

Marcos Marçal Ferreira Queiroz

Utilização da técnica hifenada
CLAE-DAD-IES-EM na detecção
e caracterização de substâncias em
Ocotea paranapiacabensis e *Aniba firmula*
(Lauraceae)

Dissertação apresentada ao instituto
de Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani
Coorientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Q3u

Queiroz, Marcos Marçal Ferreira

Utilização da técnica hifenada CLAE-DAD-IES-EM na detecção e caracterização de substâncias em *Ocotea paranapiacabensis* e *Aniba firmula* (Lauraceae) / Marcos Marçal Ferreira Queiroz. – Araraquara : [s.n], 2009
147 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani

Co-orientador: Ian Castro-Gamboa

1. Produtos naturais. 2. CLAE. 3. Espectrometria de massas. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

MARCOS MARÇAL FERREIRA QUEIROZ

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Araraquara, 17 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Vanderlan da Silva Bolzani (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Patrícia Mendonça Pauletti
Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Nome: Marcos Marçal Ferreira Queiroz

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP. Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica. NuBBE.

Rua professor Francisco Degni s/n. jd. Quitandinha, CEP 14.800-900.

Telefone: (16) 3301-6785

E-mail: m_marcal@iq.unesp.br

Formação Acadêmica

Graduação

Bacharelado

Instituição: Universidade Federal da Paraíba, UFPB.

Local: João Pessoa, Paraíba.

Curso: Química.

Período: 2002-2006.

.

Participações em Congressos

- Participação do “**1st Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual meeting on micromolecular evolution, Systematics and Ecology**”, 2007, São Pedro.
- Participação como comissão organizadora do “**III Workshop do NuBBE – Conservação e uso sustentável da Diversidade de Plantas do Cerrado e da Mata Atlântica**”, 2008, Araraquara.

- Participação como comissão organizadora do “**VI Simpósio & Reunião de Avaliação do Programa BIOTA/FAPESP e III Reunião do BIOprospecTA**”, 2008, Araraquara.
- Participação no Minicurso internacional: Nature and Unexploited Source of Bioactive Compounds. 2006, João Pessoa.

Apresentação de Trabalhos em Eventos

- CASTRO-GAMBOA, I.; PAULETTI, P. M.; Queiroz M.M.F.; de Matos A. T.; Roperio, D.R.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Characterization and detection of major micromolecular constituents from species of Cerrado and Atlantic forest using HPLC/HRMS/DAD combined with in silico techniques. In: 1st Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual meeting on micromolecular evolution, Systematics and Ecology, 2007, São Pedro. Proceeding of the 1st Brazilian Conferencs on Natural Products and XXVII Annual meeting on micomolecular evolution, Systematics and Ecology, 2007. p. BOSA-5.
- QUEIROZ, M. M. F. ; de MATOS, A. T. S. ; ROPERO, D. R. ; PAULETTI, P. M.; SILVA, D. H. S. da ; BOLZANI, V. S. ; CASTRO-GAMBOA, I. . Detection and characterization of major micromolecular constituents from species of cerrado and atlantic rainforest using HPLC/HRMS/DAD combined with in silico technique: the case of Strychnos brasiliensis. 2007.
- SOUTO, O. A.; SANTOS, E. F.; QUEIROZ, M. M. F.; LUIZ, M. R.; FREITAS, L.R. monitoramento da estabilidade térmica do óleo de sesamum indicum L. submetida ao processo de frituras. 2003.
- SANTOS, E. F. ; LOPES, J. D. ; QUEIROZ, M. M. F. ; SOUTO, O., A. ; FREITAS, L.R. . Atividade Bactrericida e toxicológica de óleo de semente de solanum agrarium L.. 2003.

- SANTOS, E. F. ; LOPES, J. D. ; QUEIROZ, M. M. F. ; SOUTO, O., A. Avaliação da estabilidade térmica do óleo de solanum agrarium sendt submetida à temperaturas de frituras. 2003.

Outros

- Palestra na escola – palestra realizada em uma escola estadual no município de Jaú, divulgando o curso de Química e o Instituto de Química – UNESP/Araraquara.
- Estágio realizado na Universidade de Santiago de Compostela-Espanha, sob supervisão do professor Ricardo Rigueira. Título: Determinação de configuração relativa e absoluta de alcoóis primários e secundários utilizando RMN no grupo diretamente ligado ao reagente derivatizante quira.

*Aos meus pais Carmen Lucia e
Marçal de Queiroz Paulo, aos
meus irmãos Emerson, Janaína
e Carolina, por terem me
apoiado nessa jornada.*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Em especial a professora Vanderlan da Silva Bolzani, por me aceitar como seu aluno de mestrado, por sua orientação e por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao professor Ian Castro-Gamboa, por sempre estar disposto a transmitir seus valiosos ensinamentos e, sobretudo, por sua valiosa e inestimável amizade.

Ao Dr. Nivaldo Boralle pela realização dos espectros de RMN, por seus valiosos conhecimentos e pelos bons momentos de descontração.

