dos flavonoides isolados de *Ocotea gardneri*

4.2.1.1 Local de Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Bucal (LABIAL) no Centro de Ciências da Saúde (CCS /UFPB), e supervisionada pela Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio.

4.2.1.2 Métodos

Na avaliação foram testados flavonoides os quercetina, a catequina e epicatequina isolados da espécie *Ocotea gardneri*. Os microorganismos foram cepas padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Os ensaios antibacterianos foram realizados através do procedimento de microdiluição em caldo.

As moléculas foram solubilizadas em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10%, e em seguida diluídos em caldo BHI. Todos os poços receberam alíquotas de 20 µL da suspensão bacteriana padronizada, adicionadas a BHI caldo e drogas testadas em diferentes proporções, de 400 µg/mL a 15 µg/mL. O controle positivo adotado foi o digluconato de clorexidina a 0,12% (Sigma, Steinheim, Alemanha) diluído em série de 600 a 0,29 µg/mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como valores de µg/mL.

Utilizou-se como critério de ponto de corte valores abaixo de 100 µg/mL como indicativo de significativa atividade antibacteriana (HOLETZ, PESSINI, et al., 2002).

4.2.2 Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania dos alcaloides isolados de *Ocotea duckei*

4.2.2.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LABDIC) no Centro de Biotecnologia (CBiotec /UFPB), e supervisionada pela Prof.^a Dr.^a Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente .

4.2.2.2 Métodos

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/ET/1967/HU3), mantidas em meio de Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SBF), 1% de urina humana masculina e antibióticos (penicilina 200U I/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL) (Gibco,BR), mantidos incubados em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) a 26°C.

O método colorimétrico MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) é baseado na atividade de enzimas desidrogenases citosólicas e mitocondriais, que são capazes de reduzir o MTT (coloração amarela) e formar um produto de coloração azul, insolúvel em água, o sal formazan. O ensaio com MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazólio) foi utilizado para avaliar a atividade antileishmania dos alcaloides reticulina e N-óxido de reticulina.

Em placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio Schneider suplementado e cerca de 1×10^6 promastigotas/poço de *L. amazonensis*. Posteriormente, foram adicionadas as substâncias-teste em triplicata nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg / mL de cada composto previamente diluído em meio Schneider com Dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida a placa foi incubada por 72 h em estufa de B.O.D. a 26°C. Ao final da incubação, foi adicionado 10 µL de MTT diluído em PBS a uma concentração final de 5 mg/mL. Foram incubados por mais 4 h em estufa de B.O.D. a 26°C, e em seguida foi adicionado 50 µL de SDS (dodecilsulfato de sódio) (Vetec®) a 10%.

A placa foi deixada em overnight para dissolução do formazan, e por último, a absorbância de cada poço foi lida utilizando um espectrofotômetro (Spectramax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), a 570 nm.

O controle negativo foi realizado com meio Schneider suplementado a 0,2% de DMSO. O controle positivo foi realizado na presença de anfotericina B como fármaco de referência. Os ensaios foram realizados em triplicatas e repetidos três vezes em dias diferentes.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo fitoquímico

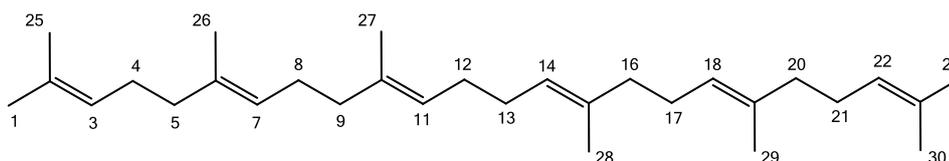
5.1.1 Substâncias isoladas de *Ocotea gardneri*

5.1.1.1 Identificação estrutural do *Og-1*

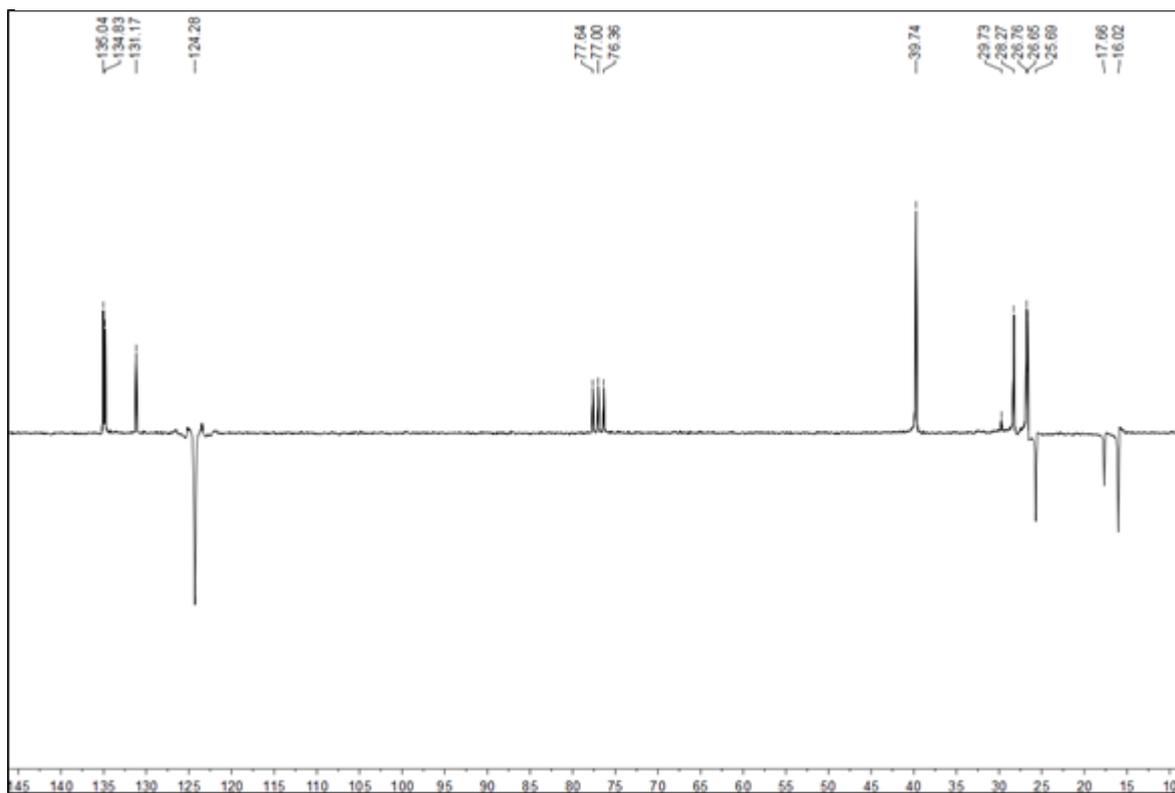
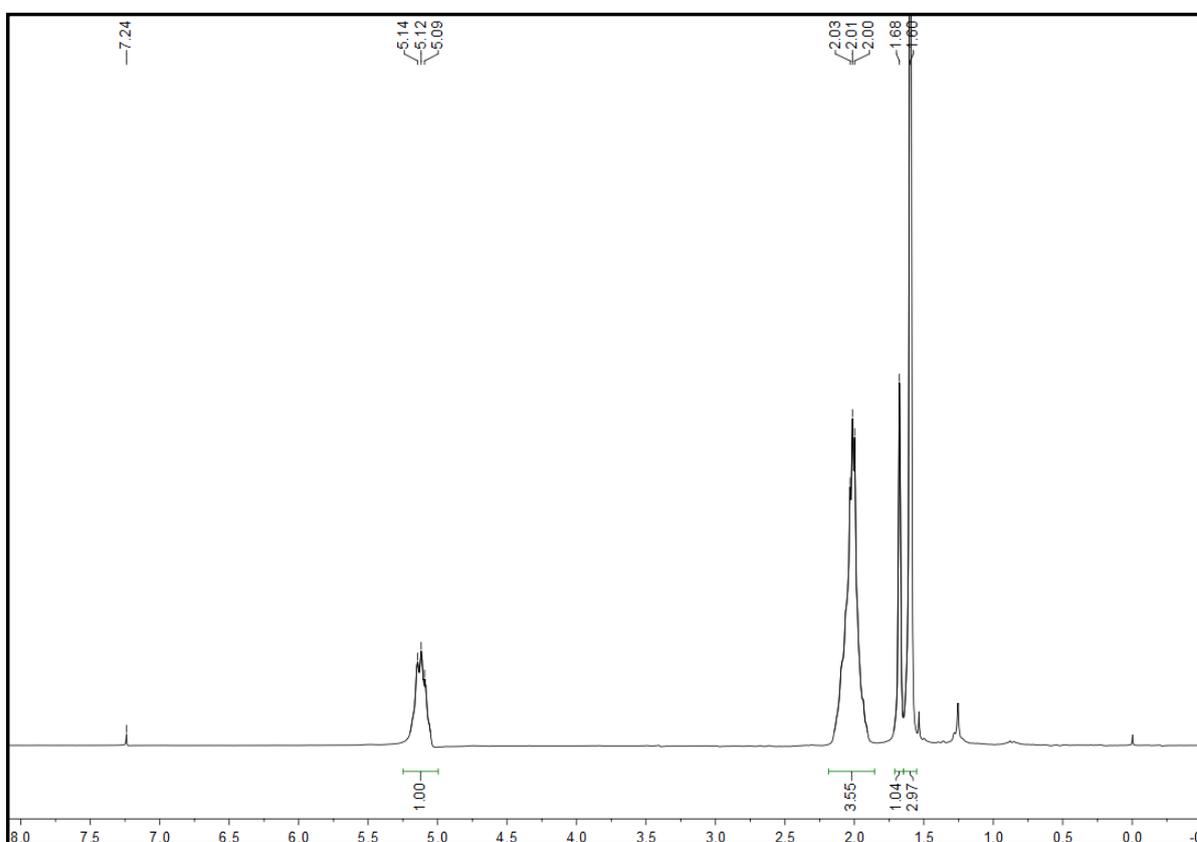
A substância codificada como *Og-1* foi obtida como um óleo incolor com 73 mg. O espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, CDCl_3) de *Og-1* (Figura 10, página 49) apresentou sinais em δ_{C} 131,17, 134,83 e 135,04, característicos de absorções de carbonos quaternários (C-2 e C-23, C-10 e C-15, e C-6 e C-19, respectivamente), um sinal em δ_{C} 124,28 característico de carbonos de dupla ligação (C-3, C7, C-11, C-14, C-18 e C-22), e sinais entre δ_{C} 16,02 e 39,74 atribuídos aos carbonos metilênicos e metílicos (CURSINO et al., 2009).

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de *Og-1* (Figura 11, página 49) apresentou um tripleto em δ_{H} 5,12 ($J = 4$ Hz) atribuído aos hidrogênios das duplas ligações H-3, H-7, H-11, H-14, H-18 e H-22, um quarteto em δ_{H} 2,01 ($J = 6,0$ Hz) atribuído aos hidrogênios metilênicos vizinhos às ligações duplas, um singlete em δ_{H} 1,60 atribuído aos hidrogênios das metilas H-25, H-26, H-27, H-28, H-29 e H-30, e um singlete em δ_{H} 1,68 atribuído aos hidrogênios das metilas H-1 e H-24. Os dados de RMN, em comparação com os dados da literatura, permitiram inferir que *Og-1* tratava-se do 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexeno, conhecido como esqualeno (Tabela 7), relatado pela primeira vez em *Ocotea gardneri* (CURSINO et al., 2009).

O esqualeno (Figura 8) é um intermediário na biossíntese do colesterol, sendo um antioxidante estável e eficaz, capaz de impedir a peroxidação lipídica dentro das células animais e vegetais. Pode induzir a resposta imune a vários antígenos (REDDY; COUVREUR, 2009). Além disso, já foi comprovado atividade anticancerígena em tumores em animais, através da redução de pirofosfato de farnesila (PFF) (NEWMARK, 1997; RAO; NEWMARK; REDDY, 1998; SPORN; SUH, 2000; WALL, 2010).

Figura 8 Estrutura do Esqualeno**Tabela 7** Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) de *Og-1* com dados da literatura (CURSINO et al., 2009) em CDCl_3

C	<i>Og-1</i>	Esqualeno
	δ_c	δ_c
1, 24	25,7	25,29
2, 23	131,2	131,43
3, 22	124,3	124,65
4, 21	26,5	26,90
5, 20	39,7	39,98
6, 19	135,0	135,30
7, 18	124,3	124,54
8, 17	28,3	27,01
9, 16	39,7	39,96
10, 15	134,8	135,10
11, 14	124,3	124,52
12, 13	29,7	28,50
25, 30	17,7	17,89
26, 29	16,0	16,26
27, 28	16,0	16,21

Figura 9 Espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Og*-1 (50 MHz, CDCl_3)**Figura 10** Espectro de RMN de ^1H de *Og*-1 (200 MHz, CDCl_3)

5.1.1.2 Identificação estrutural de *Og-2*

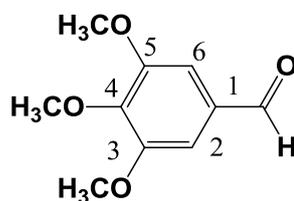
A substância codificada como *Og-2* foi obtida na forma de um sólido amorfo branco com 25 mg.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, piridina- d_5) (Figura 11, página 51) apresentou sinais característicos de aldeído aromático: um singlete em δ_{H} 10,02 e outro em 7,31 integrando para um e dois hidrogênios, respectivamente. Esses dados sugerem que a substância se trata de um aldeído trissubstituído nas posições 3, 4 e 5, uma vez que o espectro apresenta dois singletos 3,90 (m-OMe, 3H) e 3,75 (p-OMe, 6H).

No espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, piridina- d_5) (Figura 12, página 51), são observados 9 sinais de carbono, sendo 4 sinais de carbonos não hidrogenados, 3 sinais metínicos, e dois sinais em δ_{C} 56,4 e 61,0 atribuídos aos três carbonos metoxílicos em posição *meta* e posição *para*. Os sinais apresentados corroboram com o 3,4,5-Trimetoxibenzaldeído, relatado pela primeira vez em *Ocotea gardneri* (Tabela 8).

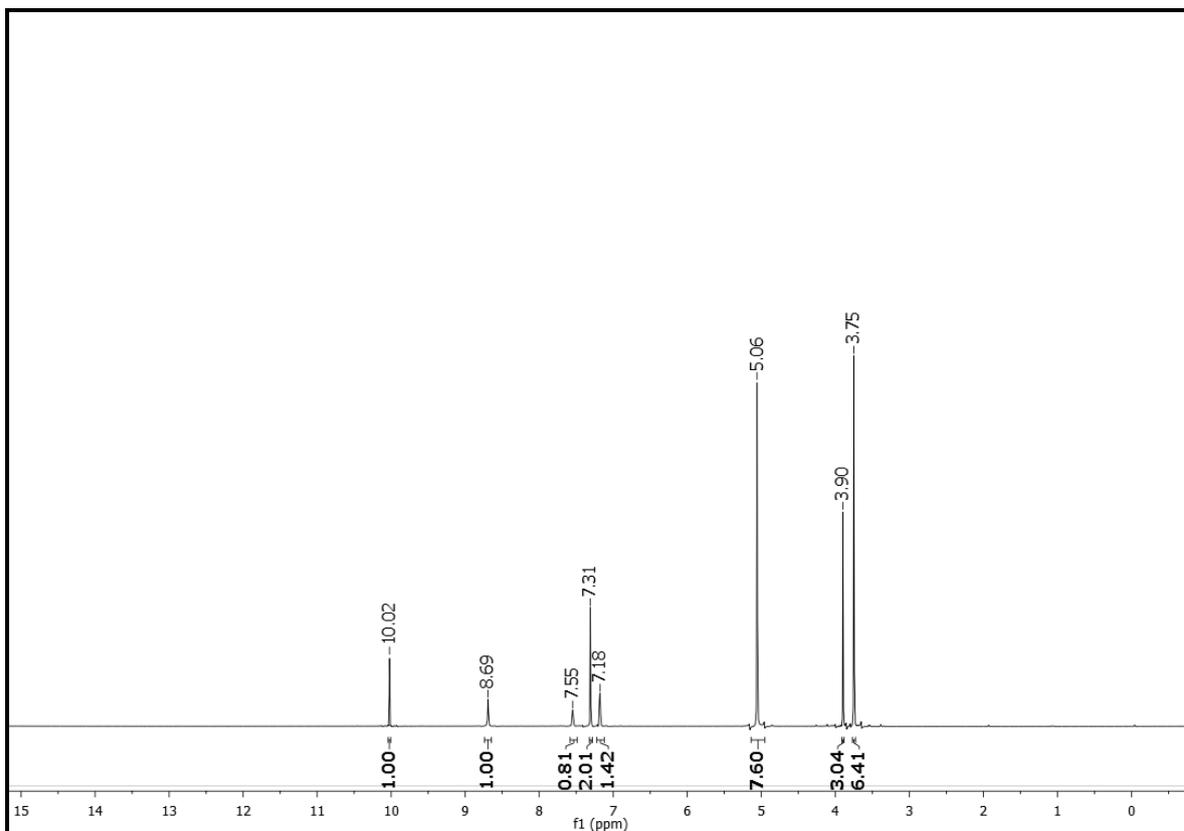
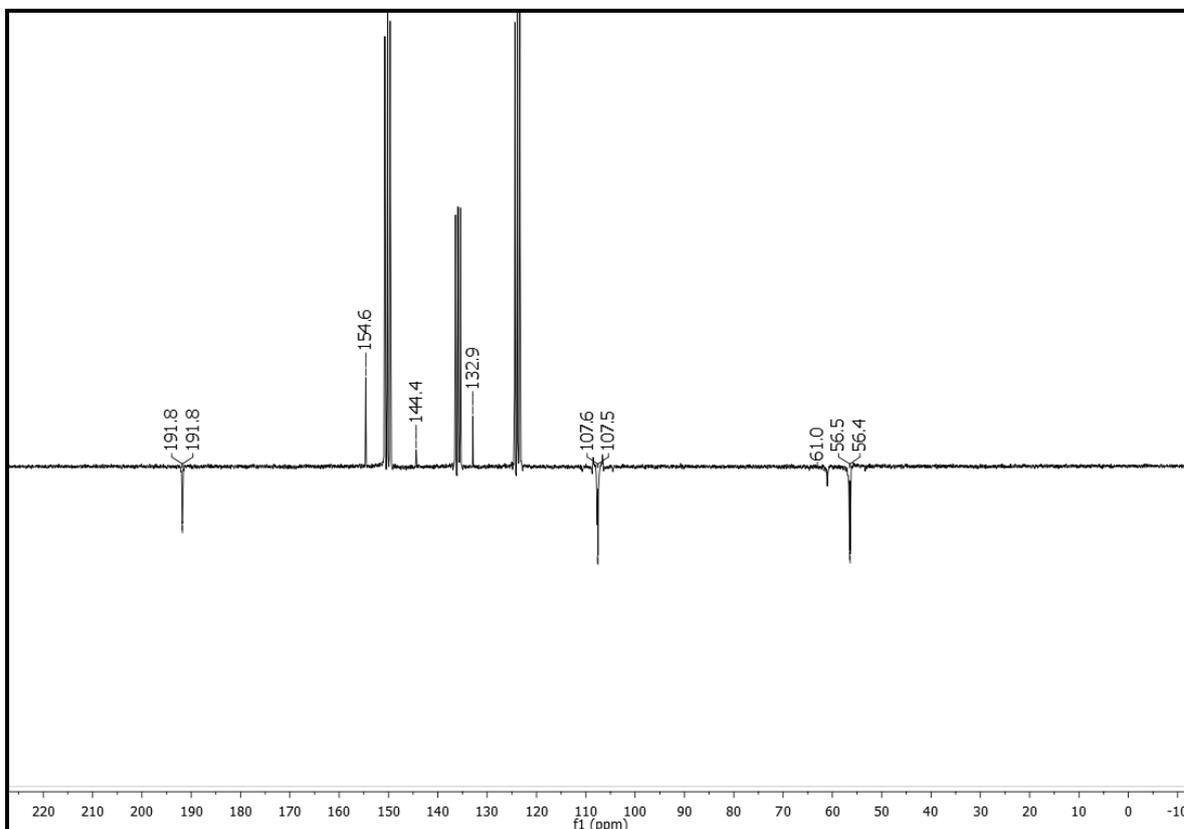
Esta substância foi descrita anteriormente nas raízes de *Beilschmiedia tsangii* (Lauraceae) (HUANG, 2012).

Tabela 8 Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *Og-2* em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (200 e 50 MHz, respectivamente)



3,4,5-Trimetoxibenzaldeído

Posição	(C ₅ D ₅ N, 200 e 50 MHz)		Rout, 2007 (CDCl ₃ , 400 MHz)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	132,9	-	131,7
2	7,31 (s, 2H)	107,5	7,1 (s, 2H)	106,8
3	-	154,6	-	153,6
4	-	144,4	-	143,7
5	-	154,6	-	153,6
6	7,31 (s, 2H)	107,6	7,1 (s, 2H)	106,8
O=CH	10,02 (s, 1H),	191,8	9,9 (s, 1H)	190,9
<i>p</i>-OCH₃	3,90 (s, 3H)	61,0	3,9 (s, 9H)	60,9
<i>m</i>-OCH₃	3,75 (s, 6H)	56,4	3,9 (s, 9H)	56,3

Figura 9 Espectro de RMN ^1H de *Og-2* (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)**Figura 10** Espectro de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz) de *Og-2*

5.1.1.3 Identificação estrutural de *Og-3*

A substância codificada como *Og-3* (30mg) foi isolada na forma de cristais brancos com 30 mg com ponto de fusão 292 -294 °C.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e as expansões (Figuras 13 e 14, página 55) apresentaram um conjunto de deslocamentos químicos simples e de alta multiplicidade na região compreendida entre δ_{H} 0,66-2,2 característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos, sugerindo que possui estrutura triterpênica ou esteroidal. A presença de um multiplete em δ_{H} 3,49 pôde-se verificar a presença de um hidrogênio oximetínico atribuído ao hidrogênio do carbono 3 (H-3) de núcleo esteroidal (KOJIMA, 1990). O espectro ainda mostrou um duplete em δ 5,32 ($J = 5,0$ Hz) característico de hidrogênio olefínico na posição 6 de fitoesteróides (AHMED et al., 1992)

No espectro de RMN ^{13}C - APT (125 MHz, CDCl_3) e nas expansões (Figuras 15 a17, páginas 56 e 57) observa-se um sinal em δ_{C} 71,8 referente ao carbono oximetínico (C-3); sinais para carbono sp^2 metínicos em δ_{C} 121,7 e carbono não hidrogenado em δ_{C} 140,8 compatíveis com a dupla ligação localizada em C-5 e C-6; outros em δ_{C} 26,2 e δ_{C} 34,0 para carbonos metilênicos, referentes a C-22 e C-23. Estes dados espectrais, feições do espectro e comparações com dados da literatura possibilitaram sugerir que *Og-3* tem um esqueleto do β -sitosterol.

A presença de unidade osídica foi sugerida por um conjunto de absorções entre δ_{H} 4,0 e δ_{H} 4,5 típicos de hidrogênios oximetínicos da referida unidade (KASAI et al., 1987). Um multiplete em δ_{H} 3,94 referente ao hidrogênio carbinólico, permitiu propor presença de unidade osídica no C-3.

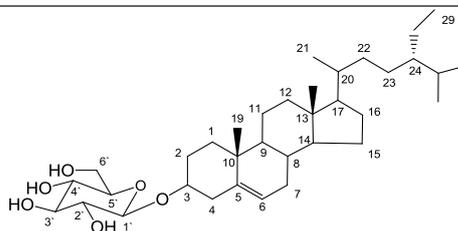
O espectro de RMN ^{13}C e suas expansões, obtidos utilizando a técnica APT corroboram com a proposta anterior da presença da unidade osídica, ao mostrar um sinal em δ_{C} 102,55 referente ao carbono anomérico (C-1') (AQUINO et al., 1988), bem como absorções na região entre δ_{C} 71,68 e δ_{C} 78,54 condizentes com absorções de carbonos carbinólicos. Uma absorção em δ_{C} 62,80 referente a carbono metilênico oxigenado, confirma que a unidade osídica trata-se da glicose. Observaram-se também sinais entre δ_{C} 11,93 e δ_{C} 19,93, característicos de carbonos metílicos de esteroides (BREITMAIER; VOELTER, 1990). Absorções em δ_{C} 140,90 e δ_{C} 123,75 correspondem, respectivamente, aos carbonos 5 e 6 do esqueleto de esteroides como o sitosterol.

A compilação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para o composto *Og-3* e comparação com valores da literatura (KOJIMA et al., 1990), permitiram identificá-lo como

Sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, relatada pela primeira vez em *Ocotea gardneri* (Tabela 9).

Estudos *in vivo* em animais demonstraram que o Sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo apresenta atividades antiinflamatória, antineoplásica, antipirética e imunomodulatória e inibidor da DNA polimerase (MIZUSHINA et al., 2006).