A Sayonara A. Eliziário, pelos momentos de amizade, companheirismo, descontração, convivência e ensinamento, que foi de fundamental importância para a realização e conclusão desse trabalho.

A Denise R. Roper, por todos os momentos de discussão sobre os aspectos da química e pelos momentos de descontração no laboratório.

Aos meus grandes amigos, Gabriel, Frodo, Marcão (o verdadeiro), Rodrigão, Zé Renato, João, Zé Rufino, Daniel, Tanabi, Camila Xavier, Maurício, Chicão, Amália, Osmundo, Glauciene, Letícia, Marcos Tomate, Piá, Rose, Tomaz, Tony, o mais sincero sentimento de amizade.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

Finalmente, a TODOS os amigos do NuBBE pela amizade e companheirismo, que me proporcionaram um ambiente agradável durante a realização desse trabalho.

RESUMO

Este trabalho apresenta a aplicação da metodologia de análise *in silico* em frações da partição líquido-líquido obtidas a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ocotea paranapiacabensis* e *Aniba firmula* (Lauraceae). A abordagem utilizou os dados obtidos a partir da técnica hifenada CLAE-DAD-IES-EM, sendo esses dados analisados e contrastados com a base de dados do *Dictionary of Natural Products* (DNP), a fim de se detectar metabólitos secundários previamente isolados nos gêneros *Ocotea* e *Aniba*. A partir da obtenção desses dados, foi possível direcionar o estudo das frações analisadas para a identificação de novas substâncias nos gêneros estudados. Utilizando a metodologia, foram detectadas, estruturas isoméricas de alcalóides aporfinóides e dois flavonóides monoglicosilados nas folhas de *O. paranapiacabensis*. Não há relatos desses flavonóides em espécies do gênero *Ocotea*, o que levou ao planejamento de uma estratégia para o isolamento desses constituintes, que tiveram sua estrutura elucidada através da análise de RMN ^1H e ^{13}C . A abordagem utilizada no estudo da fração acetato de etila das folhas de *A. firmula* possibilitou a detecção de quatro substâncias da classe das estilipironas (**1-4**), esses dados foram importantes para a obtenção de uma região específica do perfil cromatográfico CLAE-DAD onde não foram detectados substâncias previamente isoladas através da análise *in silico*. A fração AFFAc foi então submetida a CLAE-UV com a finalidade de identificar novos constituintes químicos (estilipironas). A fração obtida foi analisada e purificada, resultando no isolamento de dímeros de estilipironas inéditos na literatura, 4-metoxi-8`-(11`,12`-metilenodioxifenil)-7-[6-(4-metoxi-2-pironil)]-6`-estiril-oxabicyclo[4,2,0]-ocat-4`-em-2`-ona (**5**) 8`-(11`, 12`metilenodioxifenil)-8-fenil-7,7` di [6-(4,4`-dimetoxi-piran-2-ona) ciclobutano (**6**), o que confirma a importância da aplicação da análise *in silico* como ferramenta para a identificação de constituintes químicos já descritos nas espécies estudadas.

ABSTRACT

This work presents the application of the methodology *in silico* in partition liquid-liquid fractions obtained from the hydroalcoholic extract of leaves of *Ocotea paranapiacabensis* and *Aniba firmula* (Lauraceae). The approach used the data obtained from the hyphenated technique HPLC-DAD-ESI-MS, these data are analyzed and contrasted with the database of the Dictionary of Natural Products (DNP) in order to detect secondary metabolites previously isolated in the genus *Ocotea* and *Aniba*. Upon obtaining these data, it was possible to direct the study of fractions analyzed to the identification of new substances in the genera studied. Using the methodology, were detected, isomeric structures of aporphinic alkaloids and two flavonoids in leaves of *O. paranapiacabensis*. There are no reports of these flavonoids in species of the genus *Ocotea*, which led to planning a strategy for the isolation of these constituents, which had its structure elucidated by analysis of ¹H and ¹³C NMR. The approach used in the study of the ethyl acetate fraction of leaves of *A. firmula* enabled the detection of four substances of styrylpyrones class (**1-4**), these data were important for determination a specific region of the HPLC-DAD chromatographic profile which were not detected substances previously isolated by *in silico* analysis. The fraction AFFAc was then subjected to HPLC-UV with the aim of identifying new chemical constituents (styrylpyrones). The fraction obtained was analyzed and purified, resulting in the isolation of dimers of estirilpironas unprecedented in the literature, 4-methoxy-8'- (11', 12'-metilenodioxiphenyl) -7 - [6 - (4-methoxy-2-pironil)] -6'-styryl-oxabicyclo [4,2,0]-ocat-4'-at'-2-one (**5**) 8' - (11', 12' metilenodioxiphenyl)-8-phenyl-7, 7' - di [6 - (4,4 "-dimethoxy-pyran-2-one) ciclobutane (**6**), confirming the importance of application of *in silico* analysis as a tool for the identification of chemical constituents in the already described species.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetronitrila
AChE-	Acetilcolinesterase
AcOEt:	Acetato de Etila
AFFAc:	<i>Aniba firmula</i> folhas fração acetato de etila
AFFaq:	<i>Aniba firmula</i> folhas fração aquosa
AFFBu:	<i>Aniba firmula</i> folhas fração butanólica
AFFhex:	<i>Aniba firmula</i> folhas fração hexânica
aq	Aquosa
CG:	Cromatografia Gasosa
CLAE:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLPR:	Cromatografia Líquida Sob Pressão Reduzida
C18	Fase estacionária octadecilsilano
DMSO- d_6	Dimetilsufóxido deuterado
DNP	Dictionary of Natural Products
DPPH:	radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila
EC	Eletroforese Capilar
EM	Espectrometria de Massas
EMAR:	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
EtOH:	etanol
FE:	Fase Estacionária
FM:	Fase Móvel
F1-	Subfração da fração de partição OPFAc (9:1)
F2-	Subfração da fração de partição OPFAc (7:3)
F3-	Subfração da fração de partição OPFAc (1:1)
F4-	Subfração da fração de partição OPFAc (3:7)
F5-	Subfração da fração de partição OPFAc (0:1)