Tabela 9 Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para *Og-3* ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δC^*) [$(\text{C}_5\text{D}_5\text{N})$] (KOJIMA et al., 1990) (δ em ppm e J em Hz)



Sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo

	δc	δc^*	δH
1	37,60	37,45	-
2	30,30	30,21	-
3	78,30	78,39	3,49 (m, 1H)
4	39,40	39,31	-
5	141,00	140,89	-
6	122,00	121,86	5,32 (d, J = 5,0 Hz, 1H)
7	32,20	32,14	-
8	32,10	32,03	-
9	50,40	50,33	-
10	37,00	36,89	-
11	21,40	21,13	-
12	40,00	39,92	-
13	42,40	42,45	-
14	56,30	56,23	-
15	24,60	24,47	-
16	28,70	28,50	-
17	56,50	56,81	-
18	12,00	11,94	0,66 (s, 3H)
19	19,30	19,19	0,98 (s, 3H)
20	36,50	36,35	-
21	19,10	18,98	-
22	34,30	34,19	-
23	26,40	26,40	-
24	46,10	46,03	-
25	29,50	29,46	-
26	20,10	19,93	0,89 (d, J = 6,4 Hz, 3H)
27	19,50	19,38	0,79 (d, J = 5,6 Hz, 3H)
28	23,40	23,37	-
29	12,20	11,85	-

Figura 11 Espectro de RMN de ^1H de *Og-3* (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

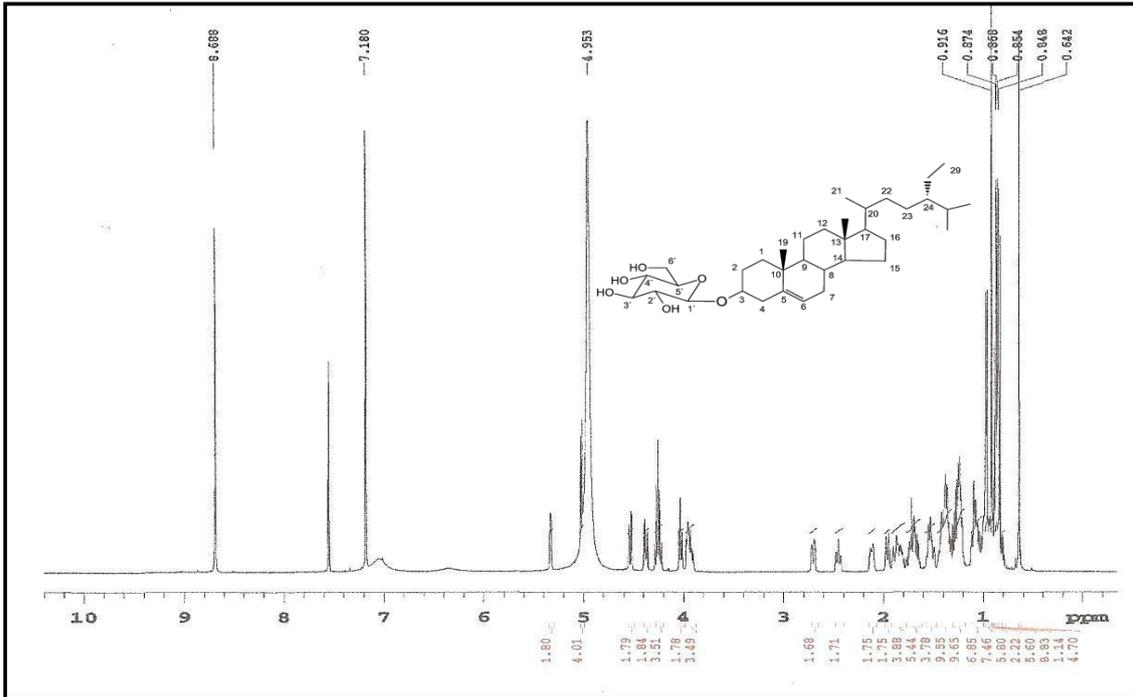


Figura 12 Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Og-3* na região de 5,5 a 3,8 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

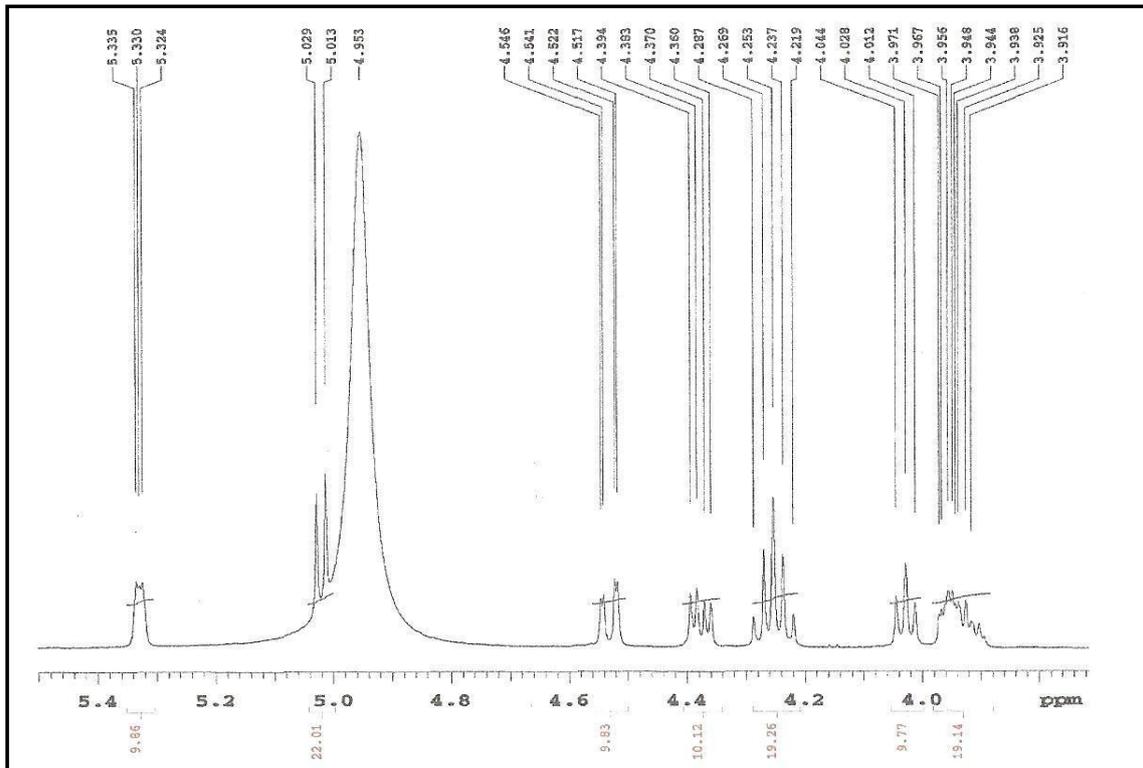


Figura 13 Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de *Og-3* na região de 154 a 101 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

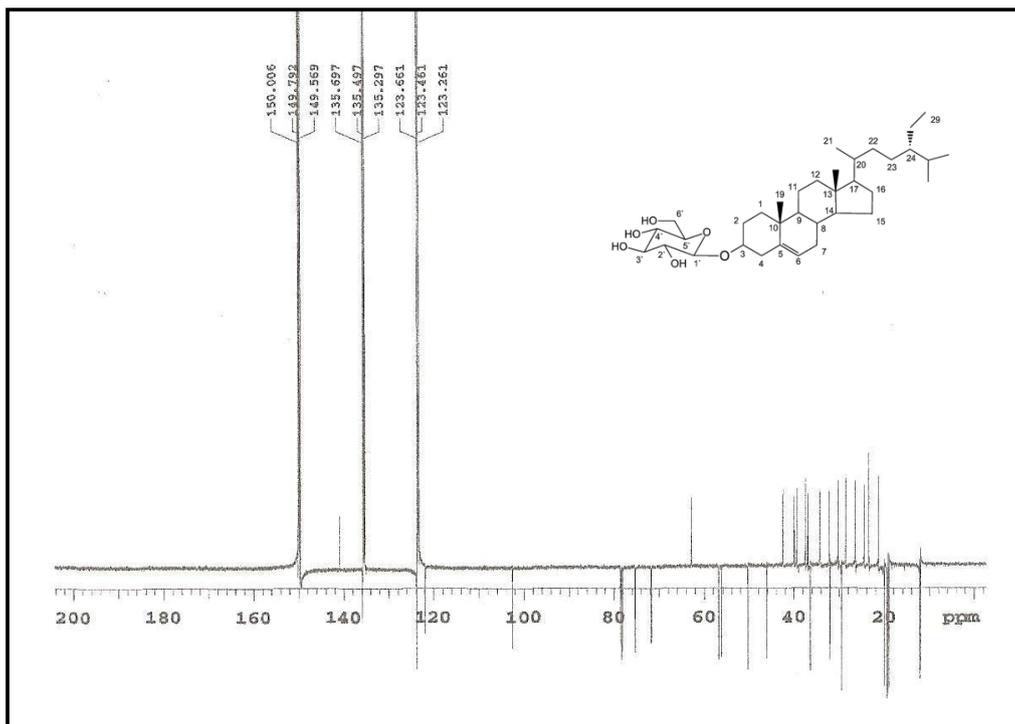


Figura 14 Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de *Og-3* na região de 80 a 45 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

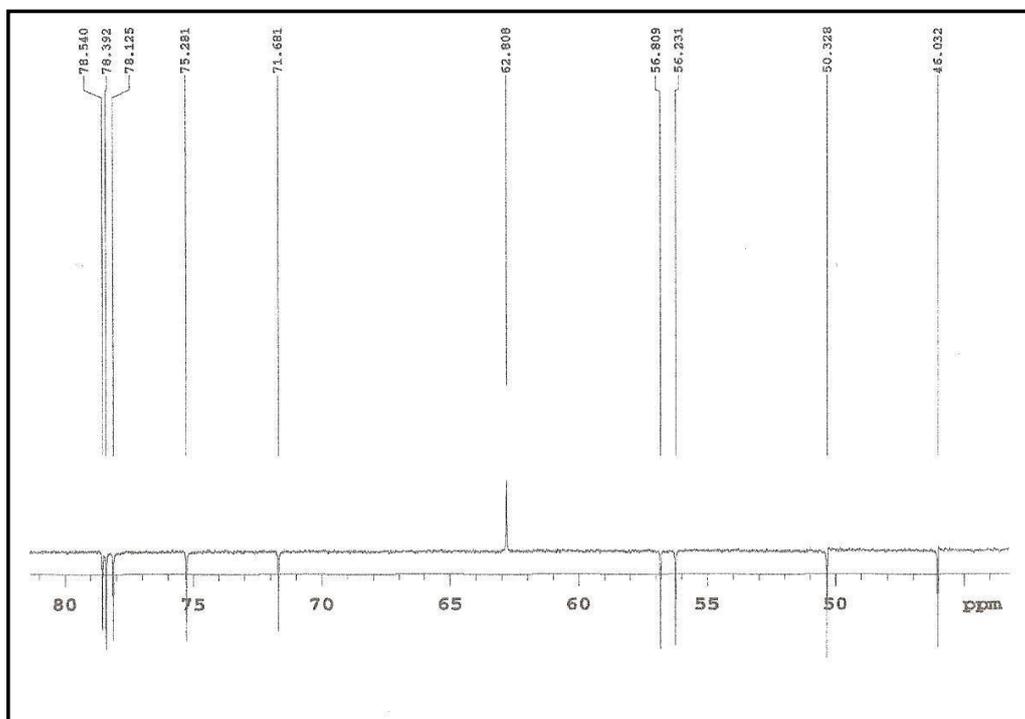
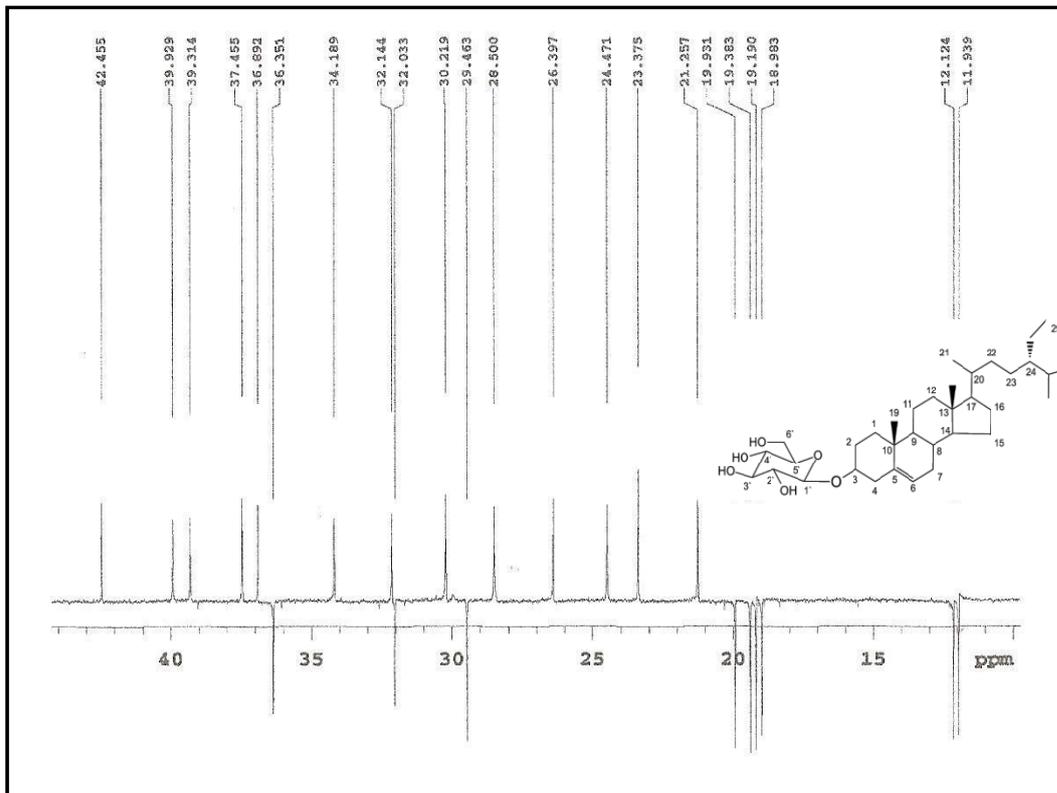


Figura 15 Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de *Og-3* na região de 44 a 10 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)



5.1.1.4 Identificação estrutural de *Og-4*

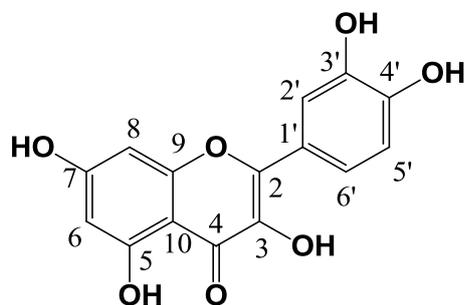
A substância codificada como *Og-4* foi obtida na forma de um pó amarelo com 43 mg e ponto de fusão 270-272 °C.

O espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, em CD_3COCD_3) de *Og-4* (Figuras 20, página 60) apresentou quinze sinais, correspondentes a quinze átomos de carbono. Destes 10 foram atribuídos a átomos de carbono não hidrogenados e 5 a átomos de carbono metínicos. Os sinais em δ_{C} 94,4 e 99,0, aliados a presença de 15 carbonos e δ_{C} em 162,3 e 164,9 permitiram inferir um anel A de flavonas 5,7-dissubstituído. O sinal em δ_{C} 137,2 sugeriu a posição C-3 substituída por OH (OLIVEIRA et al., 1999). Observou-se ainda os sinais em δ_{C} 148,2 e 145,7 que foram atribuídos a C-3' e C-4', que juntamente com os sinais em δ_{C} 115,7, 116,1 e 121,4 corroboraram para um anel B de flavonas com um padrão ABX.

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, em CD_3COCD_3) de *Og-4* e sua expansão (Figuras 18 e 19, página 61) apresentaram deslocamentos que corroboraram com a proposta do espectro de RMN de ^{13}C . Foram observados dois dubletos em δ_{H} 6,262 e 6,521 corroborando para um anel A 5,7-dissubstituído. O padrão de substituição para o anel B é confirmado com a presença de um duplo dubleto em δ_{H} 7,695 ($J = 8,6$ e $2,0$ Hz) acoplando *orto* com um dubleto em δ_{H} 6,993 ($J = 8,4$ Hz) e *meta* com um dubleto em δ_{H} 7,822 ($J = 2,0$ Hz) característicos do anel B com sistema ABX (MOREIRA et al., 2003).

Após análise desses dados e comparações com dados da literatura foi possível identificar *Og-4* como sendo a 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona, mais conhecida como quercetina (Tabela 10), relatada pela primeira vez em *Ocotea gardneri*.

Tabela 10 Dados de RMN ¹H e ¹³C de Og-4 em CD₃COCD₃ (200 e 50 MHz, respectivamente)



Quercetina

Posição	Og-4		CHARISIADIS et al., 2014 (CD ₃ COCD ₃)	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2	-	145,7	-	147,8
3	-	136,7	-	137,1
4	-	176,5	-	177,2
5	-	162,3	-	162,3
6	6,262 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)	99,0	6,17 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H)	99,1
7	-	164,9	-	165,3
8	6,522 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)	94,4	6,36 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H)	94,4
9	-	157,7	-	158,1
10	-	105,9	-	104,1
1'	-	123,7	-	124,0
2'	7,822 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	115,7	7,72 (d, $J = 2,0$, 1Hz, 1H)	115,9
3'	-	148,2	-	148,5
4'	-	145,7	-	146,0
5'	6,993 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)	116,1	6,98 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	116,1
6'	7,695 (dd, $J = 8,6; 2,0$ Hz, 1H)	121,4	7,60 (dd, $J = 8,4; 2,1$ Hz, 1H)	121,6

Figura 16 Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Og-4* (CD_3COCD_3 , 200 MHz)

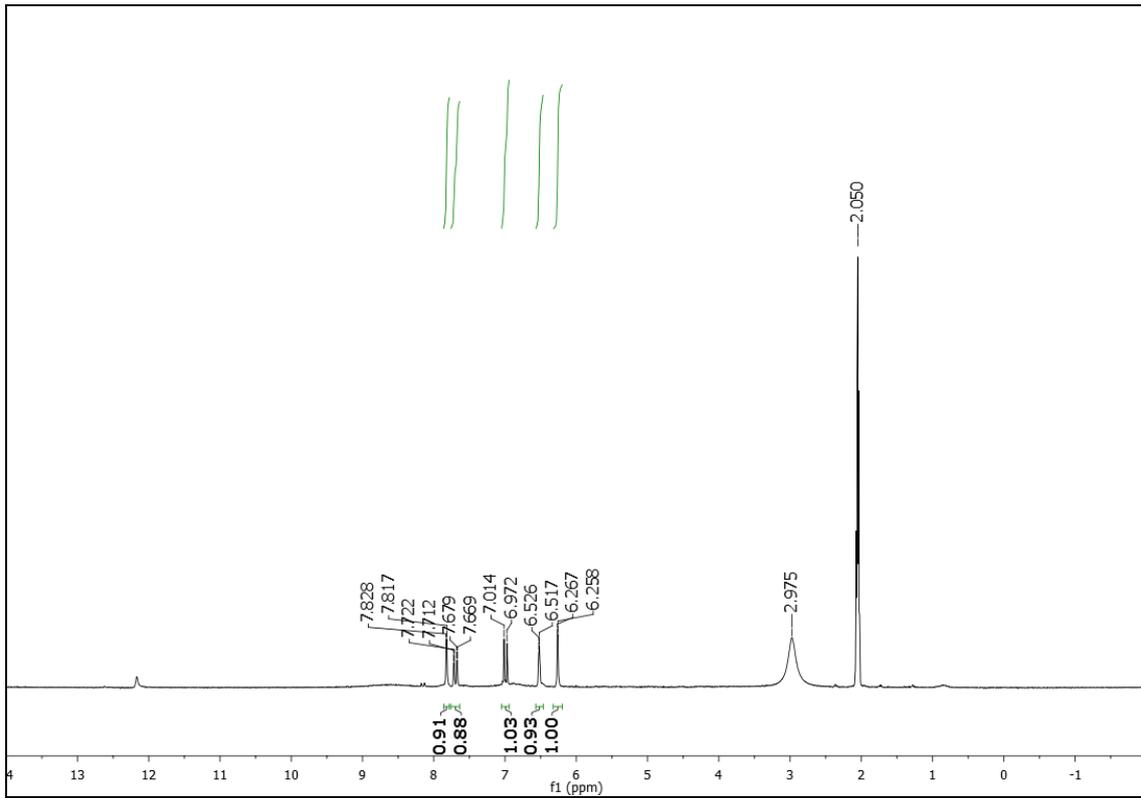


Figura 17 Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Og-4* (CD_3COCD_3 , 200 MHz)

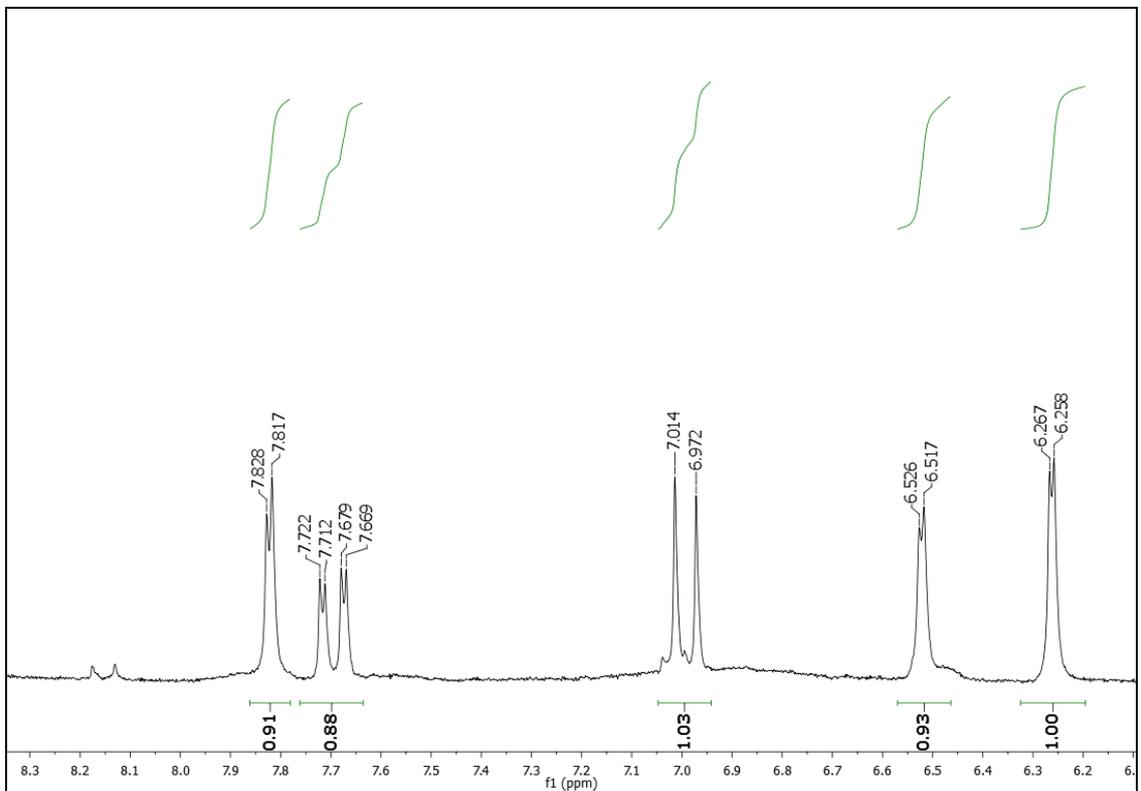
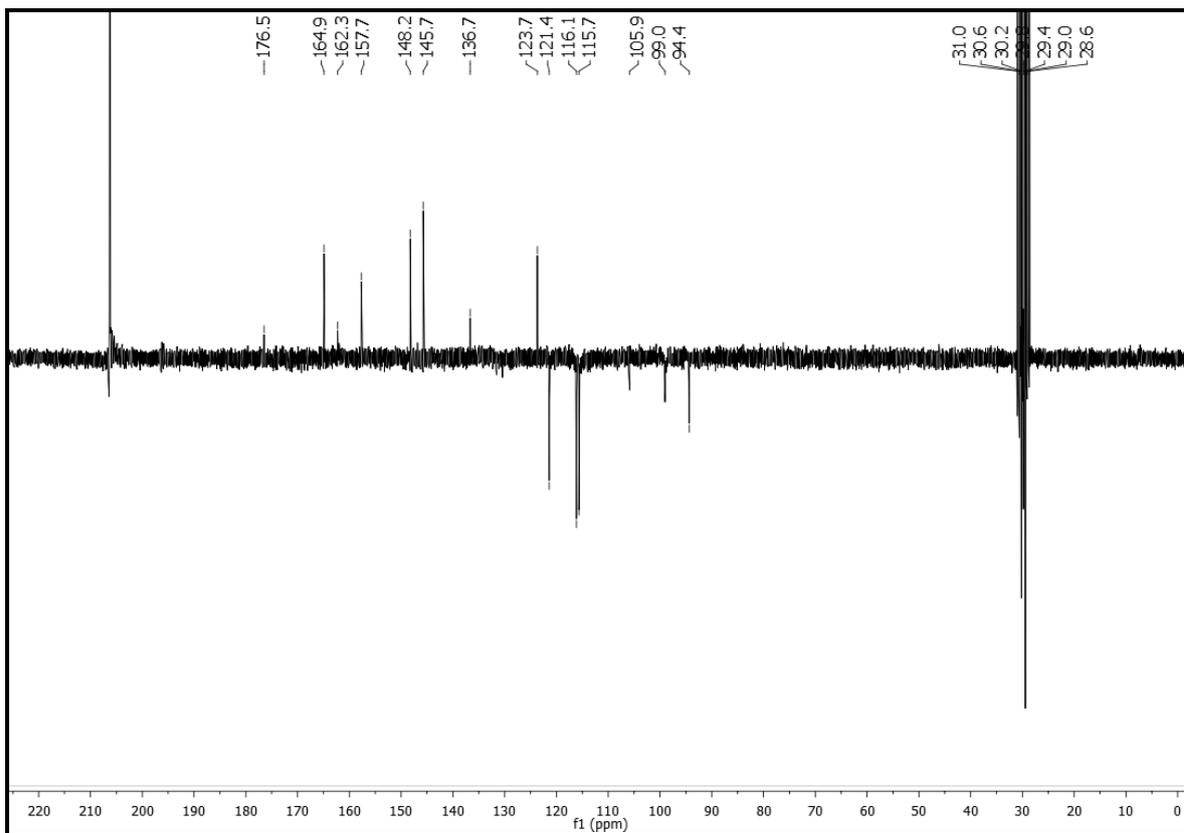


Figura 18 Espectro de RMN de ^{13}C de *Og-4* (CD_3COCD_3 , 50 MHz)



5.1.1.5 Identificação estrutural de *Og-5*

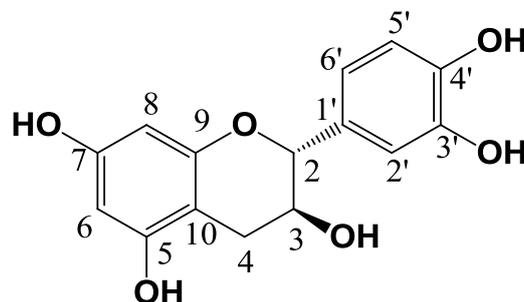
A substância codificada como *Og-5* foi obtida na forma de cristais incolores com 39 mg e ponto de fusão 175-177 °C.

No espectro de RMN ¹H de *Og-5* (CD₃OD, 200 MHz) (figura 21, página 64), observam-se sinais característicos de hidrogênios aromáticos entre δ_H 5,854 e 6,837. Os dois dubletos com constantes de acoplamentos meta $J = 2,4$ Hz em 5,854 e 5,929 ppm são atribuídos aos hidrogênios dos C-6 e C-8 do anel A de flavonoides. Em seguida encontram-se sinais para o sistema catecol constituído de um dubleto com constante de acoplamento meta $J = 1,4$ Hz em δ_H 6,83, atribuído ao H-2' e um multipletto em δ_H 6,750-6,728, atribuído a H-5' e H-6' (Figura 23, página 59).

Na expansão RMN ¹H de *Og-5* (CD₃OD, 200 MHz) (figura 22, página 64), observam-se dois duplos dubletos em δ_H 2,852 e δ_H 2,50, característicos de hidrogênios de grupo metilênico (H-4a e H-4b); um multipletto (m, 1H) em δ_H 3,92-4,00, atribuído a um hidrogênio ligado a carbono oximetínico (H-3); um dubleto, integrando para um hidrogênio, em δ_H 4,564, referente a H-2 com $J = 7,5$ Hz acoplado com o H-3, o qual aparece como multipletto em δ_H 4,0-3,92 atribuído aos acoplamentos com os H-4 axial e H-4 equatorial do C-4. Esse conjunto de sinais é típico do anel C de catequinas. Os hidrogênios metilênicos do C-4 encontram-se mais protegidos sobre seu núcleo em relação aos outros.

No espectro de RMN ¹³C (figura 24, página 65) observam-se 14 sinais, sendo o sinal em δ_C 146,2 refere-se a 2 carbonos com o mesmo valor de deslocamento químico, portanto perfazendo um total de 15 carbonos, que correspondem aos quinze átomos carbono da estrutura flavonoídica. A ausência de carbono sp² de carbonila e a presença do sinal em δ_C 28,5 para carbono metilênico (C-4), e os sinais δ_C 68,8 (atribuído a carbono sp³ ligado a hidroxila) e δ_C 82,8 para carbono ligado a um heteroátomo do anel pirano e a um grupo fenil são típicos do anel C de um flavanol. Também são observados sinais δ_C 146,2 típico de sistema catecol (anel B). Portanto, os deslocamentos químicos mostrados em comparação com os dados da literatura (QI et al, 2012), permitiram caracterizar *Og-5* como a catequina (Tabela 11, página 63).

Tabela 11 Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *Og-5* em CD_3OD (200 e 50 MHz, respectivamente).



Catequina

Posição	<i>Og-5</i> (CD_3OD , 200 MHz)		QI et al, 2012 (CD_3OD , 400 MHz)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	4,564 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H)	82,8	4,57 (1H, d, $J=7,6$ Hz)	82,3
3	3,92-4,0 (m, 1H)	68,8	4,01(1H, ddd, $J=5,4; 8,2; 7,6$ Hz)	68,3
4a	2,852 (dd, $J = 16,0, 5,4$ Hz, 1H)	28,5	2,88 (1H, dd, $J=5,4; 16,1$ Hz)	28,2
4b	2,50 (dd, $J = 16,1, 8,0$ Hz, 1H)		2,52 (1H, dd, $J=8,2; 16,1$ Hz)	
5	-	157,6	-	156,9
6	5,929 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H)	96,2	5,95 (1H, d, $J=1,8$ Hz)	96,2
7		157,8	-	157,0
8	5,854 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H)	95,5	5,88 (1H, d, $J=1,8$ Hz)	95,4
9	-	156,9	-	156,3
10	-	100,8	-	100,7
1'	-	132,2	-	131,6
2'	6,837 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H)	115,2	6,83 (1H, d, $J=1,8$ Hz)	115,0
3'	-	146,2	-	145,6
4'	-	146,2	-	145,7
5'	6,750 – 6,728 (m, 2H)	116,0	6,77 (1H, d, $J=8,0$ Hz)	116,0
6'	6,750 – 6,728 (m, 2H)	120,0	6,72 (1H, d, $J=8,0$ Hz)	119,9

Figura 19 Espectro de RMN de ^1H de *Og*-5 (CD_3OD , 200 MHz).

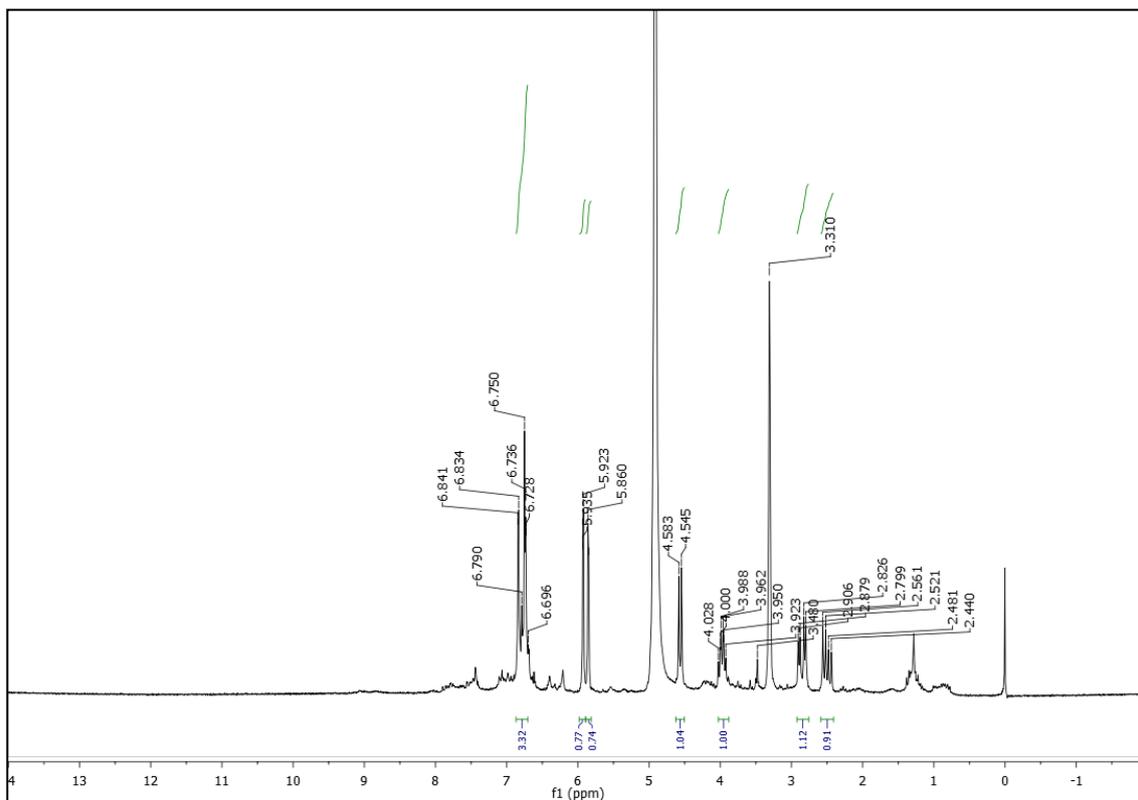


Figura 20 Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Og*-5 (CD_3OD , 200 MHz).

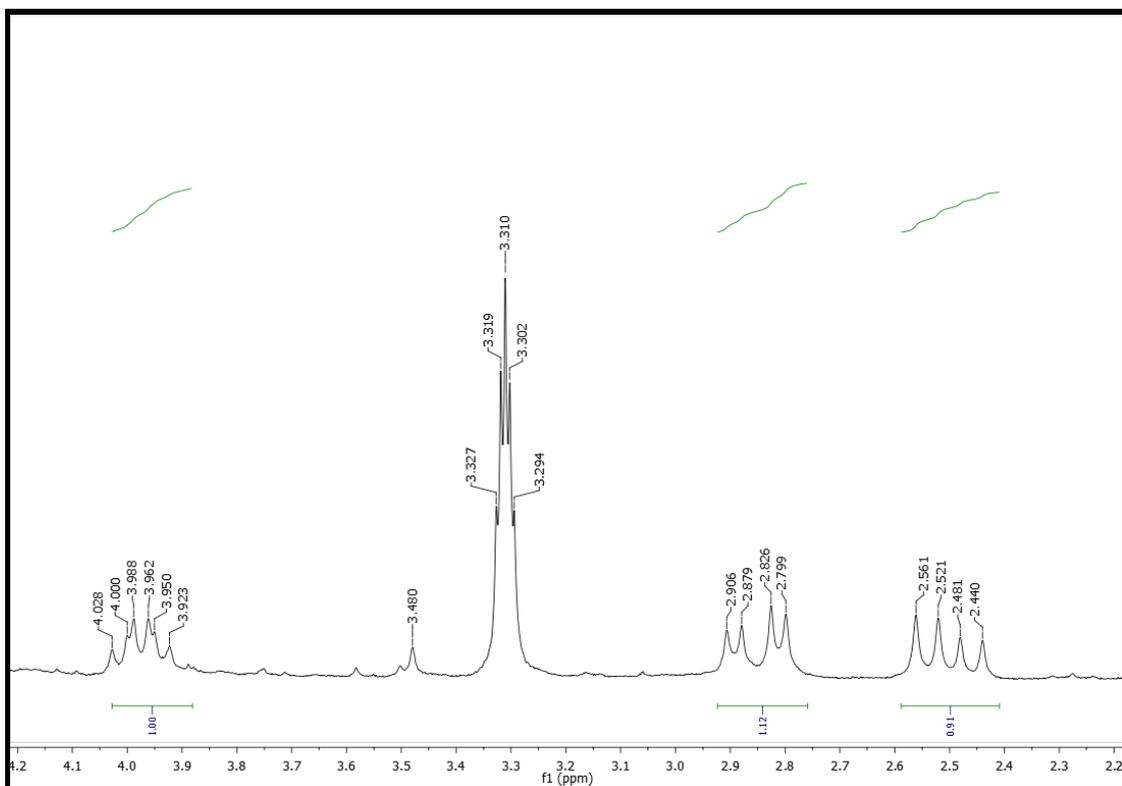


Figura 21 Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Og-5* (CD_3OD , 200 MHz).

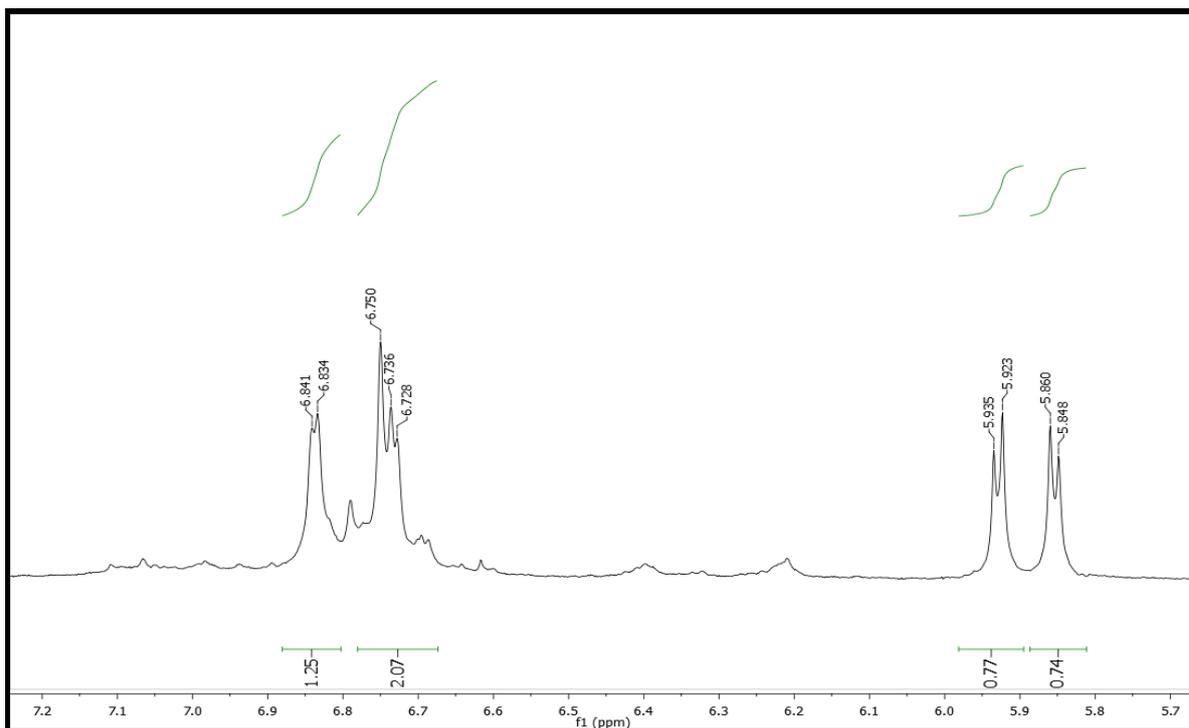
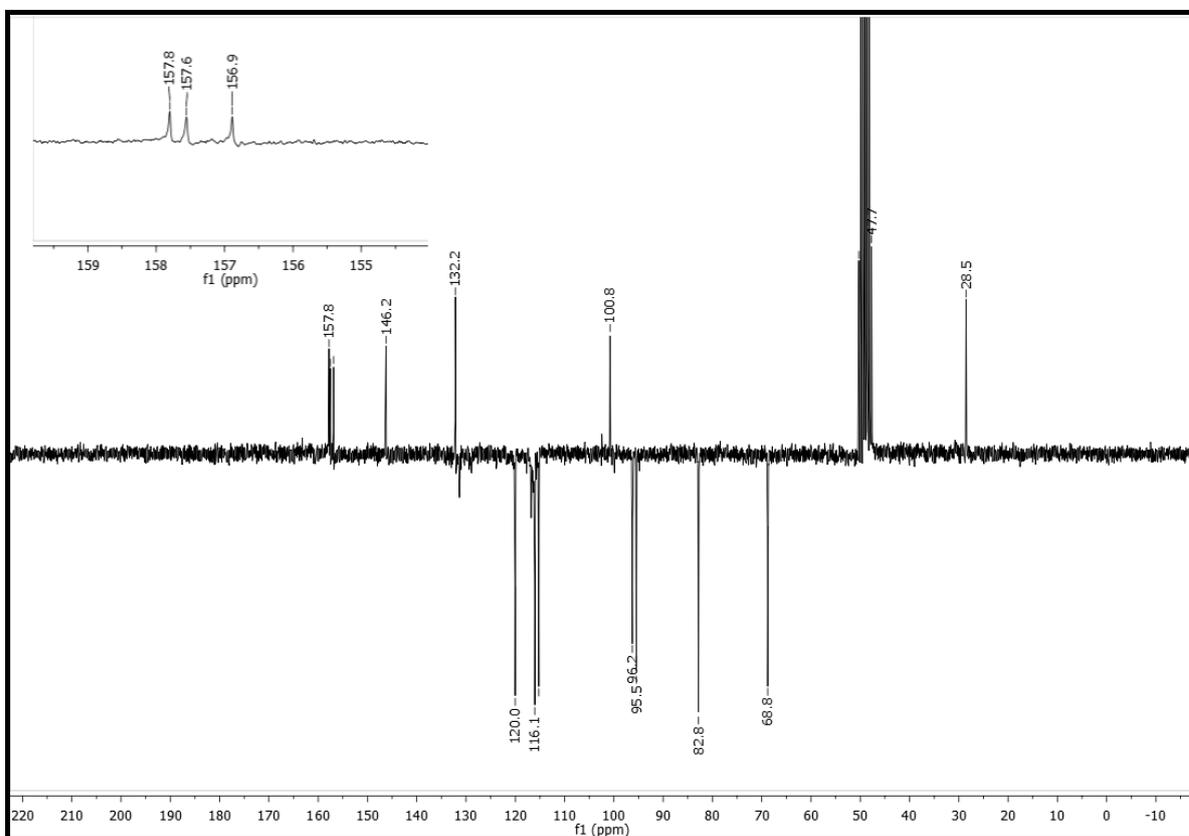


Figura 22 Espectro de RMN de ^{13}C APT de *Og-5* (CD_3OD , 50 MHz).



5.1.1.6 Identificação estrutural de *Og-6*

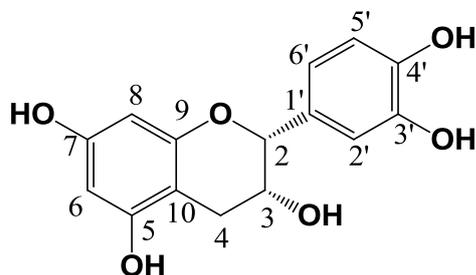
A substância codificada como *Og-6* foi obtida na forma de cristais incolores com 27 mg e ponto de fusão 178-180 °C.

A análise do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 25 a 28, páginas 63 e 64), em comparação com os dados da literatura (QI et al, 2012) e com os dados de *Og-5*, ilustrados na Tabela 11, página 63, permitiram sugerir que a substância tem o esqueleto estrutural semelhante à catequina.

Os dados de RMN ^1H de *Og-6* (Figuras 25 a 27, páginas 68 e 69) são similares aos de *Og-5*, destacando-se apenas pequenas diferenças tanto no deslocamento químico como no padrão de acoplamento, principalmente com relação aos hidrogênios alifáticos. Por exemplo, H-2 e H-3 exibem singletos em δ_{H} 4,803 e 4,165, respectivamente, e H-4b um duplo dubleto em δ_{H} 2,715 com $J = 16,8$ e 2,8 Hz, em consequência da mudança da estereoquímica do carbono C-3 (OH- α) em *Og-6*.

Os dados espectrais de RMN ^{13}C de *Og-6* (Figura 28, página 69), também são semelhantes aos de *Og-5*, destacando-se como diferença apenas os sinais atribuídos a C-2 (δ_{C} 79,8) e a C-3 (δ_{C} 66,6), caracterizando a estereoquímica diferenciada de *Og-6* em relação a *Og-5*, ou seja, *Og-6* tem estereoquímica relativa 3-OH α , tratando-se portanto de um epímero de *Og-6*. Esses dados foram comparados com a literatura, o que permitiu confirmar que *Og-6* trata-se da epicatequina (LÔBO et al., 2008).

Tabela 12 Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *Og-6* em CD_3OD (200 e 50 MHz, respectivamente)



Epicatequina

Posição	<i>Og-6</i> (CD_3OD , 200 e 50 MHz)		Lôbo et al, 2008 (CD_3OD , 300 75 MHz)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	4,803 (s, 1H)	79,8	4,82 (sl, 1H)	79,1
3	4,165 (s, 1H)	67,5	4,17 (sl, 1H)	66,6
4a	2,862 (dd, $J = 16,8$ e $4,4$ Hz, 2H),	29,3	2,85 (dd, $J = 16,8$ e $4,5$ Hz, 1H)	28,5
4b	2,715 (dd, $J = 16,8$ e $2,8$ Hz, 1H)		2,72 (dd, $J = 16,8$ e $2,4$ Hz, 1H)	
5	-	158,0	-	157,3
6	5,928 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H)	96,3	5,93 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)	96,0
7	-	157,3	-	156,7
8	5,905 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H)	95,9	5,91 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)	95,3
9	-	157,6	-	157,1
10	-	100,0	-	99,5
1'	-	132,3	-	131,7
2'	6,964 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H)	115,3	6,97 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H)	115,0
3'	-	145,7	-	145,0
4'	-	145,9	-	145,1
5'	6,777 – 6,761 (m, 2H)	115,9	6,75 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H)	115,4
6'	6,777 – 6,761 (m, 2H)	119,4	6,79 (dd, $J = 8,1$ e $1,2$ Hz, 1H)	119,0

Figura 23 Espectro de RMN de ^1H de *Og*-6 (CD_3OD , 200 MHz).

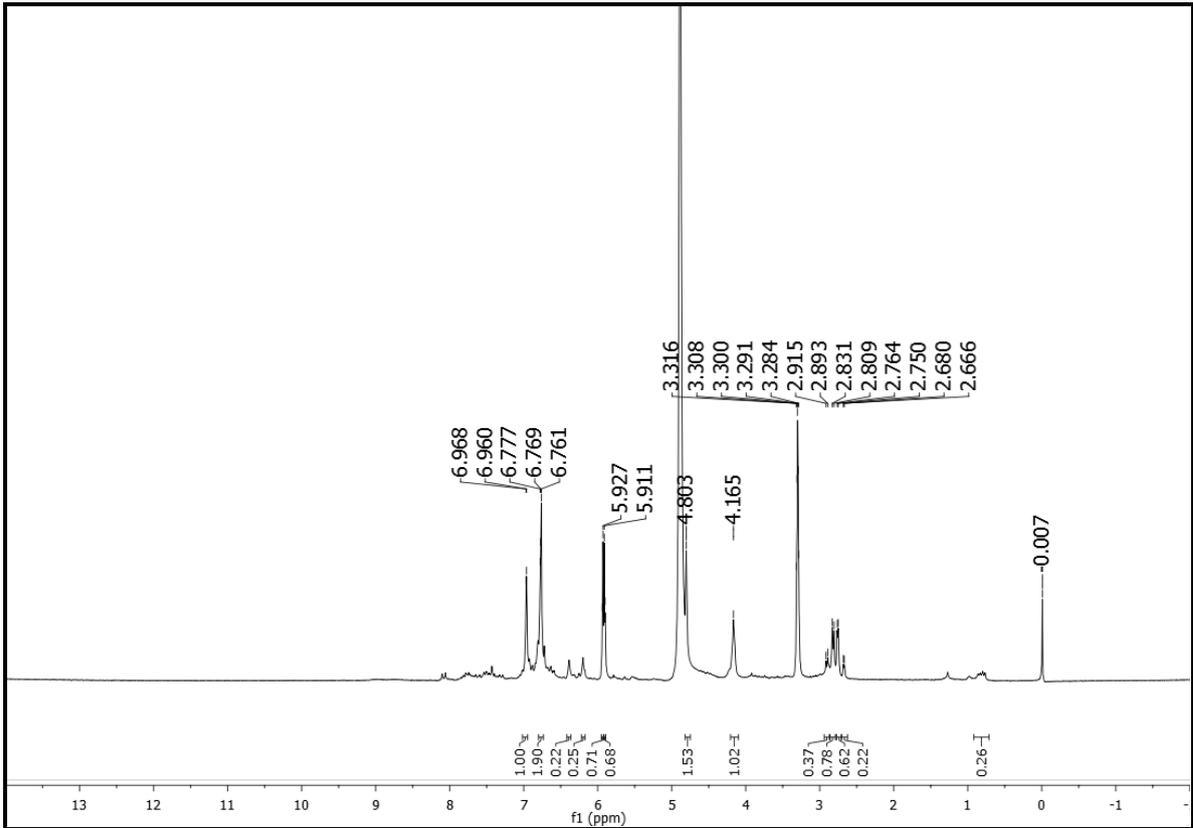


Figura 24 Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Og*-6 (CD_3OD , 200 MHz).

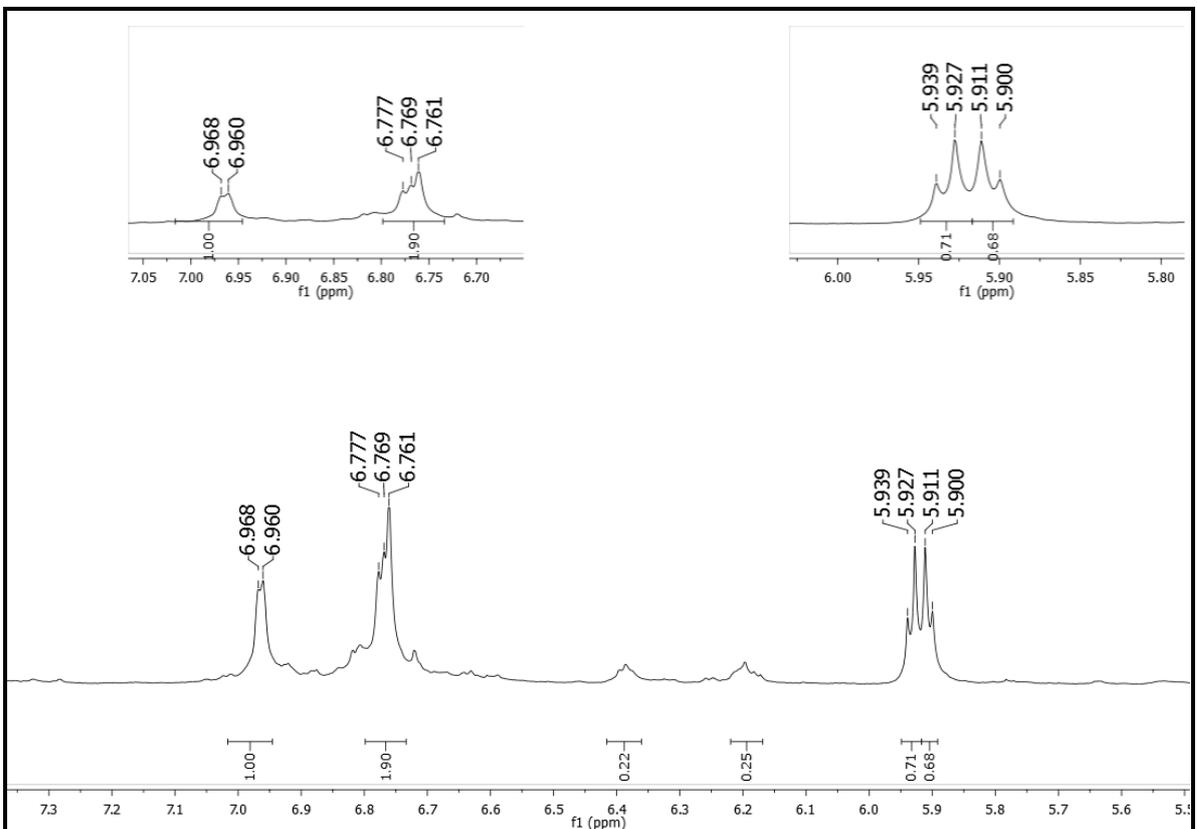


Figura 25 Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Og-6* (CD_3OD , 200 MHz).

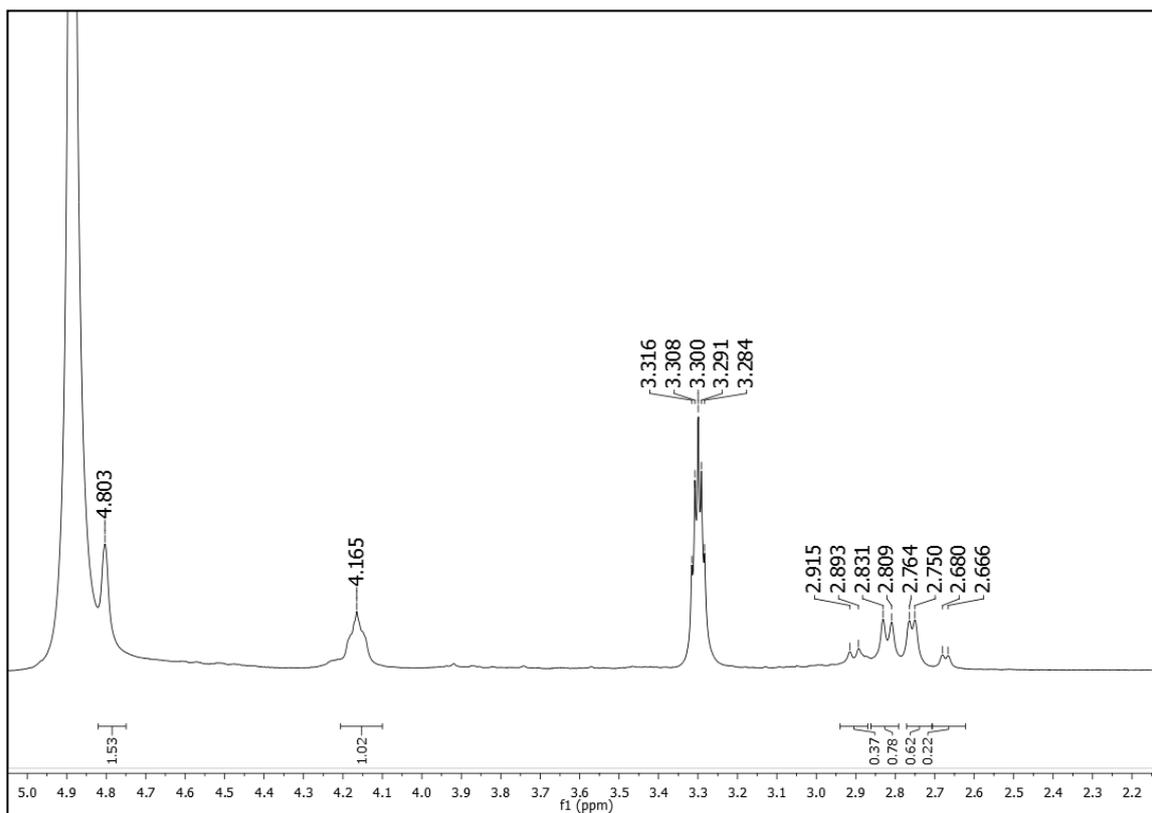
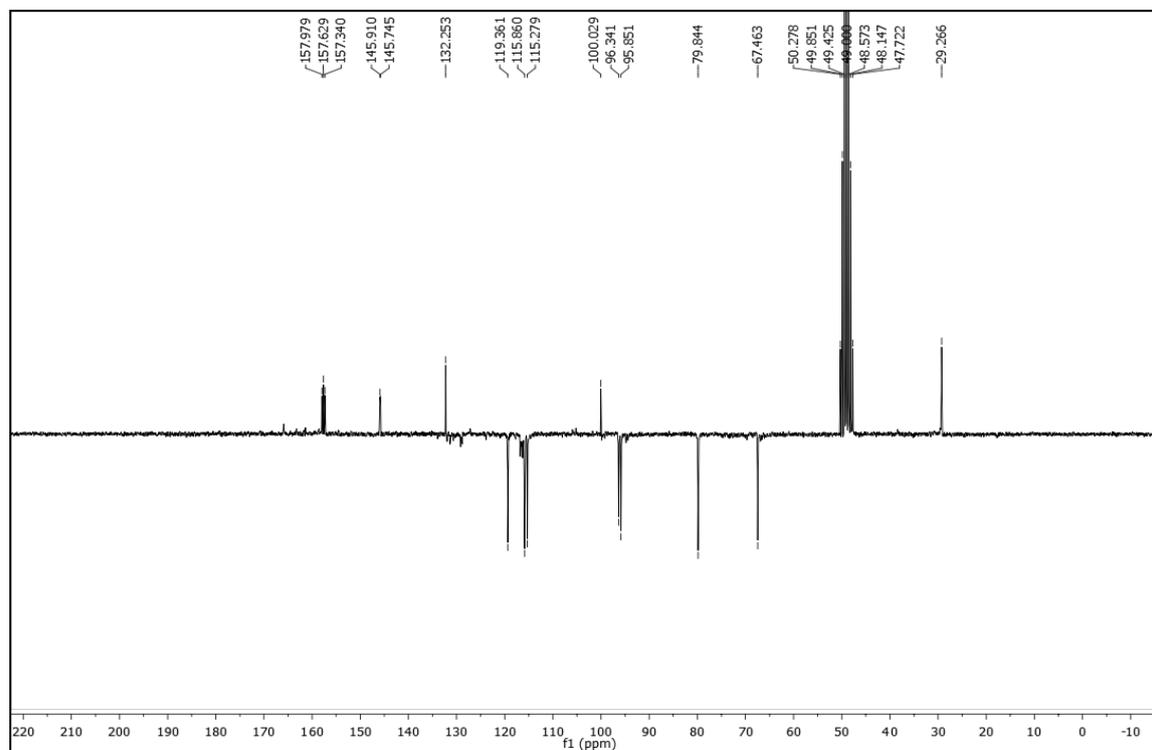


Figura 26 Espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Og-6* (CD_3OD , 50 MHz).



5.1.2 Substâncias isoladas das partes aéreas de *Ocotea duckei*

5.1.2.1 Identificação estrutural de *Od-1*

A substância codificada como *Od-1* foi obtida na forma de um sólido amorfo com 36 mg.

A análise dos espectros de RMN-¹³C e ¹H foram comparados e compatíveis com uma substância anteriormente isolada de *Ocotea duckei*, reticulina (DIAS, 2004).

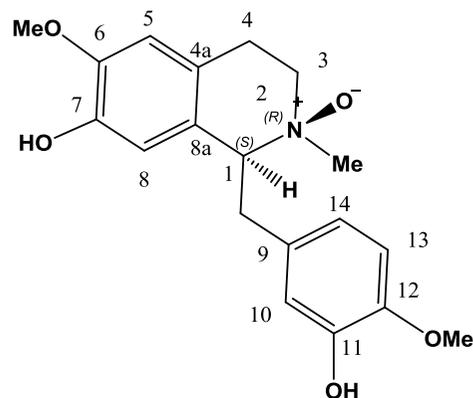
5.1.2.2 Identificação estrutural de *Od-2*

A substância codificada como *Od-2* foi obtida na forma de um óleo marrom com 18 mg.

O espectro de RMN-¹³C (Figura 33) apresentou 19 sinais atribuídos a 2 oximetílicos, 3 metilênicos, 6 metínicos e 7 não hidrogenados. Os deslocamentos são semelhantes aos apresentados pela reticulina, no entanto deslocamentos em δ_C 79,26 (C - 1) e 62,52 (C - 3) são características da porção N - óxido, por estarem mais desprotegidos em relação aos sinais da reticulina δ_C 64,4 e 46,2, respectivamente.

O espectro de RMN ¹H (figura 32) mostrou na região aromática um sistema ABX: um duplo dubleto em δ_H 6,612 (dd, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz, H-14, 1H) acoplado meta com o dubleto δ_H 6,658 (d, $J = 12,0$ Hz, H-10, 1H) e orto com o dubleto em δ_H 6,842 (d, $J = 8,0$ Hz, H-13, 1H). Também foi observado nessa região dois singletos um em δ_H 6,720 (H-5) e outro em δ_H 6,318 (H-8). Esses sinais são característicos de alcaloides do tipo benziltetrahydroisoquinolínico 6, 7, 11, 12 tetraoxigenado.

Outros sinais significativos foram observados no espectro RMN ¹H (Figura 31): três singletos com integração para 3 hidrogênios em δ_H 3,81, 3,82 e 3,21, sugerindo a presença de duas metoxilas e uma *N*-metila atribuídos a (CH₃O-6), (CH₃O-12) e a *N*-CH₃, respectivamente.

Tabela 13 Dados de RMN 13C de *Od-2* (CD3OD, 125 MHz) em comparação com dados da literatura.


<i>Od-2</i>	<i>N</i> -óxido reticulina (SAIDI et al, 2011)		HMBC			
δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J	
1	4,461 (dd, $J = 8,0, 2,5$ Hz, 1H)	79,5	4,53- 4,56, (dd, $J = 8,56;$ 2,68 Hz)	79,21	-	
1a	3,704 – 3,638 (m, 1H)	39,1	3,61-3,65, <i>m</i>	38,87	-	-
1b	2,883-2,792 (m, 1H)	39,1			C-9	C-8a, C-10 e C-14
3	3,481 – 3,432 (m, 2H)	62,8	3,42-3,49, <i>m</i>	62,50		

4	2,961 – 2,903 (m, 1H)	26,2	2,88-2,94, <i>m</i>	25,98	-	C-1
4a	-	122,8	-	122,47	-	-
5	6,720 (<i>s</i> , 1H)	112,2	6,71, <i>s</i>	111,97	C-6	C-7 e C-8
6	-	148,8	-	148,63	-	C-4 e C-8a
7	-	146,0	-	145,75	-	-
8	6,318 (<i>s</i> , 1H)	115,5	6,28, <i>s</i>	115,27	C-7	C-4a e C-6
8a	-	126,9	-	126,63	-	-
9	-	131,4	-	131,04	-	-
10	6,658 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	121,5	6,63, (<i>d</i> , $J = 1,96$)	121,28	-	C-11
11	-	147,9	-	147,64	-	-
12	-	148,1	-	147,89	-	-
13	6,842 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz, 1H)	113,1	6,82, (<i>d</i> , $J = 8,04$)	112,78	-	C-9
14	6,612 (<i>dd</i> , $J = 8,0, 2,0$ Hz, 1H)	11,2	6,58, (<i>dd</i> , $J = 8,32, 1,96$)	116,95	-	-
N-Me	3,203 (<i>s</i> , 3H)	54,8	3,30, <i>s</i>	54,48	-	C-1 e C-3
OMe-6	3,806 (<i>s</i> , 3H)	56,4	3,79, <i>s</i>	56,12	-	-
OMe-12	3,819 (<i>s</i> , 3H)	56,5	3,80, <i>s</i>	56,20	-	-

Na análise do espectro bidimensional HMBC de *Od-2* (Figuras 36 e 37) foi possível correlações importantes são a 2J do H-1a com carbono C-9 como também a 3J do mesmo hidrogênio com C-8a, C-10 e C-14, que permitiram evidenciar a ligação do anel metoxilado com núcleo tetrahydrobenzilisquinolínico. Esses dados foram comparados e compatíveis com uma substância N-óxido-reticulina de fórmula molecular $C_{19}H_{23}O_5N$.

O duplo dubleto em δ_H 4,461 ($J = 8,5$ e $2,8$ Hz, 1H) de H-4, em comparação com dados da literatura, classificam como N_β -óxido de reticulina, uma vez que a N_α -óxido de reticulina apresenta um deslocamento para δ_H 5,08 para H-4. Todos os assinalamentos para N_α -óxido-reticulina se encontram na Tabela 13. Este composto foi relatado em *Neolitsea sericea* (CUSTÓDIO; VEIGAS-JUNIOR, 2014) e *Cryptocaryata rugulosa* (SAIDI et al., 2011), sendo o primeiro relato em *Ocotea*.

Figura 27 Espectro de RMN 1H de *Od-2* (CD_3OD , 500 MHz)

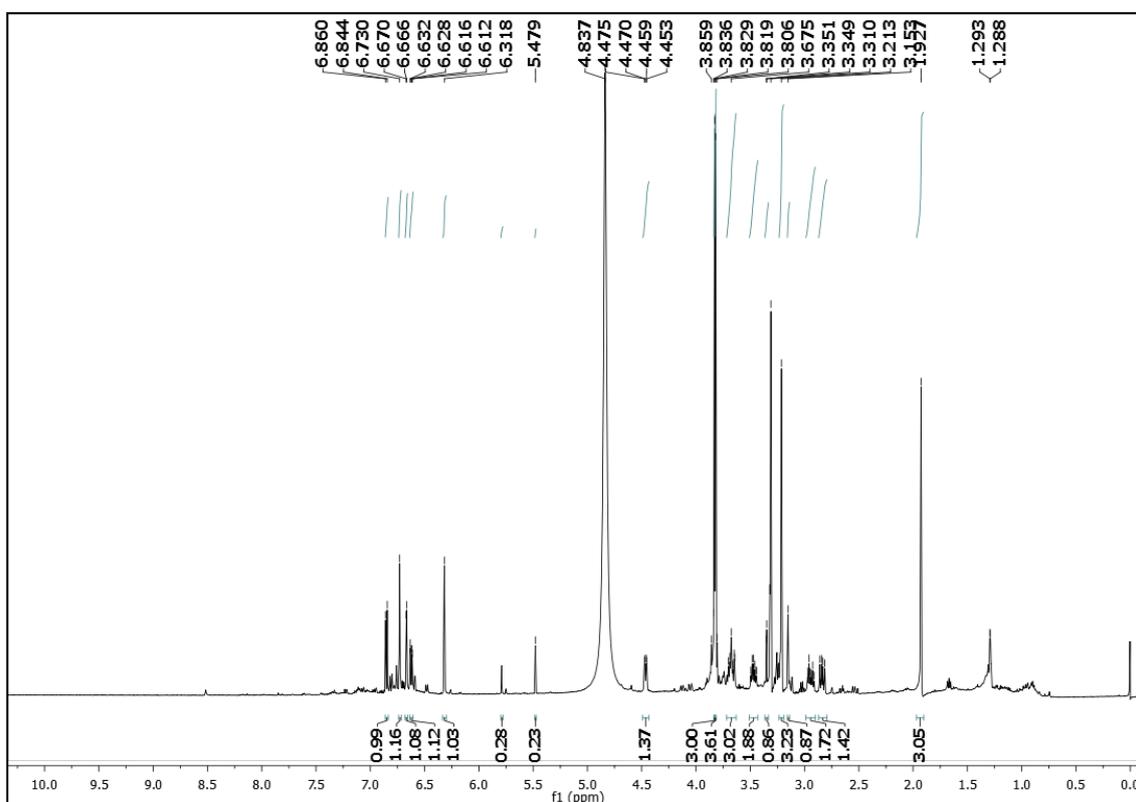


Figura 28 Expansão do espectro de RMN ¹H de *Od-2* (CD₃OD, 500 MHz)

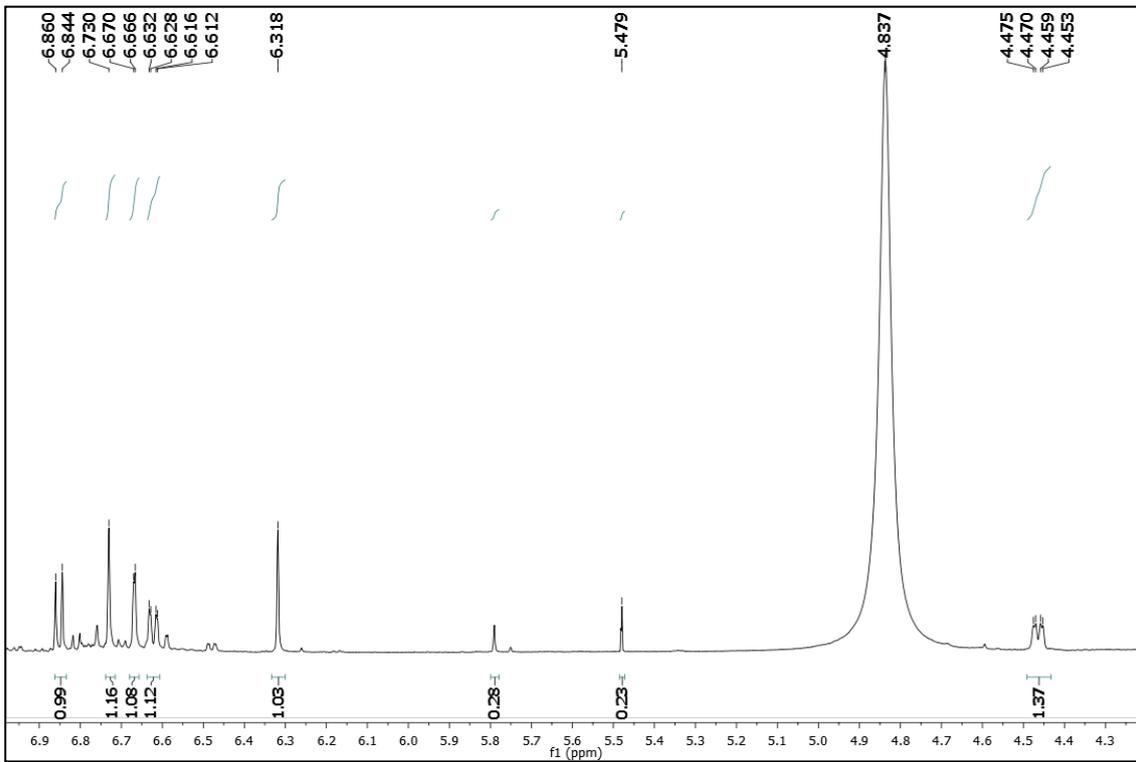


Figura 29 Expansão do espectro de RMN ¹H de *Od-2* (CD₃OD, 500 MHz)

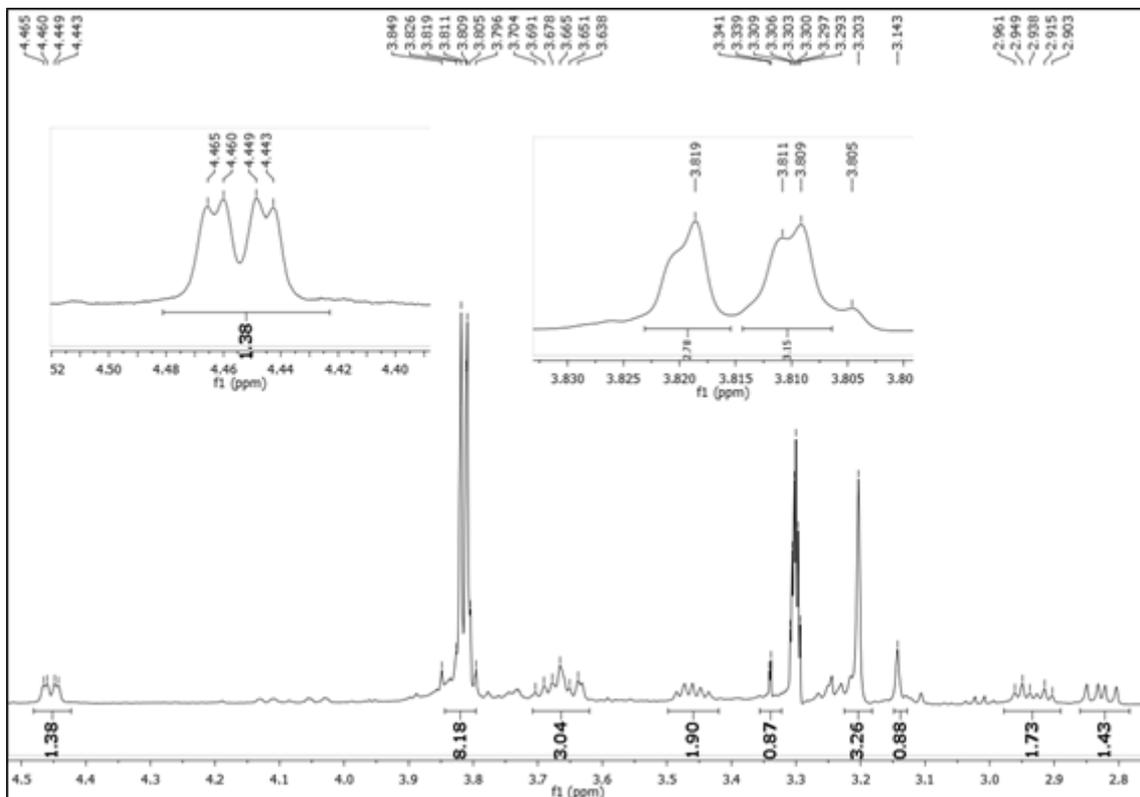


Figura 30 Expansão do espectro de RMN ^1H de *Od-2* (CD_3OD , 500 MHz)

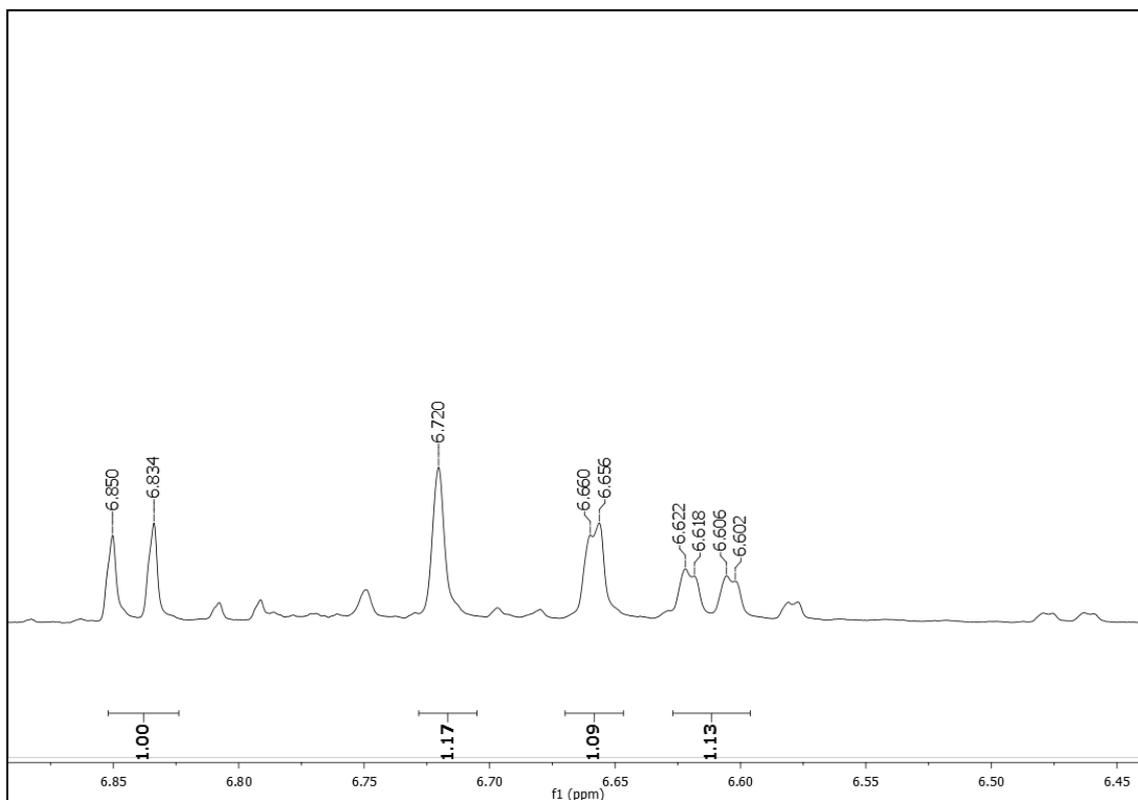


Figura 31 Espectro de RMN ^{13}C -APT de *Od-2* (CD_3OD , 125 MHz)

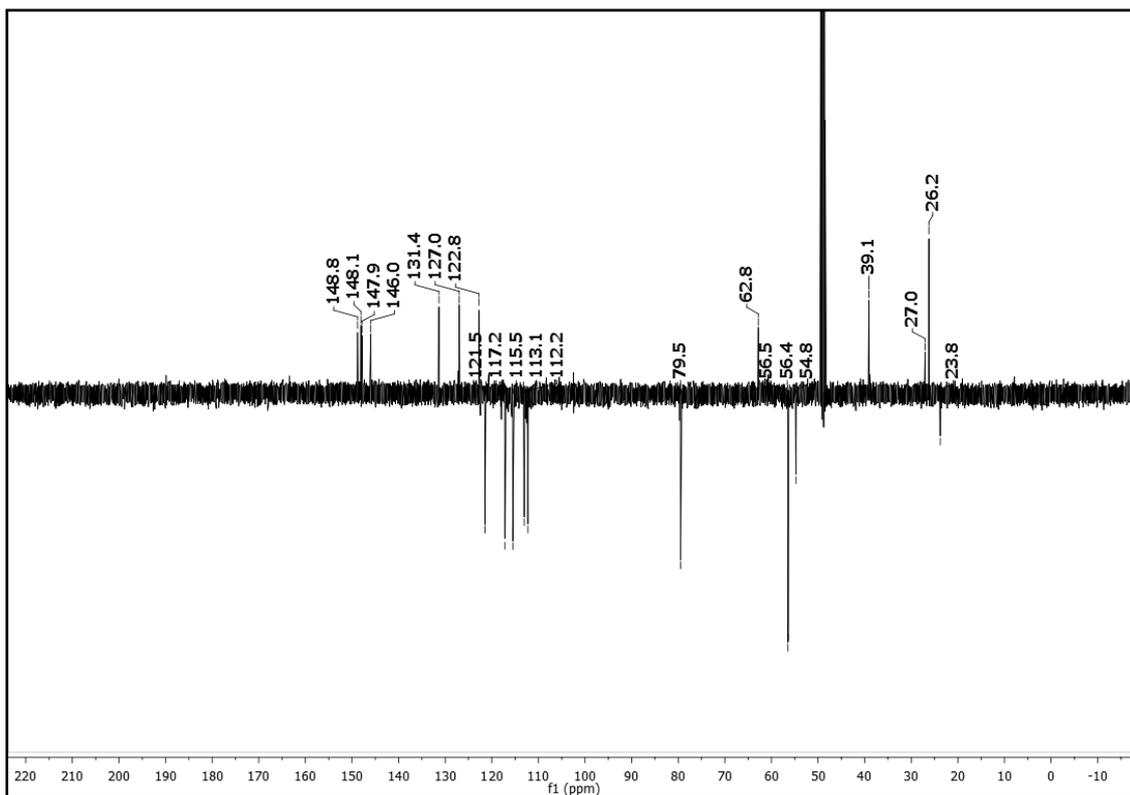


Figura 32 Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de *Od-2* (CD_3OD , 125 MHz)

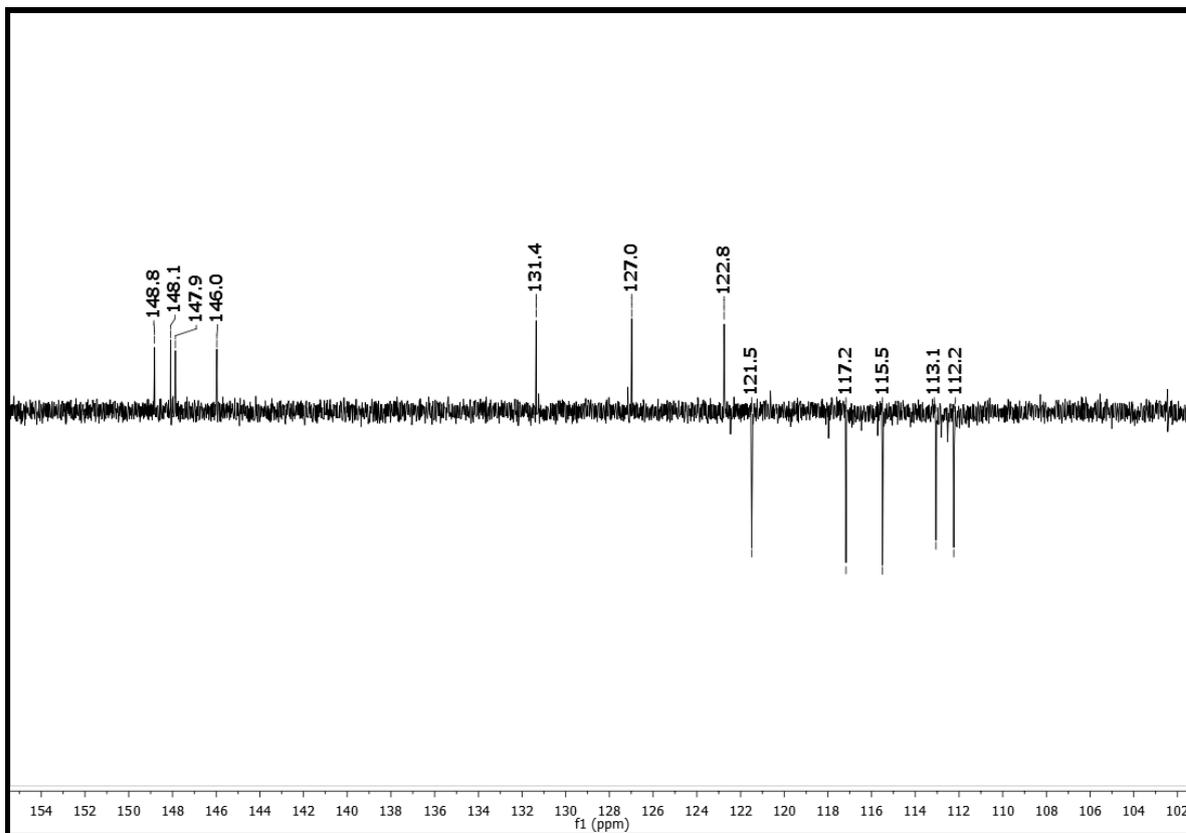


Figura 33 Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de *Od-2* (CD_3OD , 125 MHz)

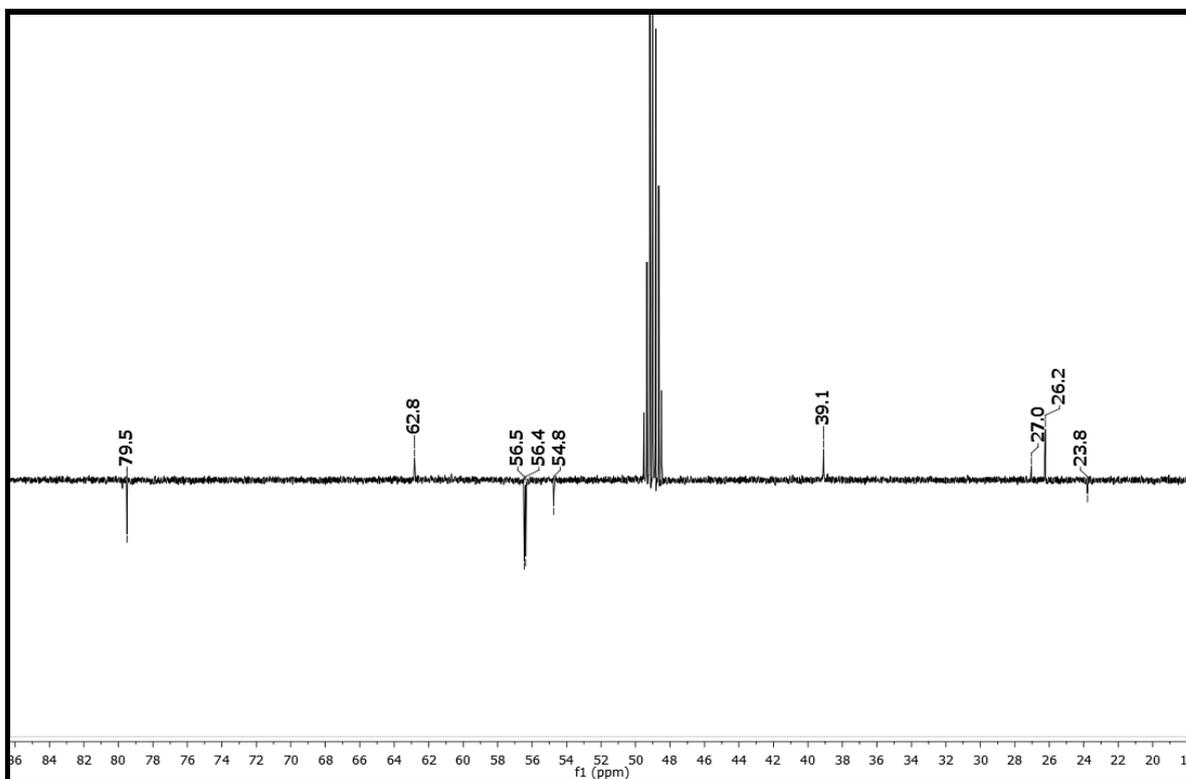


Figura 34 Espectro de HMBC de *Od-2* (CD₃OD, 500 e 125 MHz).

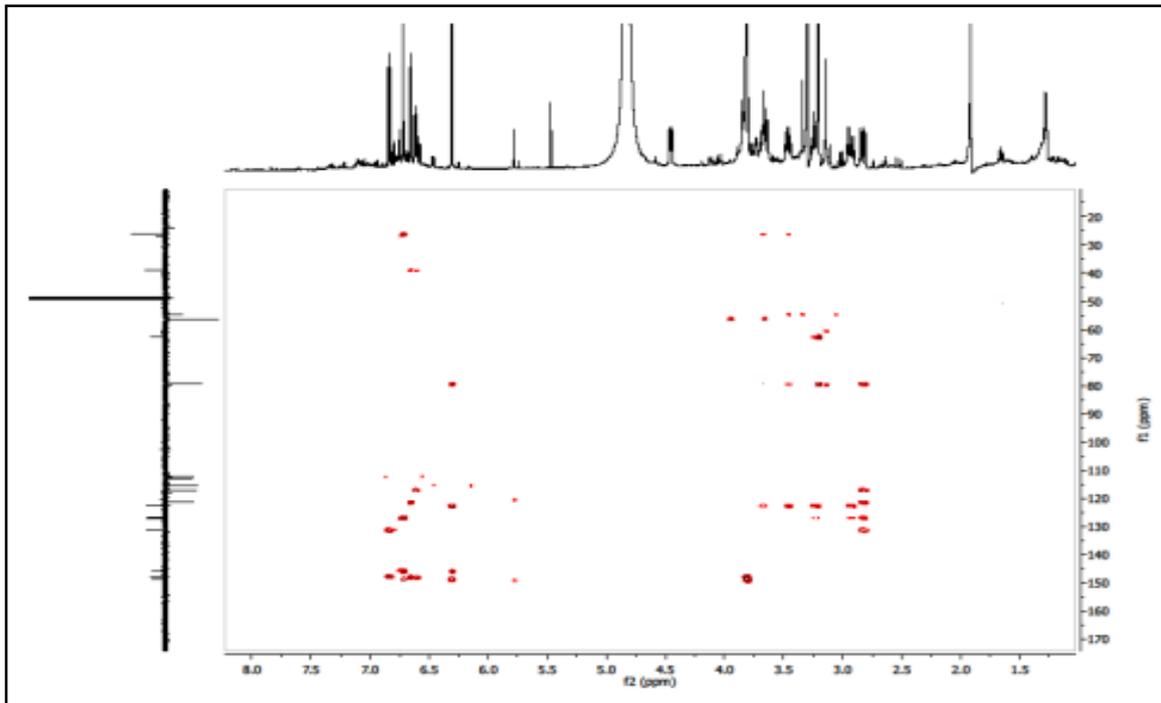


Figura 35 Expansão do espectro de HMBC de *Od-2* (CD₃OD, 500 e 125 MHz).

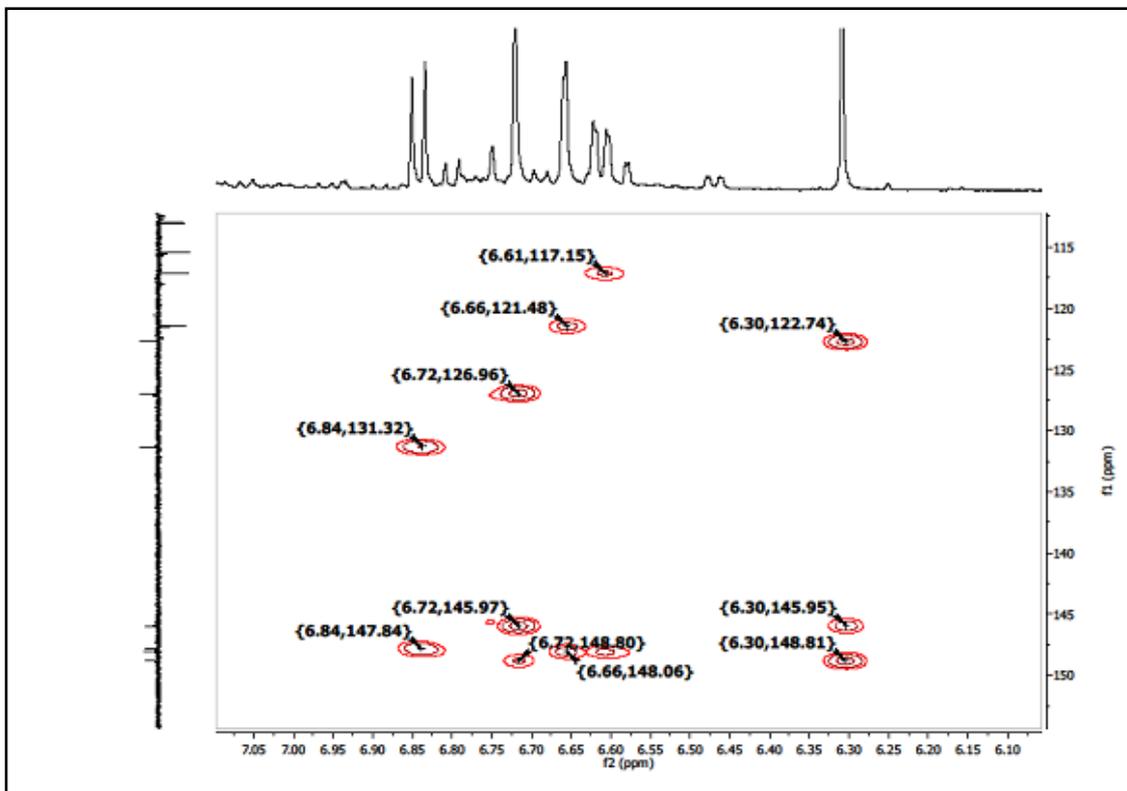
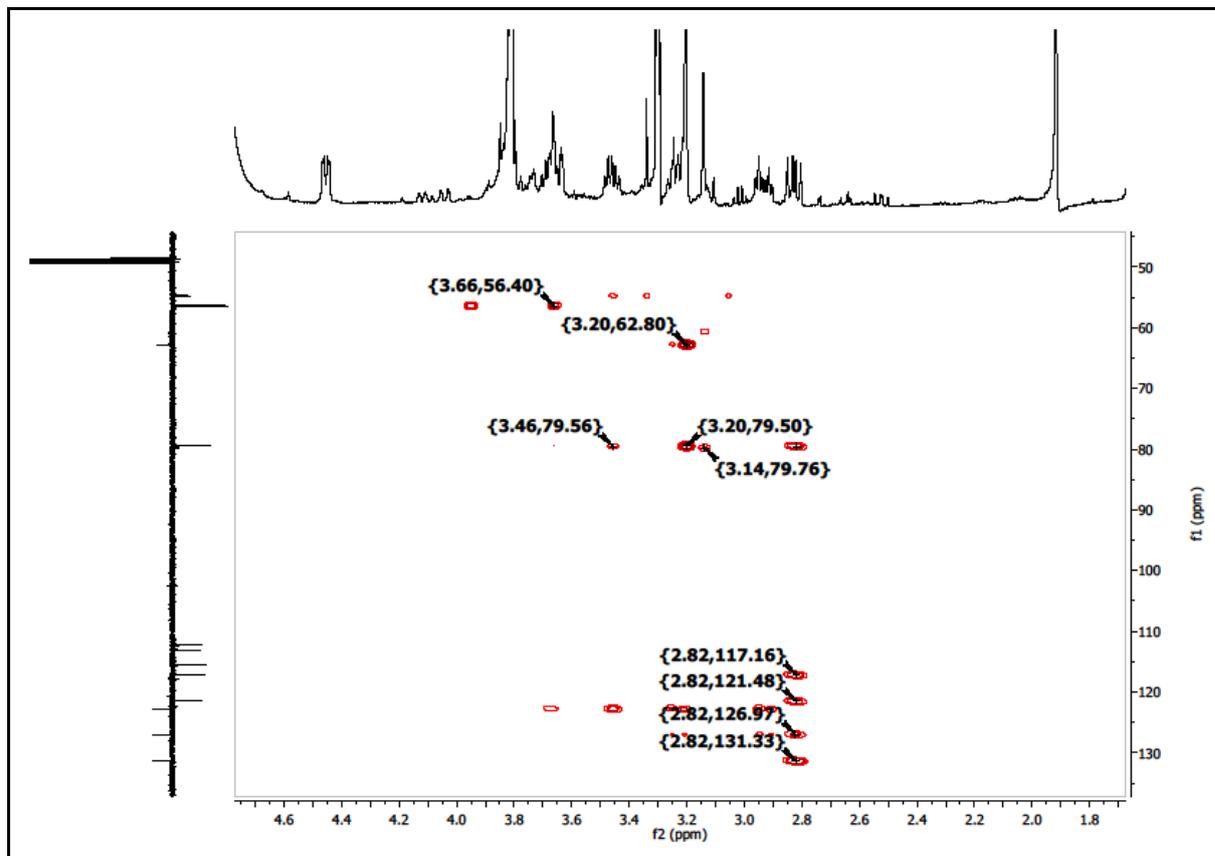


Figura 36 Expansão do espectro de HMBC de *Od-2* (CD₃OD, 500 e 125 MHz).

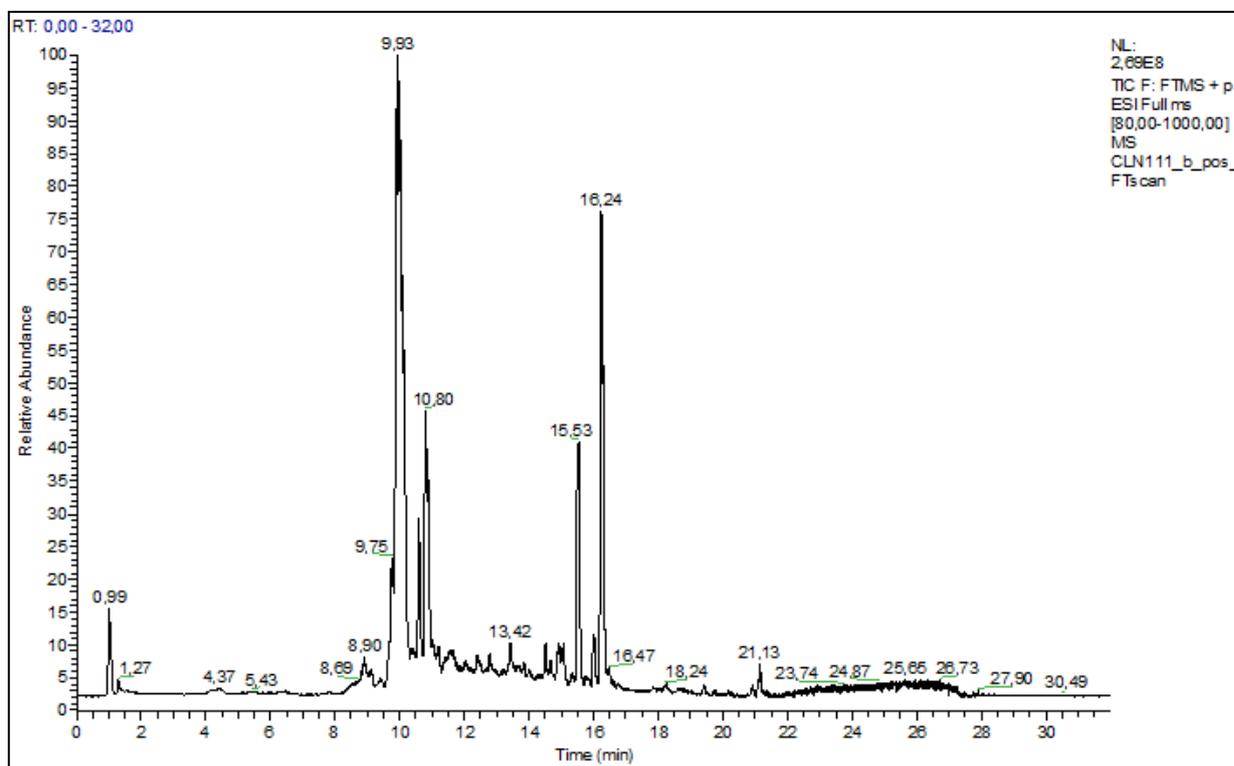


5.1.3 Análise da Fração de Alcaloides Totais (FAT) de *Ocotea duckei*

5.1.3.1 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS)

No cromatograma do LC-MS, observa-se a presença de pelo menos 20 picos, sendo dois picos majoritários: RT=9,93 min e RT= 16,24 min (Figura 39).

Figura 37 Cromatograma LC-MS obtido para a fração de alcaloides totais (FAT) de *Ocotea duckei*



5.1.3.1.1 Identificação da reticulina

O pico majoritário (RT=9,93 min) (32,5%), mostrou o íon molecular em $m/z = 330$ ($M+H$), compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{23}NO_4$. (Figura 40). Após a fragmentação foram gerados os fragmentos $m/z = 299$ ($M^+ -31$), $m/z = 267$ ($M^+ -15$), $m/z = 192$ ($M^+ -137$), $m/z = 175$ ($192-17$) (Figura 41), que são compatíveis com o

alcaloide reticulina,), alcaloide da classe dos benzilisoquinólicos, de acordo com dados da literatura (SAID et al., 2011).

A partir da fragmentação do pico do íon molecular (figura 40-41), foram observados os picos característicos, como o fragmento m/z 192 que se forma pela quebra induzida da porção do aminoácido tiramina da molécula, e perda de $[C_8H_9O_2]^+$, uma característica de benzilisoquinólico, além deste é possível observar os íons m/z 177 $[192-CH_3]^+$ (Figura 42) relativo à perda da metila (JEONG, et al., 2012).

Figura 38 Espectro de massas do composto TR = 9,93 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS)

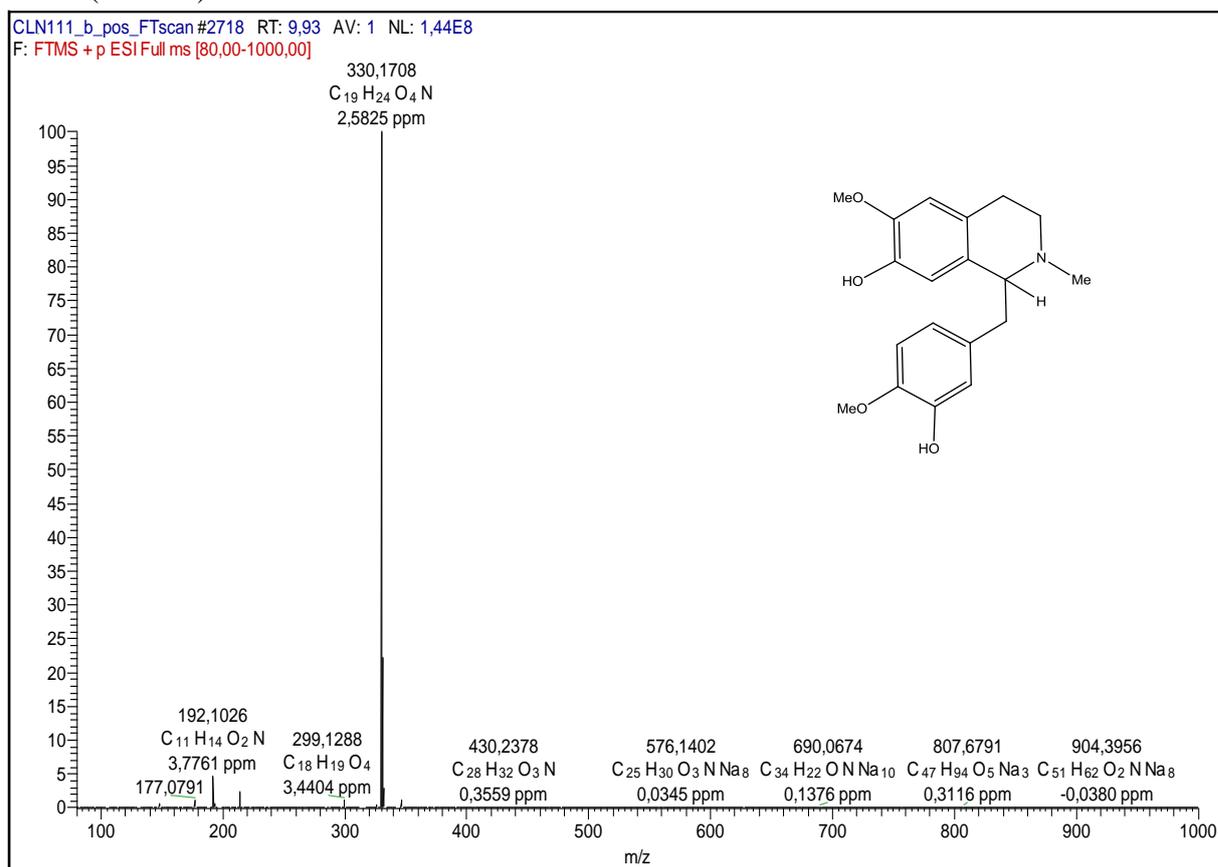


Figura 39 Espectro de massas do composto TR = 9,93 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS)

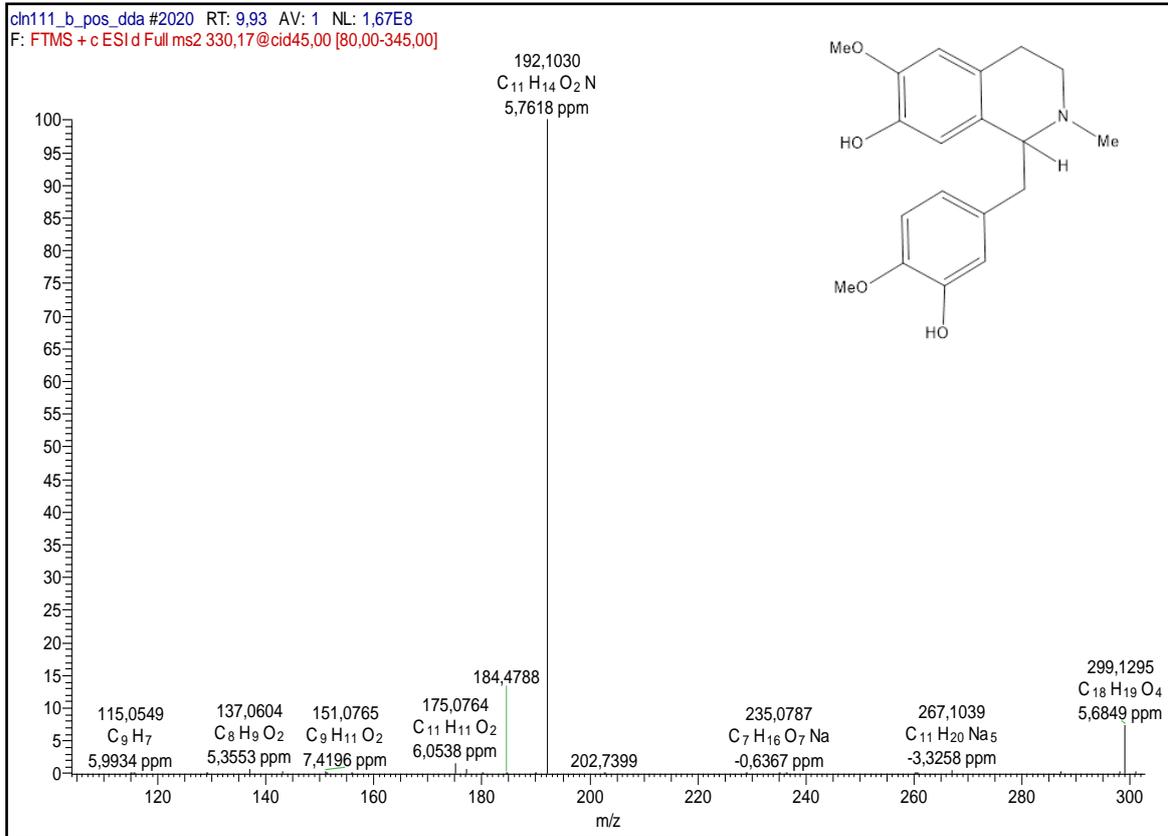
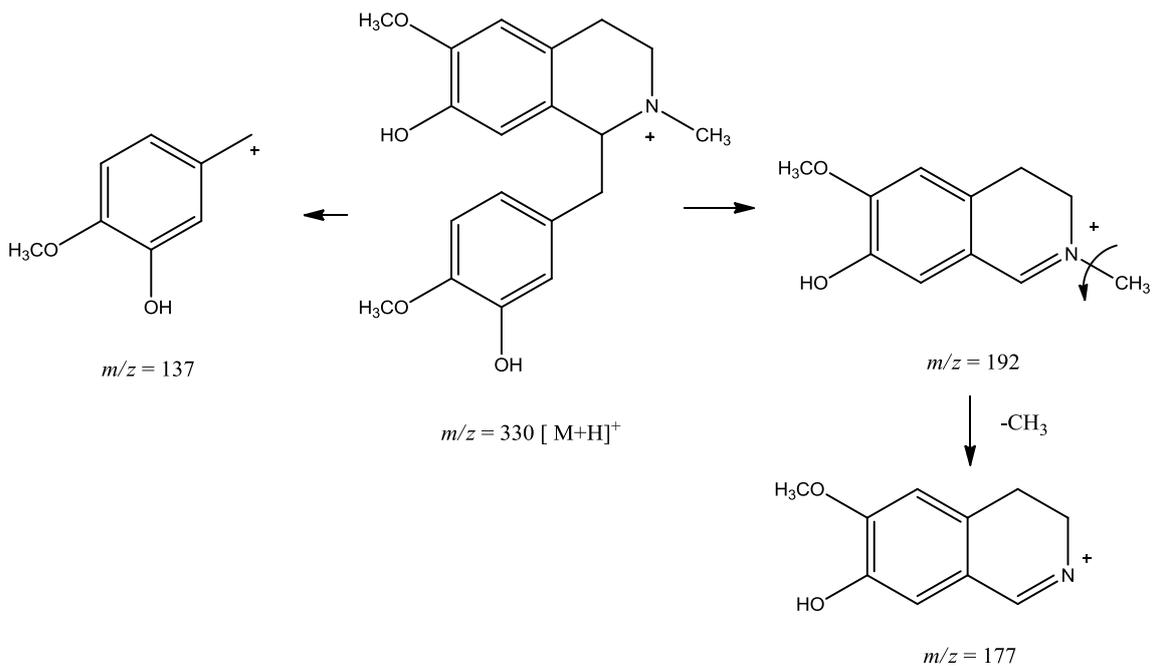


Figura 40 Proposta de fragmentação da reticulina (JEONG et al., 2012)



5.1.3.1.2 Identificação da coclaurina

O pico com tempo de retenção (RT= 10,81) (0,83%), mostrou o íon molecular em m/z 286 $[M+ H]^+$, compatível com a fórmula $C_{17}H_{19}O_3N$ (Figura 43). Após a fragmentação, foram observados fragmentos em m/z 269 $[M^+-NH_3, 100\%]$, 178 $[M^+-C_7H_7O]$, 107 $[M^+-C_{10}H_{12}ON]$ (Figura 44), compatíveis com o padrão de fragmentação da Coclaurina, estando condizente com dados da literatura (SCHMIDT et al., 2005). Os íons fragmentos m/z 178 $[M-C_7H_7O]^+$ e m/z 107 $[M-C_{10}H_{12}O_2]^+$, são fragmentos que se formam pela quebra induzida da porção do aminoácido tiramina, estes são produtos dos rearranjos comuns em alcaloides benzilisoquinolínicos (Figura 45) (JEONG et al., 2012).

Figura 41 Espectro de massas do composto TR = 10,81 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS)

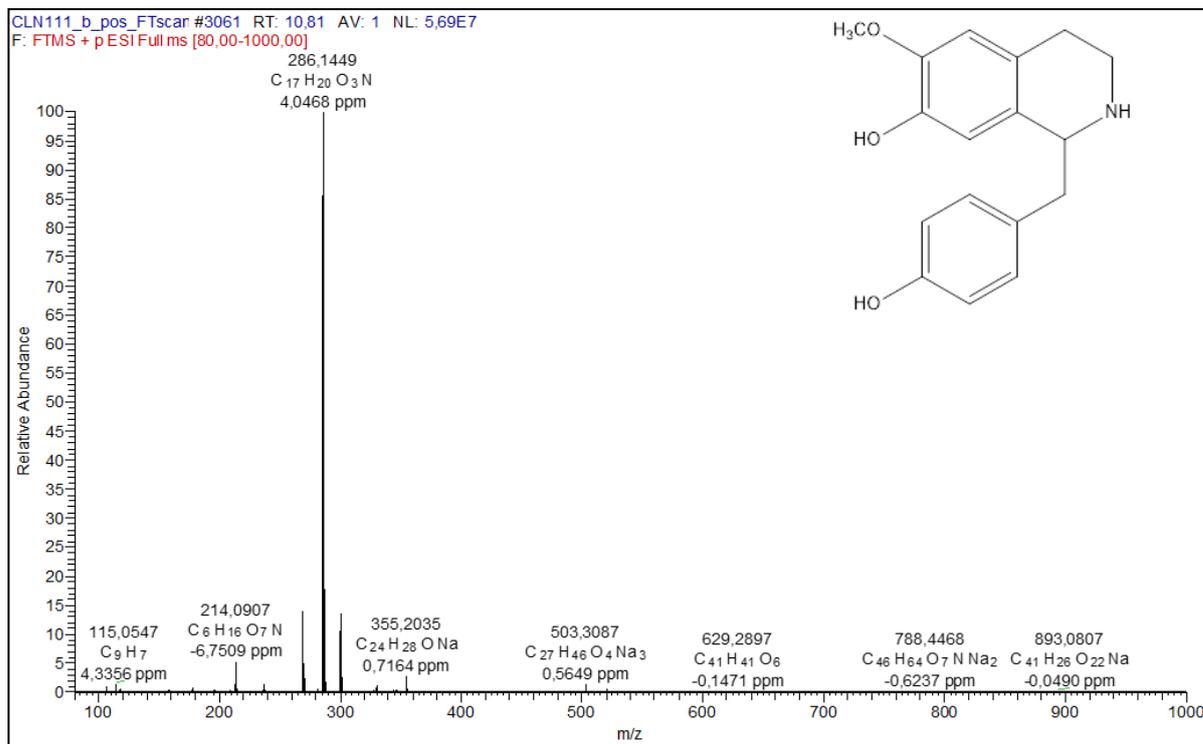


Figura 42 Espectro de massas do composto TR = 10,81 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS)

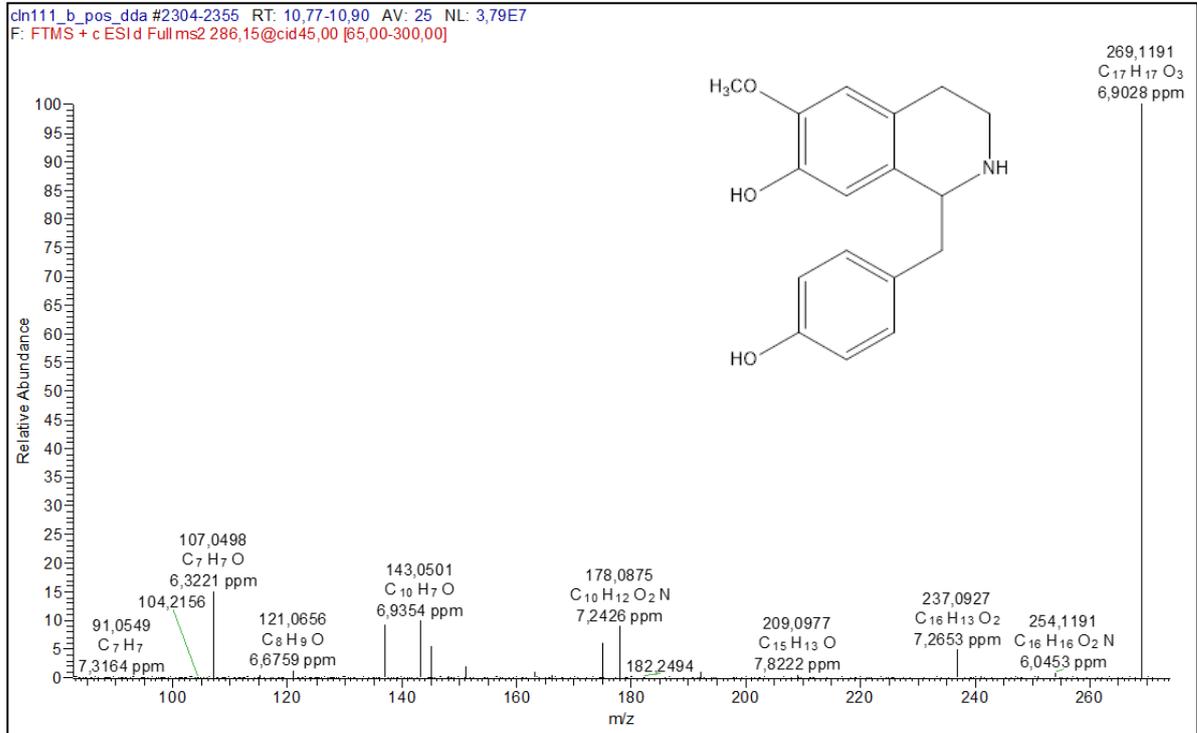
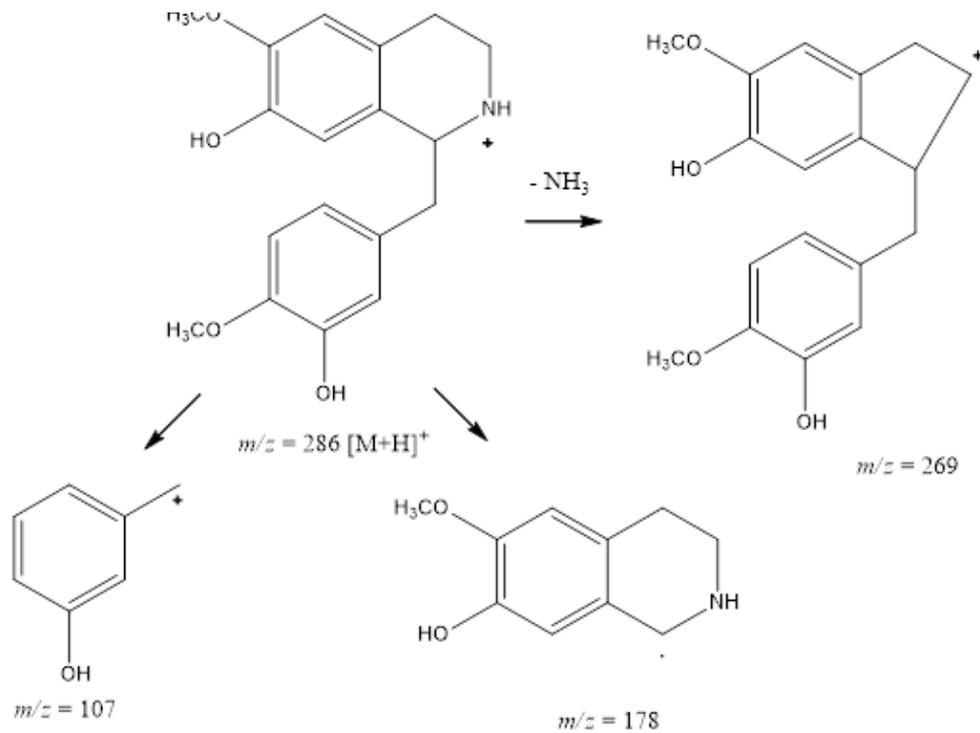


Figura 43 Proposta de fragmentação da coclaurina (JEONG et al., 2012; SCHMIDT et al., 2005).



5.1.3.1.3 Identificação da discretamina/scoulerina

Na análise da fração de alcaloides por LC-MS, também foi encontrado um pico com tempo de retenção (RT= 10,47) (3,10%), que mostrou o íon molecular $m/z = 328$ [M+H], compatível com a fórmula $C_{19}H_{21}O_4N$ (Figura 46) . Após a fragmentação foram observados e ions de fragmentações $m/z = 297$ (100%), $m/z = 178$ e $m/z = 151$ (Figura 47), estando condizente com dados da literatura para a discretamina (OHASHI et al., 1963). O fragmento em $m/z = 297$ resulta da perda metoxila, e $m/z = 178$ resulta de uma fragmentação do tipo retro-Diels-Alder, característica para alcaloides protoberberínicos (OHASHI et al., 1963). Os fragmentos obtidos da fragmentação do tipo retro-Diels-Alder da discretamina estão mostrados na Figura 48.

Figura 44 Espectros de massas do composto TR = 10,47 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS)

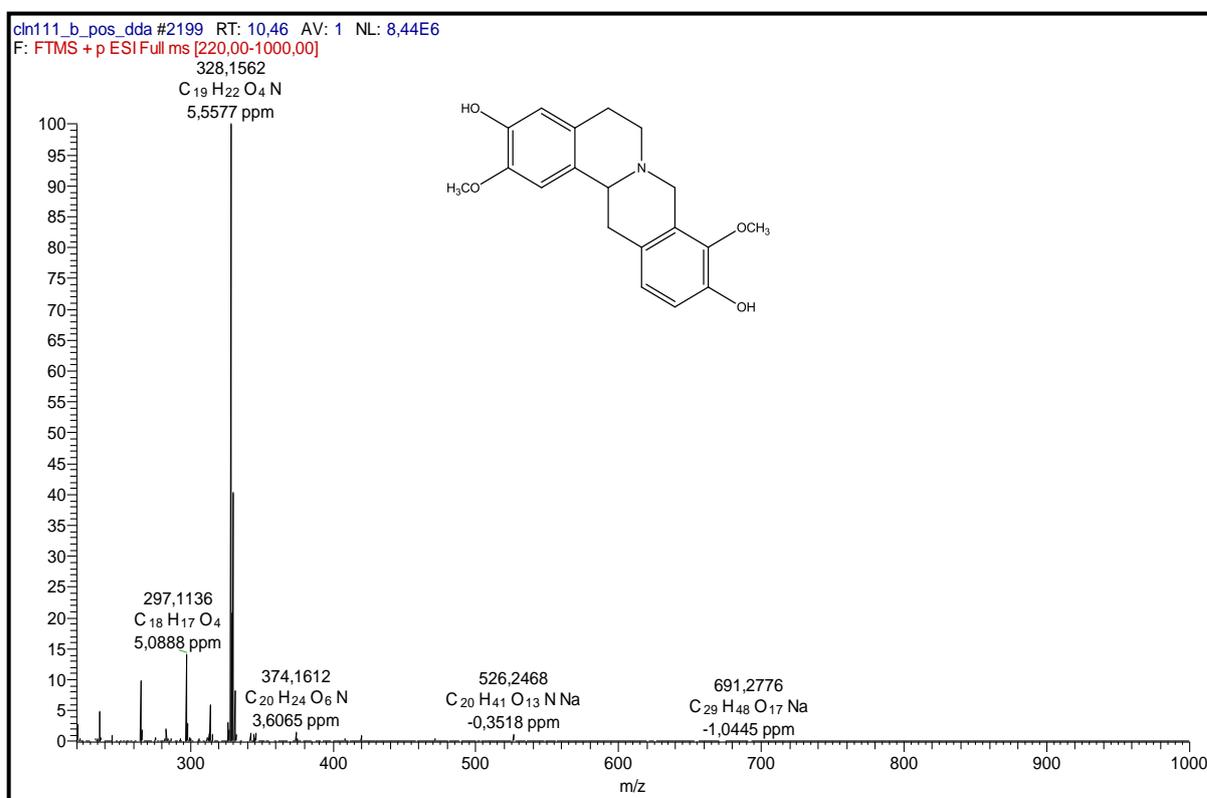
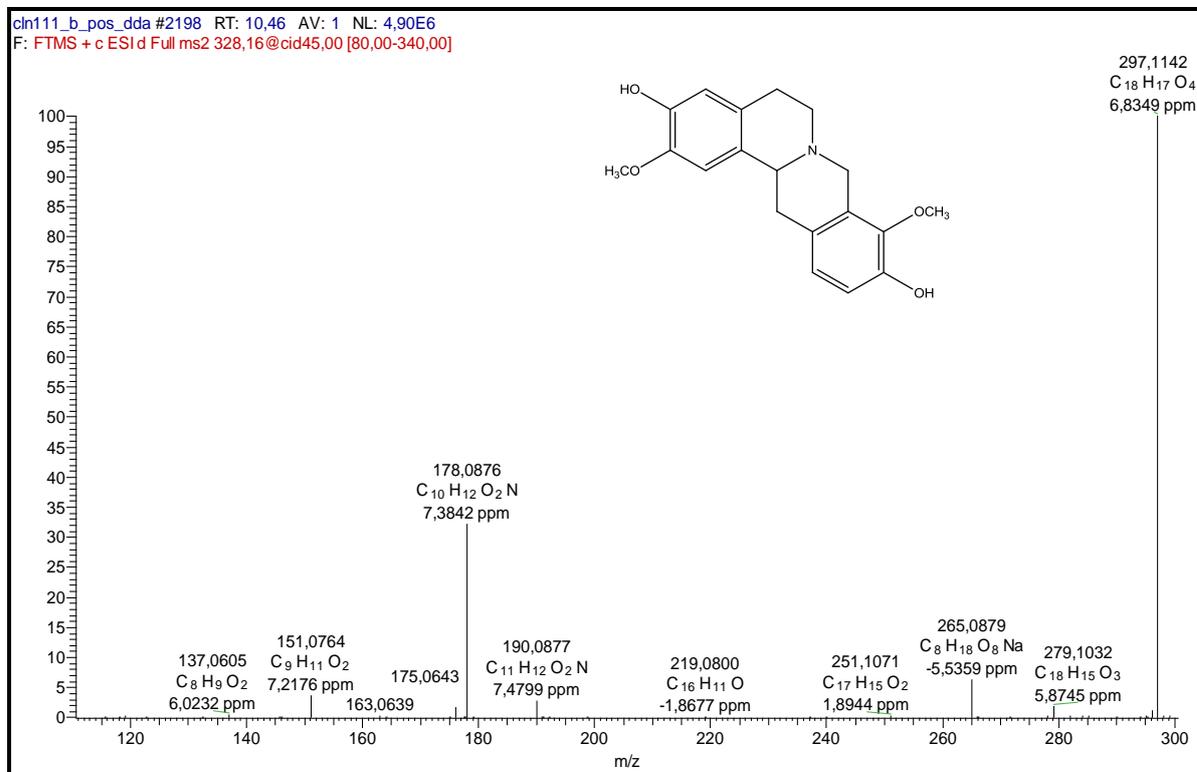
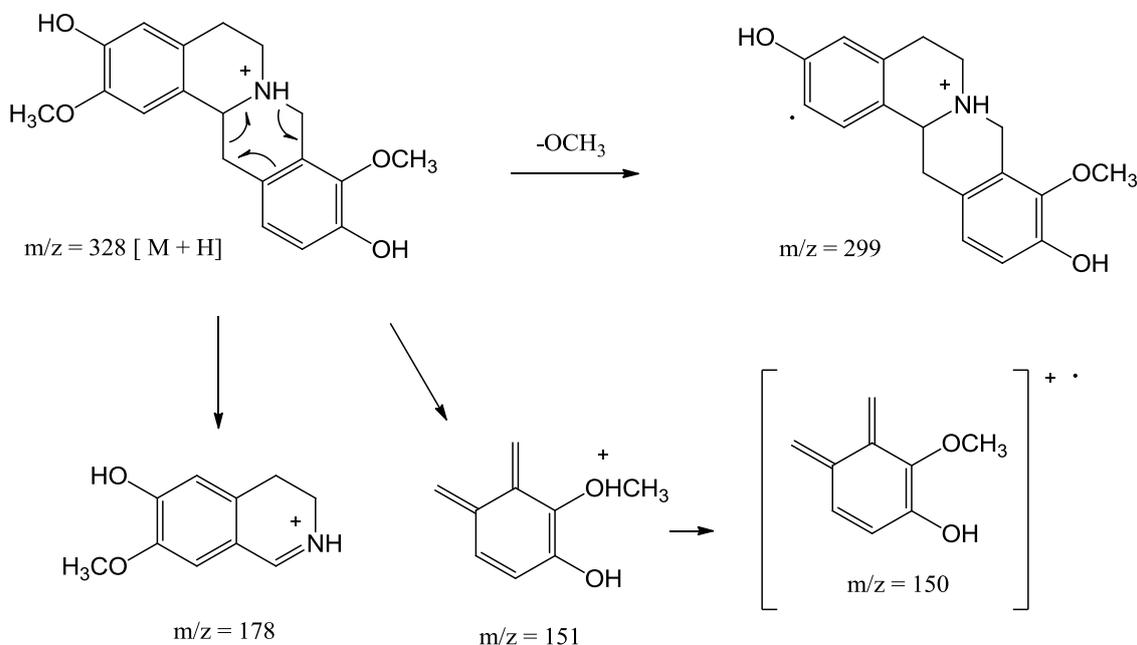


Figura 45 Espectro do composto TR = 10,47 min obtido da fração de alcaloides totais (LC-MS)



Há relato desse alcaloide para a família Lauraceae apenas em *Cryptocaria lancifolia* mas é comum em Annonaceae. Estudos apontam propriedade antinociceptiva para esse alcaloide (ALMEIDA et al., 2011). Ainda existem indicações de que a discretamina é um antagonista seletivo do α -adrenoreceptor e do receptor 5-HT no músculo liso vascular (KO et al., 1993).

Figura 46 Proposta de fragmentação do tipo Retro Diels Alder da discretamina (FERREIRA, 2016)



5.1.3.1.4 Identificação da Tetrahydrocolumbamina

O pico com RT = 11,40 min (0,11%), mostrou o íon molecular m/z 342 [M+H], compatível com a fórmula $C_{20}H_{24}O_4N$ (Figura 49). Após fragmentação foram observados fragmentos $m/z = 311$, $m/z = 296$, $m/z = 178$, $m/z = 163$, $m/z = 143$ e $m/z = 115$, s com dados da literatura para a tetrahydrocolumbamina (WANG et al., 2012) (Figura 50).

Os espectros de tetrahydrocolumbamina e scoulerina/discretamina são caracterizados pela presença fragmentos relativos à perda da metoxila e em m/z 178 formados pelo processo de RDA e clivagem do anel B. Outra característica da tetrahydrocolumbamina é a formação de um fragmento m/z 163, que se forma pela perda do radical metila a partir de m/z 178 (Figura 51).

Figura 47 Espectros de massas do composto TR = 11,40 min obtido da fração de alcaloides (LC-MS)

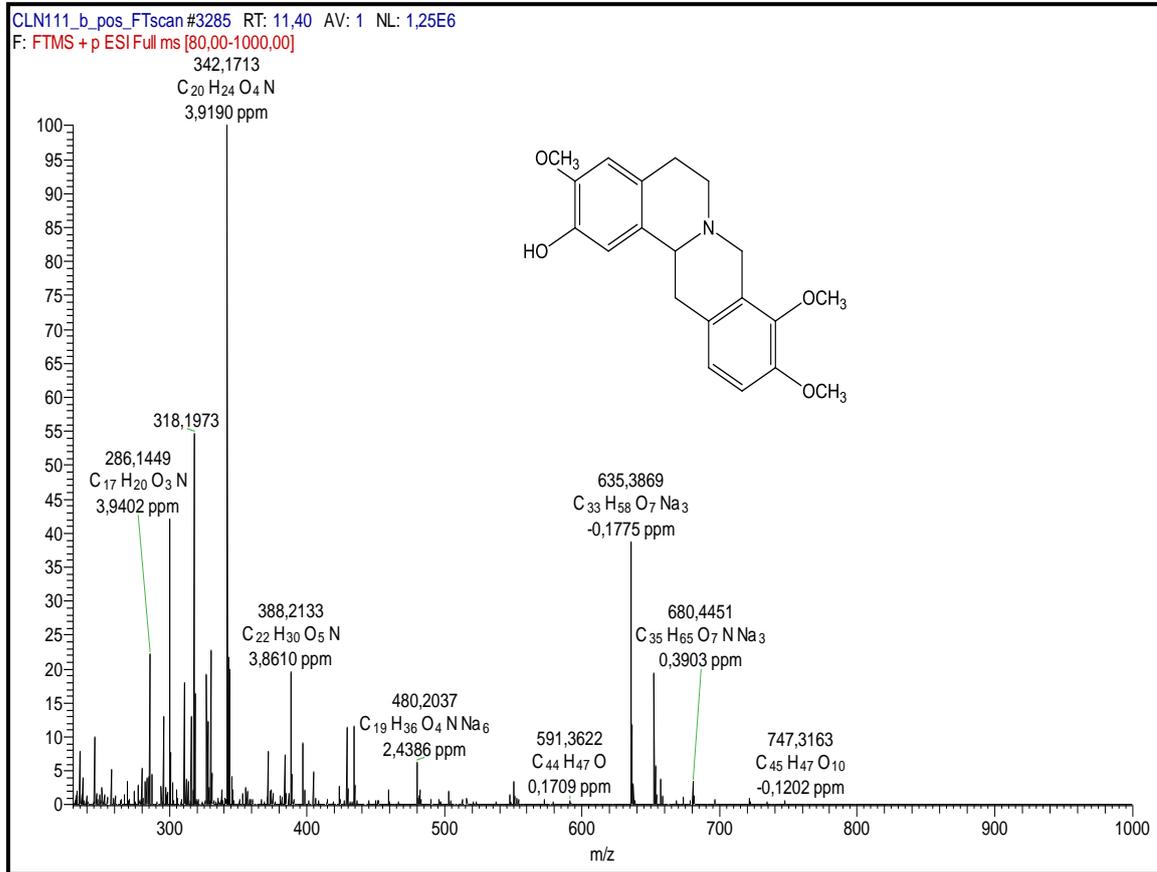


Figura 48 Espectro de fragmentação do composto TR = 11,40 min obtido da fração de alcaloides (LC-M)

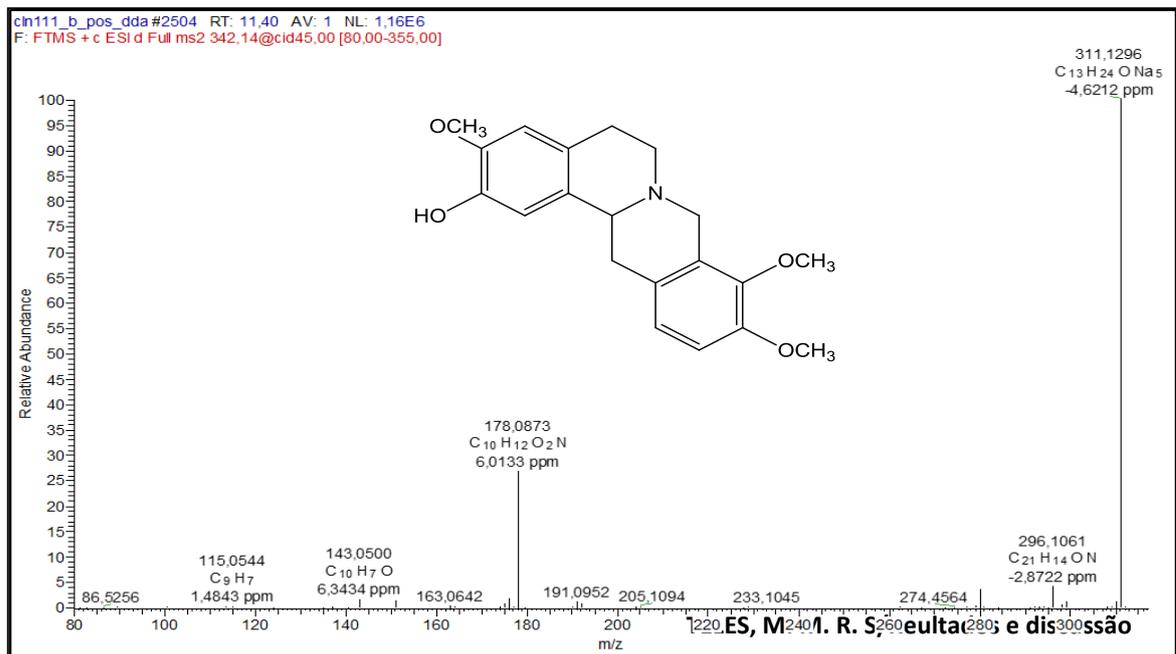
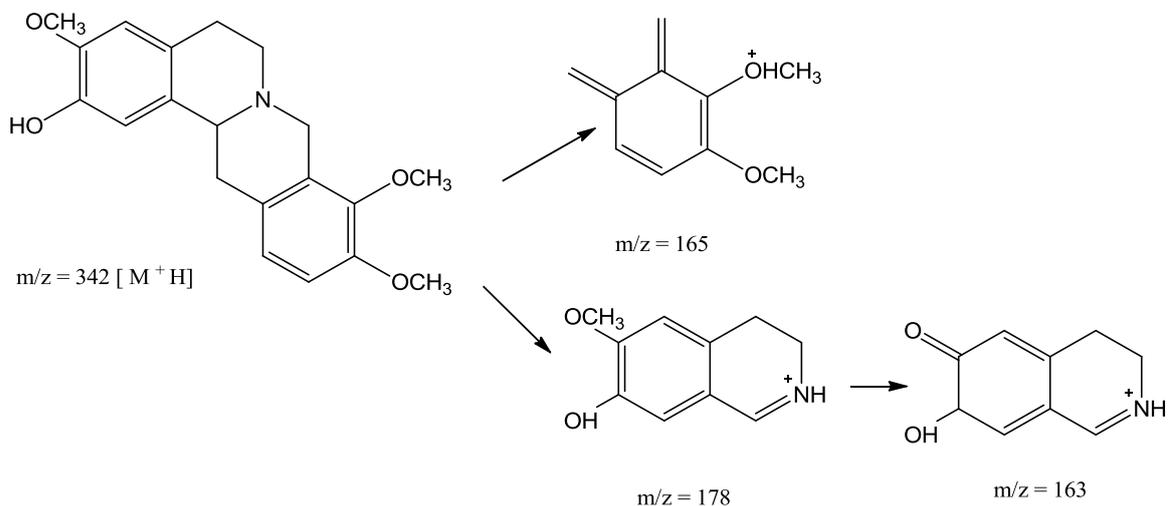


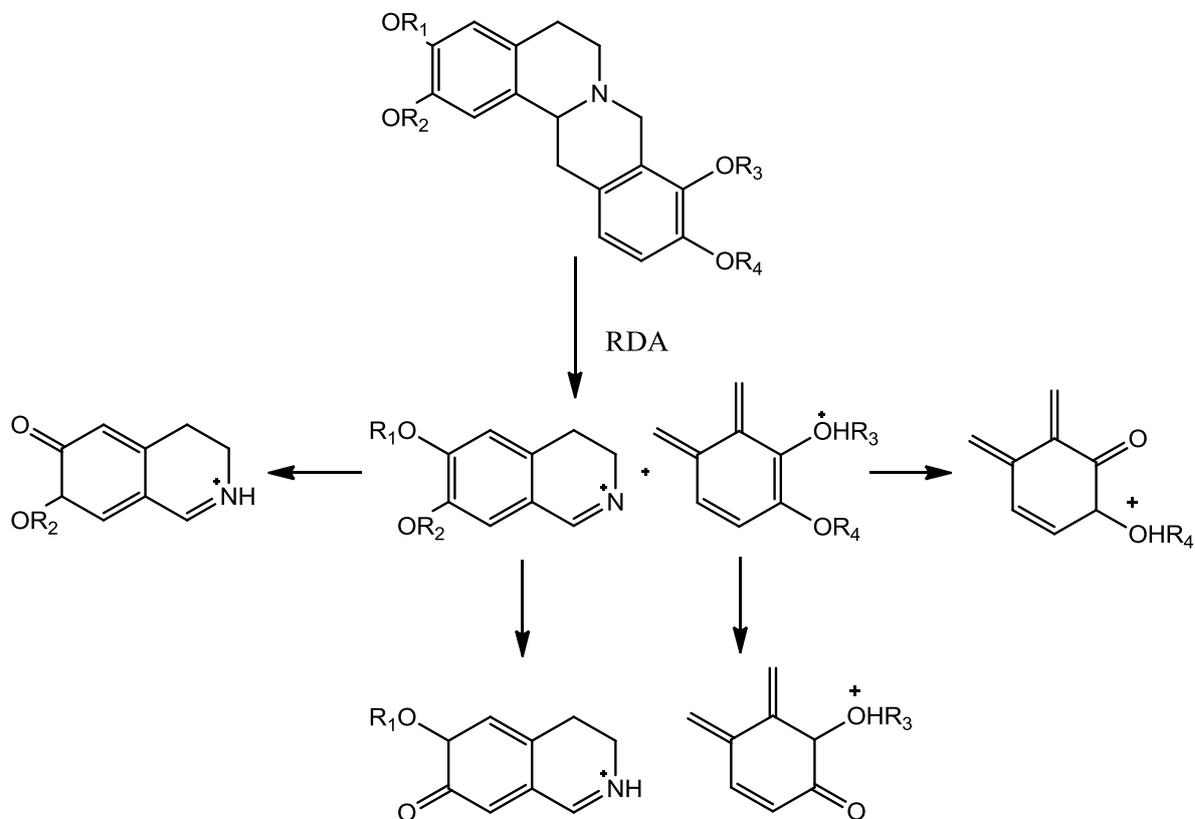
Figura 49 Proposta de fragmentos obtidos da fragmentação do tipo retro Diels Alder da tetrahidrocolumbamina



A reticulina é um composto precursor na biossíntese dos alcaloides de *Papaver* e dos tetrahydroprotoberberínicos como scoulerina/discretamina e tetrahidrocolumbamina (JOENG, 2012). Em *Saccharomyces cerevisiae* há estudos que evidenciam a formação desses alcaloides a partir da reticulina (HAWINKS; SMOLKE, 2008).

O mecanismo de fragmentação mostrado na Figura 52 é aplicado para a identificação dos alcaloides tetraprotoberberínicos (WANG et al., 2012)

Figura 50 Proposta do mecanismo de fragmentação para alcaloides tetrapoberberínicos



5.1.3.1.5 Identificação de N-óxido de reticulina

O espectro de massas do composto (RT= 10,59) (6,60%), apresentou o pico do íon molecular $m/z = 346$ [M+H], compatível com a fórmula molecular C₁₉H₂₃O₅N (Figura 53). Após fragmentação foram observados picos em $m/z = 329$, $m/z = 299$, $m/z = 192$, $m/z = 175$ e $m/z = 137$ (figura 46-47) (Figura 54), compatíveis com dados da literatura para a N-óxido de reticulina (SAID et al. 2011). O pico em $m/z = 329$ é resultado da perda da hidroxila, da porção N-óxido. O íon de fragmentação m/z 192 indica a presença de metoxila e hidroxila na estrutura, e o pico em $m/z = 137$ corrobora que após a perda da hidroxila o padrão de fragmentação apresentado é o da reticulina (Figura 55).

Figura 51 Espectro de massas da N-óxido de reticulina (LC-MS)

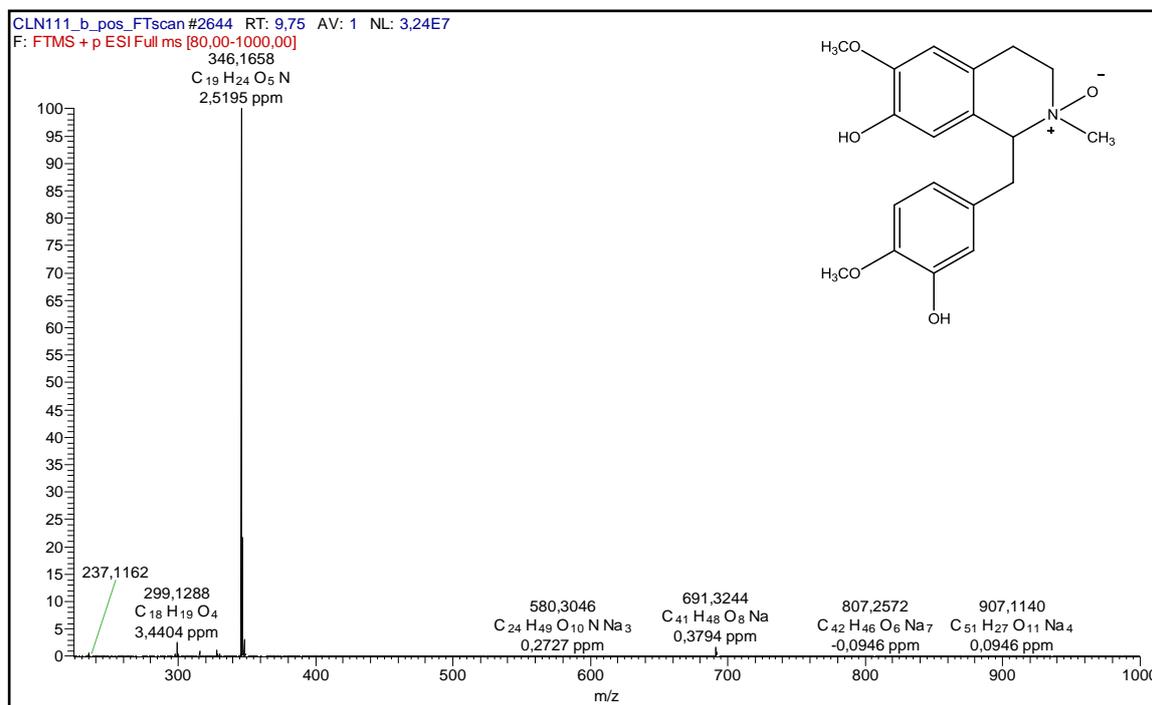


Figura 52 Espectro de massas da N-óxido de reticulina (LC-MS)

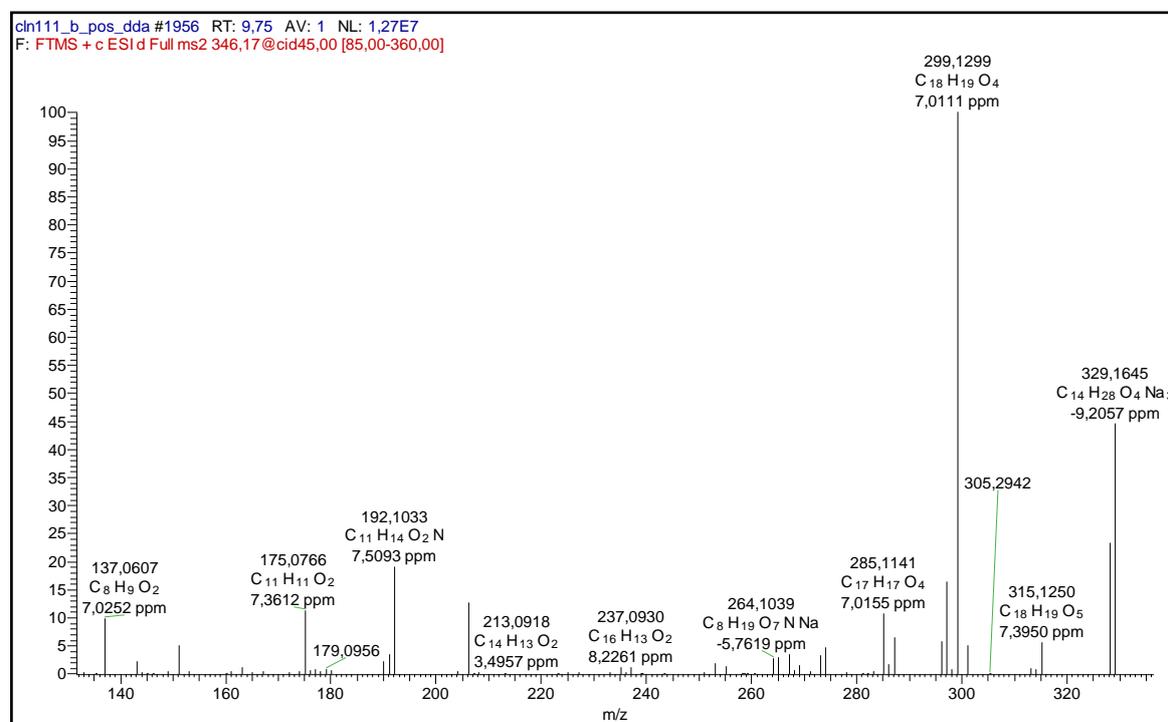
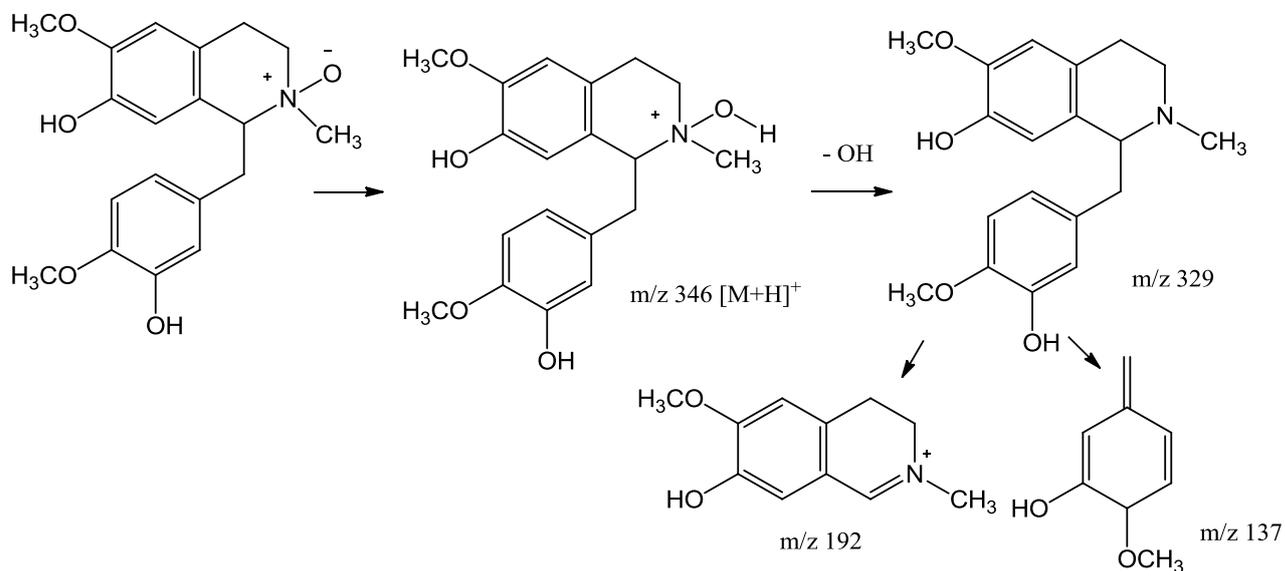


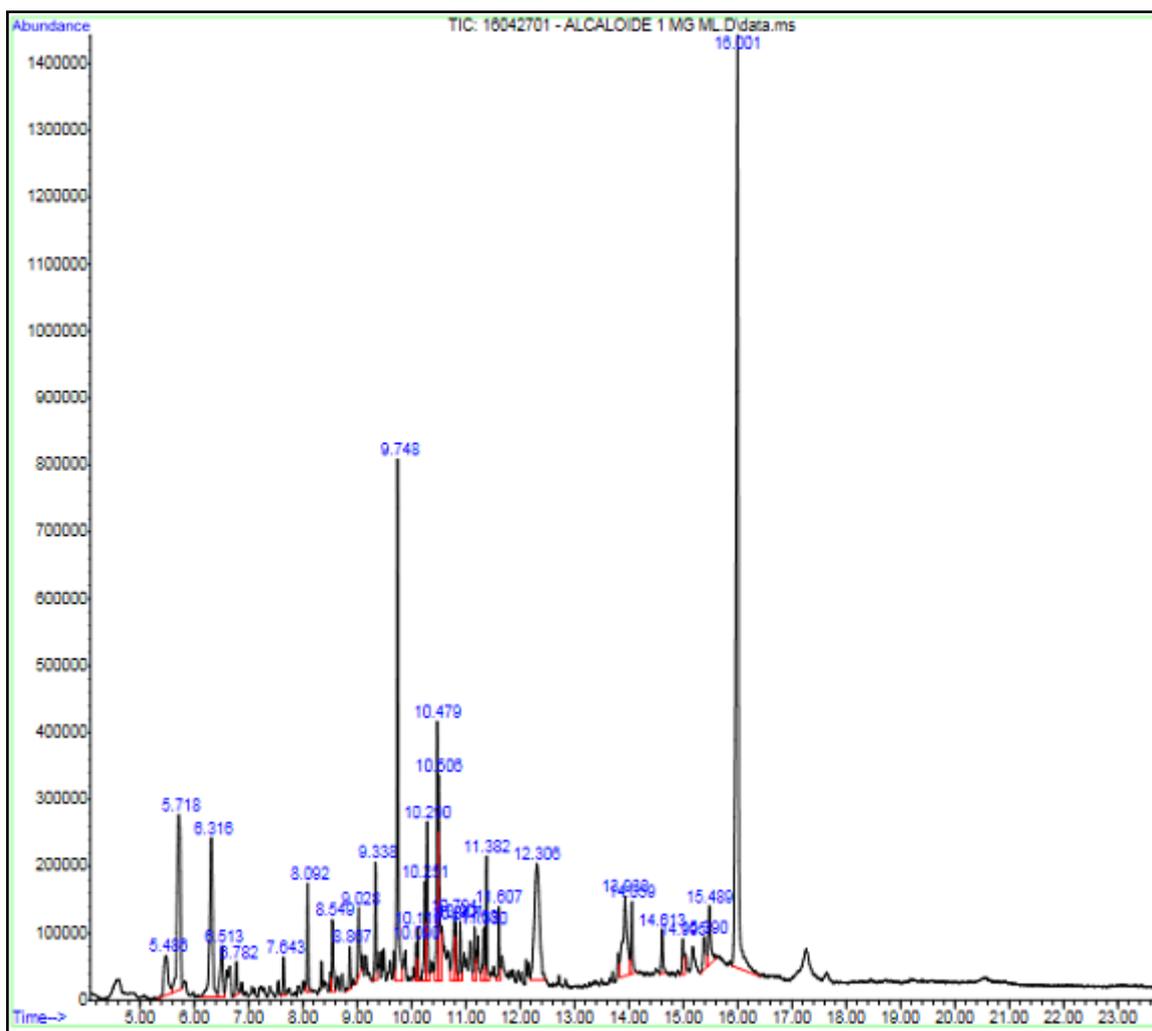
Figura 53 Proposta de fragmentação da N-óxido de reticulina



5.1.3.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS)

No cromatograma do CG-MS (Figura 56) observa-se a presença de pelo menos 30 picos, com um pico majoritário com tempo de retenção (RT=16,001 min).

Figura 54 Cromatograma CG-MS obtido para a fração de alcaloides totais de *Ocotea duckei*

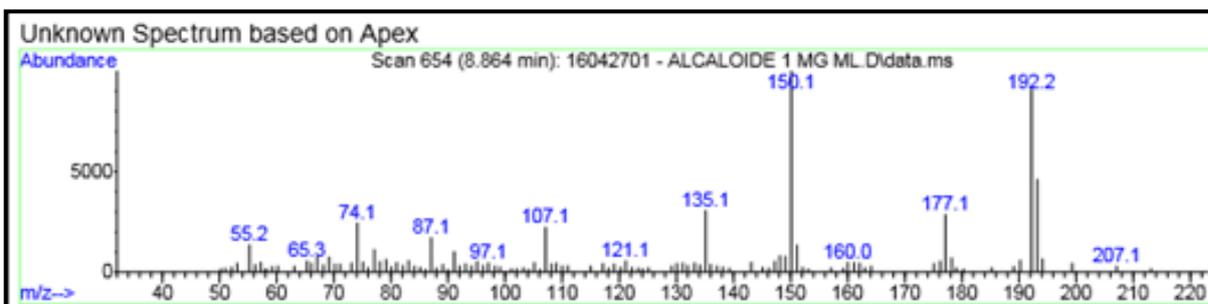


A análise do cromatograma (CG-MS) desse composto, quando comparado com a base de dados Wiley, foi compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{23}NO_4$, condizentes com a reticulina.

5.1.3.2.1 Identificação da metilreticulina

No cromatograma (Figura 57), observa-se um pico com tempo de retenção (RT= 8,864) com fragmentos, m/z 192, m/z 177 e m/z 150 (Figura 57). O cromatograma obtido é compatível com o padrão de fragmentação da Metilreticulina de fórmula molecular $C_{20}H_{25}NO_4$. (WADDELL; RAPOPORT, 1985) de acordo com a base de dados Wiley 25.

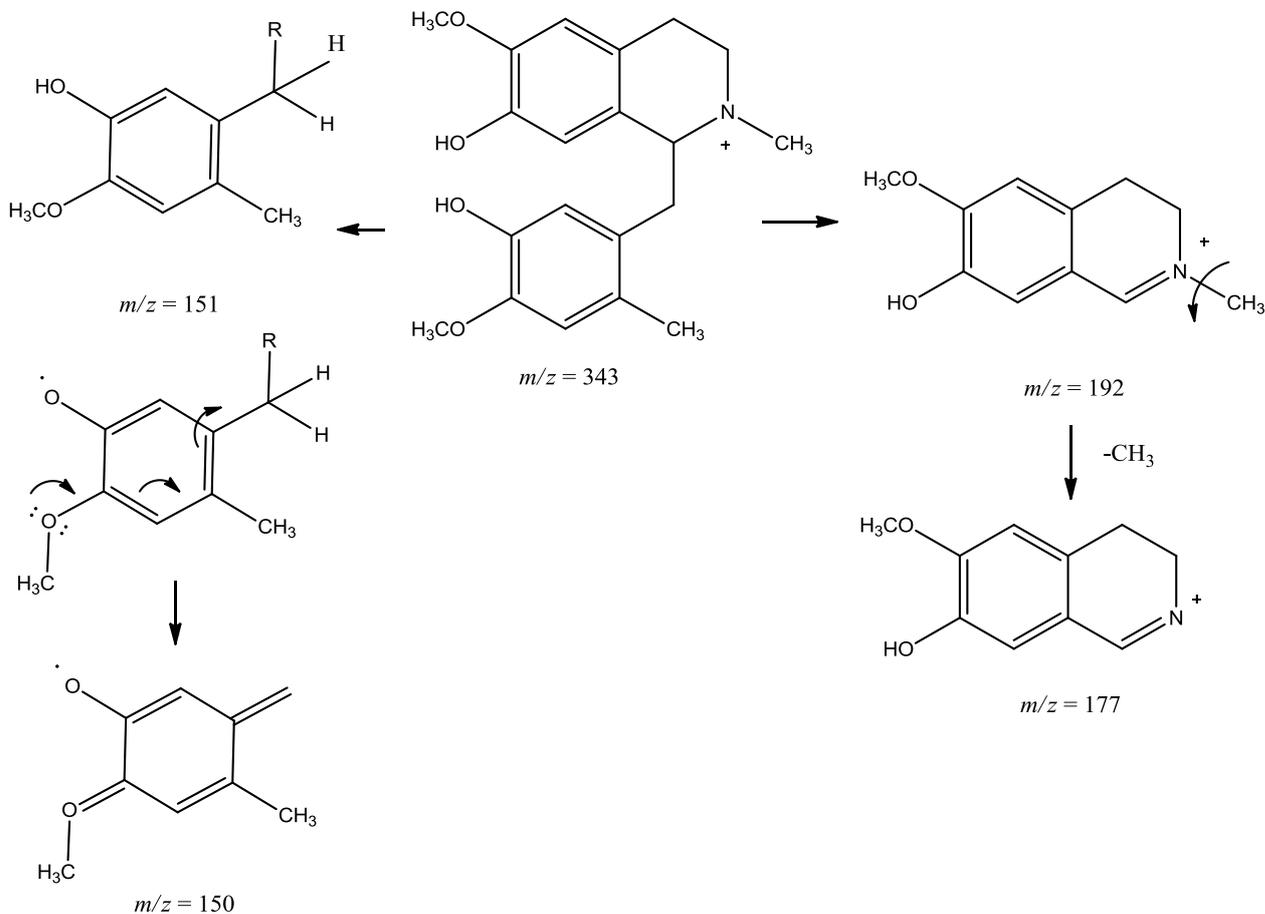
Figura 55 Espectro de massas da metilreticulina obtido da fração de alcaloides totais (CG-MS)



A fragmentação entre C - 1 e C - 9 no momento do impacto de elétrons determina três picos intensos, resultantes dessa cisão, m / z 192 ($C_{11}H_{14}NO_4$) ;151 ($C_9H_{11}O_2$) e um pico em 177 ($C_{10}H_{11}NO_2$). A formação de m/z 150 e não em 137, como ocorre na reticulina, sugere a presença da metila (Figura 58).

A metilreticulina é considerada como precursor biossintético da codeína, reticulina e morfina em estudos com C_{14} na *Papaver somniferum* (WADDELL; RAPOPORT, 1985).

Figura 56 Proposta de fragmentação da metilreticulina



5.1.3.2.2 Identificação da metilcoclaurina

No cromatograma (Figura 59), observa-se um pico com tempo de retenção ($\text{RT} = 14,995$). Observam-se fragmentos, m/z 192 $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_7\text{O}]^+$, m/z 107 $[\text{M}-\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}]^+$ e m/z 176 $[192-\text{CH}_4]^+$. O cromatograma obtido é compatível com o padrão de fragmentação da metilcoclaurina de fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{N}$ (BRUGINSKI, 2016), de acordo com a base de dados dados Wiley 25.

Figura 57 Espectro de massas do composto TR = 14,99 min obtido da fração de alcaloides totais (CG-MS)

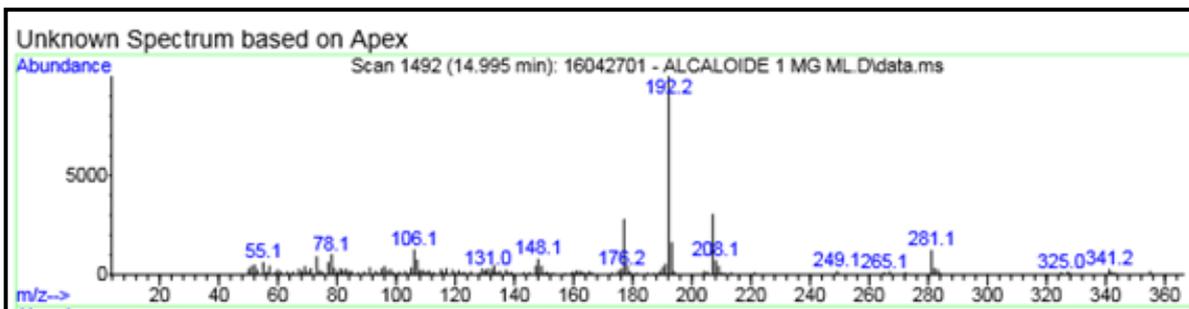
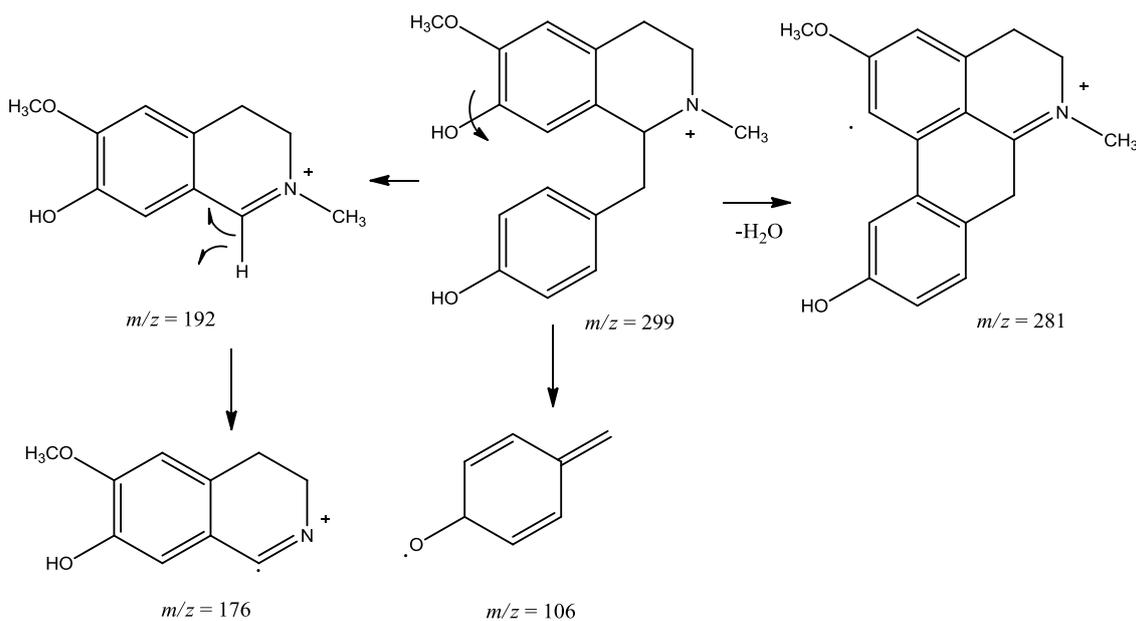
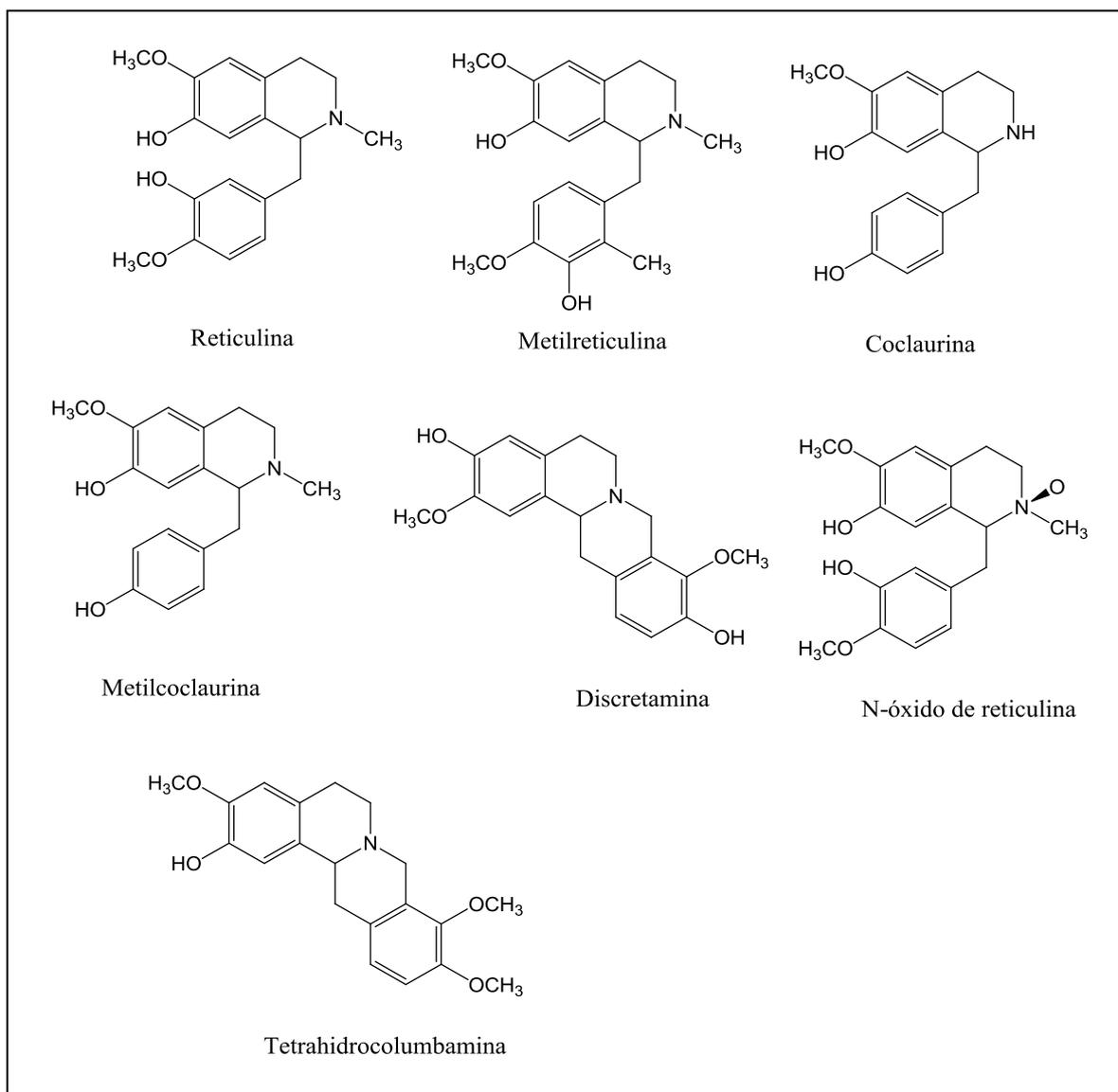


Figura 58 Proposta de fragmentação da metilcoclaurina (BRUGINSKI, 2016)



5.1.3.3 Estruturas dos alcaloides identificados na FAT *Ocotea duckei*

Quadro 8 Estrutura dos alcaloides identificados na FAT de *Ocotea duckei*



5.2 Estudo farmacológico

5.2.1 Atividade antimicrobiana

Os flavonoides isolados de *O. gardneri* (catequina, epicatequina e quercetina) e suas respectivas microdiluições foram testadas frente às cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria gram-negativa), *Staphylococcus aureus* (bactéria gram-positiva) e *Streptococcus mutans* (bactéria gram-positiva).

A clorexidina 0,12% foi empregada como controle positivo e o inoculo da solução DMSO com Tween 80 como controle negativo.

Ao avaliar as microdiluições das substâncias testadas, foi observado inibição de crescimento bacteriano da catequina, na concentração de 400 µg/mL frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* e da quercetina, na concentração de 83,5 µg/mL frente a cepa de *Staphylococcus aureus*. A epicatequina não apresentou atividade frente a nenhuma cepa testada (Tabela 14).

Tabela 14 Atividade antibacteriana de flavonoides isolados de *O. gardneri*

Composto	<i>P. aeruginosa</i> CIM (µg/mL)	<i>S. mutans</i> CIM (µg/mL)	<i>S. aureus</i> CIM (µg/mL)
Catequina	400	-	-
Epicatequina	-	-	-
Quercetina	-	-	83,5

(-): Substância não apresentou atividade. CIM foi definido como a mais baixa concentração que produziu 50% de redução do crescimento das células bacterianas após a incubação.

Estudos correlacionando a atividade antibacteriana com a estrutura molecular dos flavonóides em seu nível estrutural tem mostrado que estes compostos podem ser candidatos potenciais contra o crescimento bacteriano, como mostra o estudo realizado por Taguri et al. (2004). Alguns trabalhos mostram que a sua ação dá-se principalmente através de sua capacidade de interação com a membrana plasmática, inibindo sua

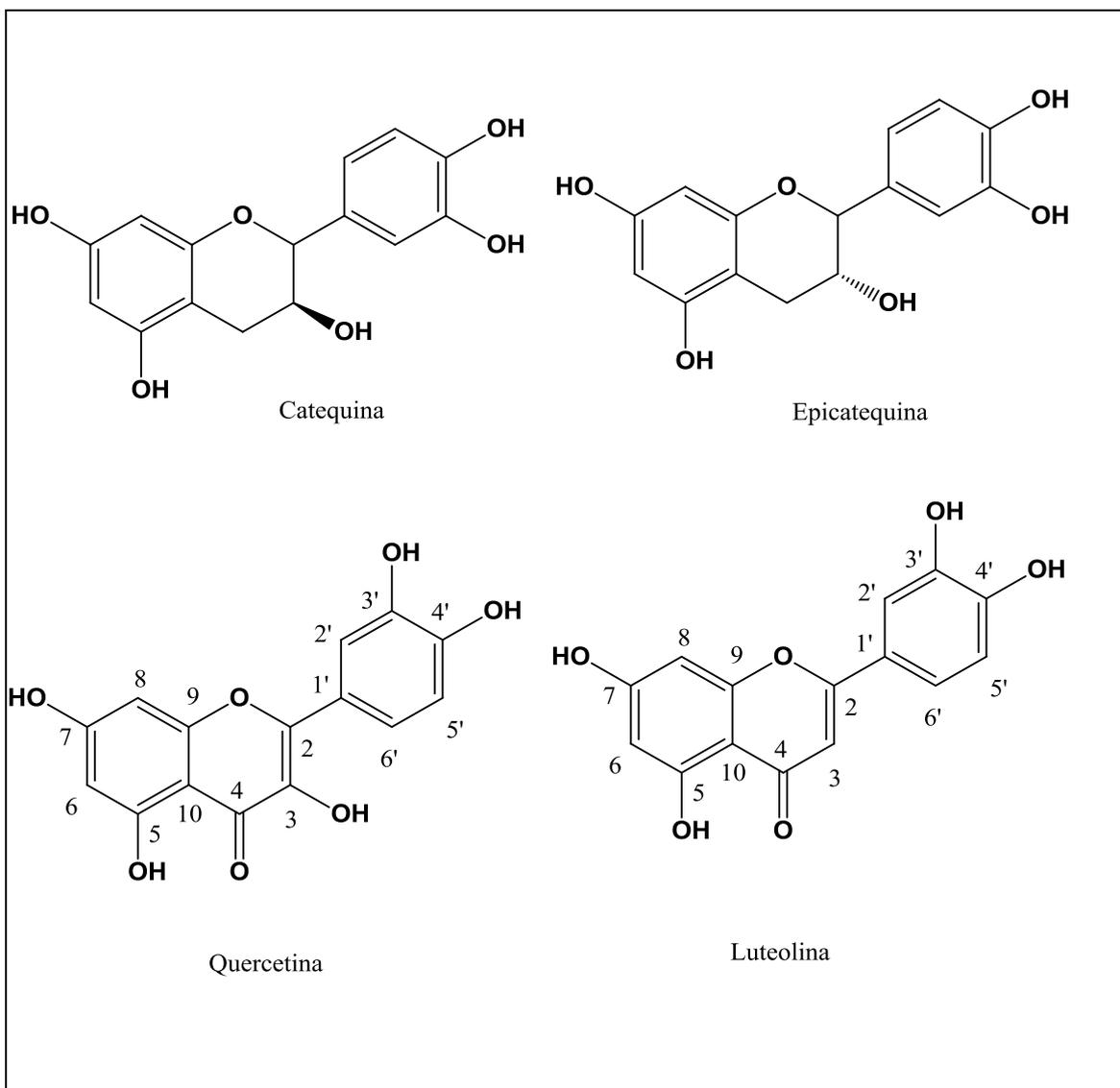
função, e conseqüentemente levando a destruição da integridade celular. Por outro lado, alguns flavonóides podem inibir a atividade de DNA girase, e outros podem inibir o metabolismo energético bacteriano (Cushnie & Lamb, 2006).

Estudos apontam que o flavonoide luteolina apresenta atividade antibacteriana frente a *S.aureus*, através da inibição da DNA topoisomerase I e II, podendo resultar em diminuição de síntese de proteínas e ácidos nucléicos (WANG; XIE, 2010). A luteolina apresenta estrutura semelhante à quercetina com o Carbono 3 não hidroxilado (Quadro 9).

Sartori (2005), avaliou a atividade da luteolina frente a cepa de *P. aeruginosa*, onde esta substância, por sua vez, não apresentou efeito inibitório ao crescimento, assim como a quercetina. Enquanto no nosso estudo, o flavonoide catequina demonstrou efeito de CIM 400 µg /mL e a epicatequina, seu epímero no carbono 3 não apresentou atividade. Este fato pode ser explicado pelas diferenças químicas existentes nos grupos substituintes, que afetam diretamente o mecanismo de ação.

Não foi verificado a inibição de crescimento da cepa *S.mutans* por nenhuma das substâncias testadas. Este fato se deu pela incapacidade das substâncias testadas em atuar em alvos de ação, como por exemplo: inibição da síntese de proteínas, inibição da síntese de parede celular, inibição da replicação do DNA e transcrição para o RNA, entre outras (SANTOS, 2014).

Quadro 9 Estrutura dos flavonoides testados para atividade antimicrobiana e utilizados na comparação dos dados



5.2.2 Atividade antileishmania

O teste do MTT foi utilizado na avaliação da viabilidade celular. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

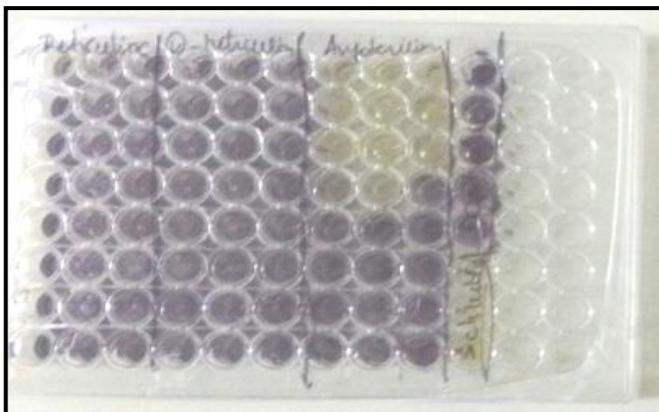
Nos poços que continham as substâncias testadas observou-se a formação de coloração azul, indicando a preservação das leishmanias. Nos poços que continham a anfotericina B, usada como controle positivo, não houve mudança de coloração, permanecendo na coloração amarela (Figura 61).

Na literatura há relatos que os alcaloides benzilisoquinolínicos detém várias atividades farmacológicas, dentre elas atividade antileishmania. Os alcaloides coclaurina e N-metilcoclaurina apresentaram atividade contra formas promastigotas de *L. amazonenses* (FOURNET, 2007) bem como a O-metilpamepavina (VILA-NOVA et al., 2011) (Quadro 10).

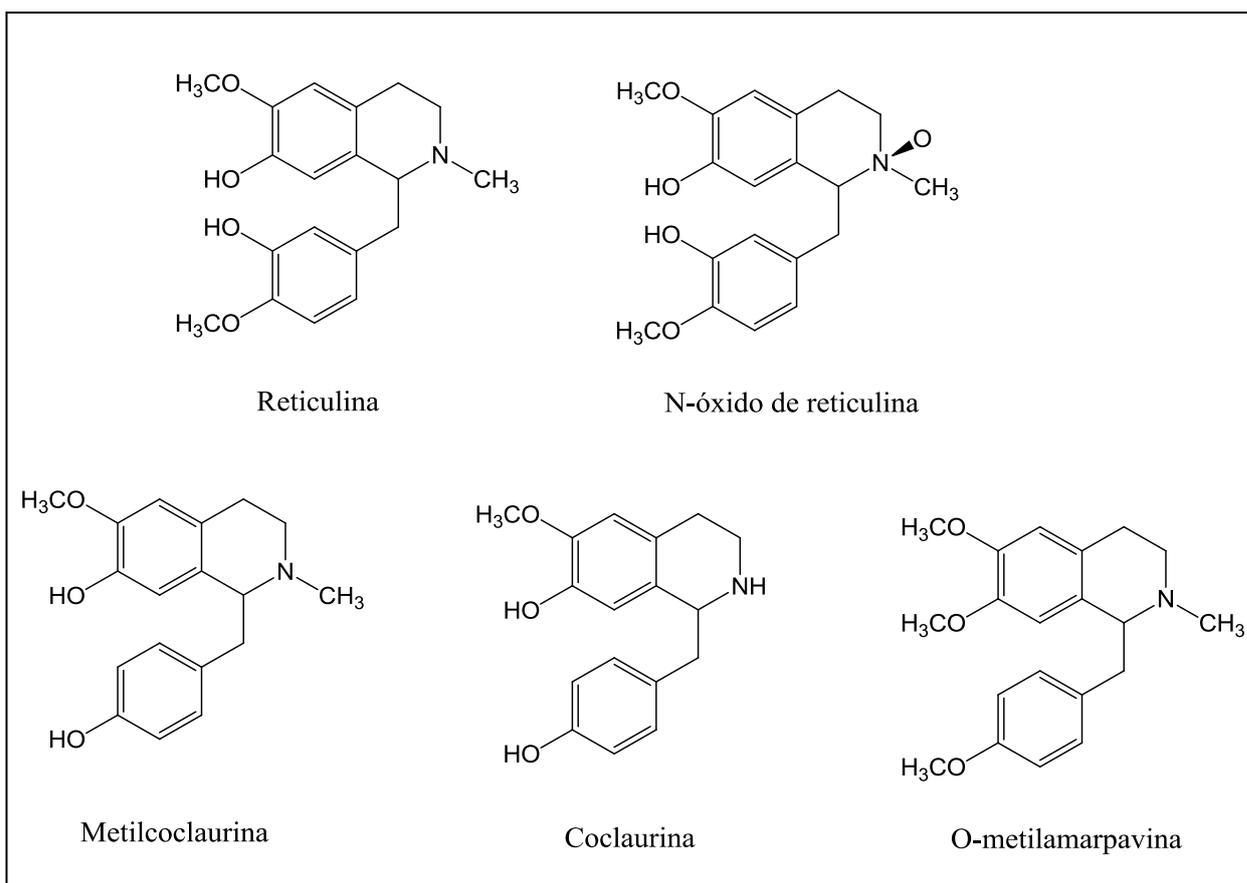
No entanto, a avaliação dos alcaloides reticulina e N-óxido de reticulina realizados no presente estudo, mostrou que estes compostos não apresentaram atividade contra essas formas de Leishmania.

Sabe-se que uma pequena mudança em uma estrutura química é passível de modificar determinada atividade biológica exercida por uma molécula. Nas estruturas abaixo, apesar de serem observados o mesmo núcleo alcaloídico, pode ser observado que a reticulina e a N-óxido de reticulina apresentam dois grupos substituintes no núcleo C, diferentemente das outras que apresentaram esta atividade relatada na literatura, podendo ser o fator determinante para a ausência de atividade. Desta forma estes resultados implicam na necessidade de estudos de relação estrutura atividade.

Figura 59 Imagem da placa de análise da atividade antileishmania das substâncias



Quadro 10 Estrutura dos alcaloides belzilisquinolínicos testados para atividade antileishmania e utilizados na comparação dos dados





CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Ocotea gardneri* resultou no isolamento e identificação estrutural de seis substâncias, desconhecidas para a espécie. Da fase clorofórmica foram isoladas três substâncias, o triterpeno 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexeno (esqualeno), o 3,4,5 Trimetóxi-benzaldeído e o Sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosídeo. Da fase acetato de etila foi isolada a flavona 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona (quercetina) e dois flavonóis 2- (3,4-di-hidroxifenil) -4H-cromeno-3,5,7-triol (epicatequina) e 2- (3,4-di-hidroxifenil) -4H-cromeno-3,5,7-triol (epicatequina).

O estudo continuado da fase de alcaloides totais das folhas de *Ocotea duckei*, permitiu o isolamento de reticulina e N-óxido de reticulina.

A aplicação da fase de alcaloides totais na LC-MS resultou na identificação dos alcaloides discretamina, tetrahydrocolumbamina, metilreticulina, coclaurina, reticulina e N-óxido de reticulina. Este caracteriza o primeiro relato da N-óxido de reticulina para o gênero *Ocotea*. A análise por CG-MS permitiu a identificação dos alcaloides metilreticulina e metilcoclaurina. Esses dados abrem uma perspectiva de um trabalho sistemático por essa abordagem para análise de alcalóides de *Ocotea* por essa técnica.

Na avaliação da atividade antimicrobiana, a quercetina apresentou uma CIM de 83,5 µg/mL frente à *S. aureus* e a catequina uma CIM de 400 µg/mL frente à *P. aeruginosa*.

A reticulina e o N-óxido de reticulina não apresentaram atividade frente à *Leishmania amazonensis*.



REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

AHMED, W.; AHMAD, Z.; MALIK, A. Stigmasteryl Galactoside from *Rhynchosia-Minima*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 4038-4039, 1992.

ALMEIDA, J.R.; LIMA, J.T.; OLIVEIRA, H.R.; OLIVEIRA, M.R.; MEIRA, P.R.; LÚCIO, A.S.; BARBOSA FILHO, J.M.; QUINTANS JÚNIOR, L.J. Antinociceptive activity of discretamine isolated from *Duguetia moricandiana*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 20, p. 1908-1915, 2011.

AQUINO, R.; DESIMONE, F.; PIZZA, C.; CERRI, R.; DEMELLO, J. F. Quinovic Acid Glycosides from Guettarda-Platyoda. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2927-2930, 1988.

ARAÚJO, I. A. **Belilschmidia Nees (Lauraceae) do Estado do Rio de Janeiro**. 1994, 59f. Dissertação- Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1994.

ASIF, M.; KHODADADI, E. Medicinal uses and chemistry of flavonoid contents of some common edible tropical plants. **Journal of Paramedical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 119-138, 2013.

BARBOSA-FILHO, J. M.; VARGAS, M. R. W.; SILVA, I. G.; FRANÇA, I. S.; MORAIS, L. C. S. L.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; CHAVES, M. C. O.; ALMEIDA, R. N.; AGRA, M. F. *Ocotea duckei*: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **Anais da Academia Brasileira de ciências**, v.71, p.231-238, 1999.

BARBOSA-FILHO, J. M. Lignanas, meolignanas e seus análogos. In Simões, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Da UFRGS/Ed. Da UFSC, p. 11-24, 2007.

BARREIRO, E.J.; SILVA-BOLZANI, V. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de farmacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARRERA, E. D. C.; SUAREZ, L. E. C. Aporphine alkaloids from leaves of *Ocotea macrophylla* (Kunth) (Lauraceae) from Colombia. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 522-524, 2009.

BARRETO, R. C. O gênero *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) no estado de Pernambuco. In: XXVI Congresso nacional de botânica. Brasília, Brasil. **Sociedade Brasileira de Botânica**, 1, p. 175-199, 1990.

BOTEGA, C.; PAGLIOSA, F.M.; BOLZANI, V.S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Benzylisoquinoline Alkaloids And Eudesmane Sesquiterpenes From '*Ocotea pulchella*'. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1331-1333, 1993.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbono-13 NMR Spectroscopy: High Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry**. 3th ed. Weinheim, New York: VHC, 1990.

BRUGINSKI, E. R. D. Identificação de alcaloides e acetogeninas diretamente em tecidos de folhas e sementes de *Annona rugulosa* (Annonaceae) por DESI MSI, 88f. Dissertação (mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde-. Universidade Federal do Paraná. 2015.

CALLEJON, D. R. et al. Leishmanicidal evaluation of tetrahydroprotoberberine and spirocyclic erythrina-alkaloids. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5692-703, 2014.

CASTRO, O.; RUIZ, I. Aporphine alkaloids and flavonoids from *Ocotea holdridgeana* leaves. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 32, p. 406-408, 1994.

CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; ARAUJO, C. V.; MOREIRA, S.; BOZZA, P. T.; THOMAS, G.; BARBOSA, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; TIBIRICA, E. V. Yangambin - a new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: *in vivo* pharmacological studies. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 106-112, 1995a

CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T.; CRUZ, H. N.; SILVA, C. L. M.; VIOLANTE, F. A.; BARBOSA, J. M.; THOMAS, G.; MARTINS, M. A.; TIBIRICA, E. V.; NOEL, F.; CORDEIRO, R. S. B. Yangambin: a new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: binding and *in vitro* functional studies. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 101-105, 1995b.

CAVA, M. P.; RAO, K. V. ; DOUGLAS, B. and J. A. Weisbach, **J. Org. Chem**, 33, 2443-2446, 1968.

CAVA, M.P.; BEHFOROZ, M.; MITCHELL, M.J. *Ocotea* alkaloids Variabiline, a novel aminoaporphine. **Tetrahedron Lett**, v. 13, p. 4647-4649, 1972.

CAVA, M.P.; VENKATESWARLU, A. Dehydroocopodine, dicentrinone, and other alkaloids from *Ocotea macropoda* and *Hernandiaja maicensis*. **Tetrahedron**, v. 27, p. 2639-2643, 1971.

CAVÉ, A. Annonacea alkaloids. In: PHILIPSO, J. D.; ROBERTS, M. F.; ZENK, M. H. The chemistry and biologic of isoquinoline alkaloids. Berlin, New York: Springer-Verlag, p. 79-101, 1985.

CHARISIADIS, P.; . KONTOGIANNI, V. G.; TSIAFOULIS, C. G.; TZAKOS, A. G.; SISKOS, M.; Michael Siskos 1 and Ioannis P. GEROTHANASSIS, I. P. H-NMR as a Structural and Analytical Tool of Intra- and Intermolecular Hydrogen Bonds of Phenol-Containing Natural Products and Model Compounds. **Molecules**, 19, 13643-13682, 2014.

COSTA, P. R. R. Sfrole and eugenol: study of the chemical reactivity and use in the synthesis of biologically active natural products and its derivates. **Química Nova**, 23, p. 357-369, 2000.

COUTINHO, D. F.; AGRA, M. D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BASÍLIO, I. J. L. D.. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroideae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 178-184, 2006.

COUTINHO, D. F.; DIAS, C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F; MARTINS, R. M.; SILVA, T. M.S.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S. Composition and molluscicidal activity of the oil from the stem bark of *Ocotea gardneri* (Meisn) Mez. **Journal of Essencial oil Research**, 19, p. 482, 2007.

CURSINO, L. M. de C. et al. Triterpenos das folhasde *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). *Acta Amazonica*. v.39, p. 181-186, 2009.

CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**. 13 (3), 187-91, 2006.

CUSTÓDIO, D. L.; VEIGA JUNIOR, V. F. Lauraceae Alkaloids. **RSC Adv**, v. 4, p. 21864-21890, 2014.

DIAS, C. S.; SILVA, I. G.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BRAZ-FILHO, R.; BARBOSA-FILHO, J. M. Isolamento e identificação de novos alcaloides de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 62-63, 2003.

DIAS, K. L. G.; DIAS, C. D. S.; BARBOSA, J. M.; ALMEIDA, R. N.; CORREIA, N. C. A.; MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects induced by reticuline in normotensive rats. **Planta Medica**, v. 70, n. 4, p. 328-333, 2004.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FERREIRA, A. K. R. Análise química e atividades biológicas de *Guatteria elliptica* R. E. Fries (Annonaceae). São Paulo, 198p. Tese de Doutorado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo, 2016.

FARAGO, P. V.; PADILHA-DE-PAULA, J. DE F.; NAKASHIMA, T.; DOLLBOSCARDIN, P. M.; BUDEL, J. M.; MAIA, B. H. L. N. S. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from bark of *Ocotea puberula* (Rich.) Ness. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 29, n. 7, p. 1242-1245, 2010.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; GUY, I.; GUINAUDEAU, H.; HEINZEN, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 382-384, 2007.

FRANCA, N. C.; GIESBRECHT, A. M.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, A. F.; MAGALHÃES, E. G.; MAIA, J. G. S. Benzylisoquinolines From *Ocotea Species*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 1671-1672, 1975.

FUNAZAKI, M. Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundários de *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae). São Paulo, 147 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2006.

GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Benzylisoquinoline Alkaloids and Flavonols from *Ocotea vellosiana*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 815-816, 1995.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; L. M. G. E. d. Silva and SHIMABUKURO, A. A. SHIMABUKURO. **J. Braz. Chem. Soc.**, 16, 1382-1386, 2005,

GARCEZ, F.R.; FRANCISCA DA SILVA, A.G.; GARCEZ, W.S.; LINCK, G.; FATIMA MATOS, M.C.; SANTOS, E.C.S.; QUEIROZ, L. M. M. Cytotoxicaporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Medica**, v. 77, n.4, p. 383-387, 2011.

GARRETT, R.; CRUZ, R. A. S.; ROCHA, L.; SANTOS, M. G.; SILVA, A. J. R. Chemical composition and toxicity of *Ocotea notata* (Nees) Mez essential oil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, v. 13, n. 4, p. 455-459, 2010.

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

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Lignoids with special attention to the chemistry of neolignans. *Química Nova*, 7, p. 250-273, 1984.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. Aporphinoid Alkaloids IV. *Journal of Natural Products*, v. 51, n.3, p. 389-474, 1988.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVE. *Journal of Natural Products*, v. 46, p. 761-835, 1983.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVE. *Journal of Natural Products*, v. 42, p. 325-360, 1979.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVE. *Journal of Natural Products*, v. 57, p. 1033-1135, 1994.

HARVEY, A. L. *Drug Discovery Today*. Elsevier, v. 13. N. 19/20, p. 894-901, 2008.

HAWKINS, K. M.; SMOLKE, C.D. Production of benzyloquinoline alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Chemical Biology*, 4, p. 564 – 573, 2008.

HEARST, P. J. Greenheart Alkaloids. II. Isolation and Characterization of Seven Alkaloids. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 29, n. 2, p. 466-470, 1964.

HERBERT, J. M.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BARBOSA, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; TIBIRICA, E. Pharmacological evidence for the putative existence of two different subtypes of PAF receptors on platelets and leukocytes; studies with yangambin. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling*, v. 17, n. 1, p. 1-14, 1997.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 7, n. 97, 2002. 1027-31.

HUANG, Y. T.; CHANG, H. S.; WANG, G. J.; LIN, C. H.; CHEN, S. Secondary Metabolites from the Roots of *Beilschmiedia tsangii* and Their Anti-Inflammatory Activities. **Int. J. Mol. Sci**, 13, p.16430-16443, 2012.

JEONG, E.-K. et al. Identification of structurally diverse alkaloids in *Corydalis* species by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 26, n. 15, p. 1661-74, 15 ago. 2012.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.

KASAI, R.; MATSUMOTO, K.; NIE, R. L.; MORITA, T.; AWAZU, A.; ZHOU, J.; TANAKA, O. Sweet and Bitter Cucurbitane Glycosides from *Hemsleya Carnosiflora*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1371-1376, 1987.

KO, F.N.; YU, S.M.; SU, M.J.; WU, Y.C.; TENG, C.M. Pharmacological activity of (-)-discretamine, a novel vascular alpha-adrenoceptor and 5-hydroxytryptamine receptor antagonist, isolated from *Fissistigma glaucescens*. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 882-888, 1993.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.

LACERDA, C. D. G. de. Revisão dos Alcaloides de Lauraceae e estudo fitoquímico de *Ocotea duckei* Vattimo, João Pessoa. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Laboratório de Tecnologia Farmacêutica- Universidade Federal da Paraíba, 234p, 2004.

LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; DA SILVA, M. N.; ARRUDA, A., C.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, G. M. S. P. ¹; SANTOS, A. S.; SOUZA FILHO, A. P. S. POTENCIAL ALELOPÁTICO DE CATEQUINAS DE *Tachigali myrmecophylla* (LEGUMINOSAE). **Quim. Nova**, Vol. 31, N. 3, 493-497, 2008.

LOISEAU, P. M. et al. In vitro activities of new 2-substituted quinolines against *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1777-80, 2011.

LOPEZ, J. A.; BARILLAS, W.; GOMEZ-LAURITO, J, LIN, F. T.; AL-REHAILY, A. J.; SHARAF, M. H. M.; SCHIFF JUNIOR, P. L. Aporphine alkaloids of *Ocotea brenesii*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, n. 2, p. 145-147, 1996

LORDELLO, A. L. LACAVA; CAVALHEIRO, A. J.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Phenylpropanoids, sterols and sesquiterpene from wood of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Revista Latinoamericana de Quimica* v, 28, p.35-39, 2000

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais do Brasil: Nativas e Exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2, 2008.

LÚCIO, A. S. S. C. Alcaloides de annonacea: ocorrência e compilação de suas atividades biológicas e avaliação fitoquímica e biológica de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (Annonaceae), 302f, Tese (Doutorado)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, v. 66, n. 20, p, 2399-407, 2005

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Rev Saúde Pública**, 44(1), p. 200-202, 2012.

MIZUSHINA, Y.; NAKANISHI, R.; KURIYAMA, I.; KAMIYA, K.; SATAKE, T.; SHIMAZAKI, N.; KOIWAI, O.; UCHIYAMA, Y.; YONEZAWA, Y.; TAKEMURA, M.; SAKAGUCHI, K.; YOSHIDA, H. β -Sitosterol-3-O- β -d-glucopyranoside: A euryotic DNA polymerase λ inhibitor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 99, n. 2, p. 100-107, 2006.

MONTANARI, C. A.; SILVA-BOLZANI, V. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001

MONTE NETO, R. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUZA, L. M. A. E.; ATHAYDE FILHO, P. F.; DIAS, C. S.; OLIVEIRA, M. R. Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from *Ocotea duckei* (Lauraceae) show antileishmanial activity. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 5, p. 348-352, 2007.

MONTRUCCHIO, D. P.; MIGUEL, O. G.; ZANIN, S. M. W.; SILVA, G. A.; CARDOZO, A. M.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated from Fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Medica**, v. 78, p. 1543-1548, 2012.

MORAES, M.M.; NEVES, I.A.; NEVES, R.C.S.; BOTELHO, P.S.; CÂMARA, C.A.G. Composição química e atividade acaricida do óleo essencial das folhas de *Ocotea gardneri*

Mez. (Lauraceae). 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, Águas de Lindoia – SP, 2010.

MORAIS, L. C. S. L.; ALMEIDA, R. N.; DA-CUNHA, E. V. L.; DA-SILVA, M. S.; BARBOSA, J. M.; GRAY, A. I. Further lignans from *Ocotea duckei*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 2, p. 144-147, 1999.

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

MORAIS, L. C. S. L.; PACHÚ, C. O.; SANTOS, V.L; BARBOSA-FILHO, J. M. New lignan from *Ocotea duckei*. **Fitoterapia**, v. 67, n.6, p. 557, 1996.

MORAIS, I. C. S. L.; PACHÚ, V. I.; SANTOS, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M. (+)-4'-O-demethylepimagnolin A from *Ocotea duckei*. **Fitoterapia**, v. 69, n. 1, p. 91-92, 1998a.

MOREIRA, F. de P. M., et al. Flavonoides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.

NAPRALERT. Natural Products Alert (), University of the Illinois, Chicago, October 2009.

NEWMARK, H. L. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 6, 1101–1103, 1997.

PENHA, A. R. S. Estudo da potencialidade da lignana iangambina e da quitosana no tratamento da leishmaniose experimental em camundongos suíços. 2010. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

PENNA C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **J. Ethnopharmacol**, 77, p. 37-40, 2001.

OHASHI, M; WILSON, J.M.; BUDZIKIEWICZ, H.; SHAMMA, M.; SLUSARCHYK, W.A.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXI.

Aporphines and related alkaloids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 18, p. 2807-2810, 1963.

OLIVEIRA, M. C. C. de et al. Flavonoids from flowers of *Stiffitia crisantha* Mikan. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 182-184, 1999.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

QI, S.; WU, D.; MA, Y.; LUO, X. Novel flavane from *Carapa guianensis*. **Acta Botanica Sinica**,45(9), p.1129-1133, 2012.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, 53(82), p. 59-121, 2002.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. **Lauraceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000143>>. Acesso em: 06 junho 2016.

RAO, C. V.; NEWMARK, H. L.; REDDY, B. S. Chemopreventive effect of squalene on colon câncer. *Carcinogenesis*. v.19, n. 2, 287–290, 1998.

REDDY, L. H.; COUVREUR, P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, 1412–1426, 2009.

RINALDI, M.V.N. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. São Paulo, 125 p. Dissertação de Mestre - Faculdade Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2007.

ROUT, L. Vanadium Catalyzed Selective Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones with *tert*-Butyl Hydroperoxide. **P. Nath and T. Punniyamurthy**, p.3, 2007.

SAIDI, N.; MORIT, H.; LITAUDON, M.; MUKHTAR, M. R. AWANG, K.; HAMID. A.; HADI, A. Benzylisoquinoline alkaloids from bark of *cryptocarya rugulosa*. *Info. J. Chem*, 11(1), p. 59-66, 2011.

SANTOS, C.D.;S.M. Visão de futuro para produção de antibióticos: tendências de pesquisa, desenvolvimento e inovação. 2014. 216 f. **Tese (Pós-Graduação em Tecnologia de Processos, Químicos e Bioquímicos)** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SARTORI, M.R.K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). 2005. 81 f. **Dissertação ((Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas)** – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SERRA, M. F.; DIAZ, B. L.; BARRETO, E. O.; PEREIRA, A. P. B.; LIMA, M. C. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, S. B.; MARTINS, M. A.; DESILVA, P. M. R. Anti-allergic properties of the natural PAF antagonist yangambin. **Planta Medica**, v. 63, n. 3, p. 207-212, 1997.

SILVA, I. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA SILVA, M. S.; DE LACERDA, C. D. G.; DA-CUNHA, E. L. Coclaurine from *Ocotea duckei*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 9, p. 881-883, 2002.

SILVA, J. R. A.; DO CARMO, D. F. M.; REIS, E. M.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; DA SILVA, B. O.; FERREIRA, J. L. P.; AMARAL, A. C. F. Chemical and biological evaluation of essência oils with economic value from Lauraceae species. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1071-1076, 2009.

SCHMIDT, J. et al. Analysis of benzylisoquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 11, n. 1, p. 325, 2005.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*. v. 21 n. 3, 525–530, 2000.

STEVENS, P. F. **Angiosperm phylogeny website**. Versão 9, Agosto de 2008. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/>> Acesso em: 06 junho 2016.

TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biol. Pharm. Bull.** 27 (12), 1965-9.

TAKAKU, S.WILLIAM, A. H.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 35, p. 525-532, 2007.

TELES, M. M. R. S. Estudo fitoquímico de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). 2012. 145p. Dissertação (Mestrado-Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

VECCHIETTI, V.; CASAGRANDE, C.; FERRARI, G.; DANIEL, B.; PALMISANO, G. Alkaloids of *Ocotea acutangula*. *Journal of the Chemical Society*, v. 1, p. 578-581, 1981.

VECCHIETTI, V.; CASAGRANDE, C.; FERRARI, G. Alkaloids of *Ocotea brachybotra*. *Farmaco*, v. 32, p. 767-769, 1977.

VECCHIETTI, V.; CASAGRANDE, C.; FERRARI, G.; SEVERINI, G. New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum*. *RiccaFarmaco*, v. 34, p. 829-840, 1979.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcaloides aporfinoides do genero *Ocotea* (Lauraceae). *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 92-98, 2007.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, O. G.; MONTRUCCHIO, D. P.; COSTA, C. K.; LAGOS, J. B.; LORDELLO, A. L. L. Mudanças de *Ocotea puberula* (Lauraceae): Identificação e monitoramento de alcaloides aporfinoides. *Química Nova*, v. 34, p. 743-747, 2012.

WADDELL, T. G.; RAPOPORT, H. Synthesis of [3-⁴c]-2'-methylreticuline and its incorporation into alkaloid fractions of *papaver Somniferum*. *Phytochemistry*, v. 24, n. 3, p. 469-472, 1985.

WALL, M. M. Functional lipid characteristics, oxidative stability, and antioxidant activity of macadamia nut (*Macadamia integrifolia*) cultivars. *Food Chemistry*, v. 121, p. 1103-1108, 2010.

WANG, Q.; XIE, M. Antibacterial activity and mechanism of luteolin on *Staphylococcus aureus*. *Wu Xue Bao*, v. 50, 9, p. 1180-1184, 2010.

WANG, S.; LIU, L.; WANG, L.; HU, Y.; ZHANG, W.; LIU, R. Structural Characterization and Identification of Major Constituents in Jitai Tablets by High-Performance Liquid Chromatography/Diode-Array Detection Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Molecules*, 17, p. 10470-10493, 2012.