Hex:	Hexano
IES	Interface <i>electrospray</i>
IV:	InfraVermelho
MHz	Megahertz
MeOH:	Metanol
<i>m/z</i>	Relação Massa/Carga
NuBBE:	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
nm	nanômetro
ODS	Octadecilsilano
OPFAc:	<i>Ocotea paranapiacabensis</i> folhas fração acetato de etila
OPFaq:	<i>Ocotea paranapiacabensis</i> folhas fração aquosa
OPFBu:	<i>Ocotea paranapiacabensis</i> folhas fração butanólica
OPFhex:	<i>Ocotea paranapiacabensis</i> folhas fração hexânica
OPG:	<i>Ocotea paranapiacabensis</i> galhos
OPGAc:	<i>Ocotea paranapiacabensis</i> galhos fração acetato de etila
OPGaq:	<i>Ocotea paranapiacabensis</i> galhos fração aquosa
OPGBu:	<i>Ocotea paranapiacabensis</i> galhos fração butanólica
OPGhex:	<i>Ocotea paranapiacabensis</i> galhos fração hexânica
ppm	parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
THF	Tetraidrofurano
TIC	Total Ion Current (corrente total de íons)
<i>t_R</i>	Tempo de retenção
UV:	Ultra Violeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular de fármacos extraídos a partir de fontes naturais com estruturas diversificadas: vinblastina, vincristina, podofilotoxina, teniposídeo e taxol.....	2
Figura 2- Procedimento para obtenção dos princípios ativos de plantas auxiliado por técnicas hífenadas	5
Figura 3- Representação esquemática da interface <i>electrospray</i> . a) capilar, b) contra-eletrodo, c) cone de amostragem, d) skimmer e, e) lentes do skimmer.	7
Figura 4- Distribuição geográfica mundial das espécies vegetais pertencentes à família Lauraceae.....	9
Figura 5- Registro fotográfico de quatro espécies do gênero <i>Ocotea</i> pertencentes a família Lauraceae.....	11
Figura 6- Alcalóides aporfinóides isolados de espécies vegetais do gênero <i>Ocotea</i> da família Lauraceae.	12
Figura 7- Registro fotográfico da espécie <i>Aniba rosaeodora</i> (pau-rosa).....	13
Figura 8- Constituintes químicos isolados a partir de espécies do gênero <i>Aniba</i> (família Lauraceae)	14
Figura 9 – Esquema da partição líquido-líquido dos extratos hidroalcoólicos das folhas e galhos de <i>O. paranapiacabensis</i> , separadamente, e folhas de <i>A. firmula</i>	23
Figura 10 - Procedimento experimental de separação e análise através de CLAE-DAD dos extratos das folhas e dos galhos de <i>Ocotea paranapiacabensis</i> , das folhas <i>Aniba firmula</i> e suas respectivas frações de partição líquido-líquido.	24
Figura 11- Perfis cromatográficos da partição acetato de etila (OPFAc), butanólica (OPFBu) e aquosa (OPFAq) do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>O. paranapiacabensis</i> , utilizando CLAE-DAD com detector 254 nm.	31
Figura 12- Perfis cromatográficos da partição acetato de etila (OPGAc), butanólica (OPGBu) e aquosa (OPGAq) do extrato hidroalcoólico dos galhos de <i>O. paranapiacabensis</i> , utilizando técnicas hífenadas CLAE-DAD com detector 254 nm.	33
Figura 13 - Perfis cromatográficos das frações de partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>A. firmula</i> (Lauraceae).....	35
Figura 14 - Espectro da fração OPFAc obtidos a partir da técnica CLAE/DAD-IES-EM e as respectivas bandas de UV dos adutos identificados	37
Figura 15 - Espectro de massa do composto 1, detectado com um alcalóide da classe dos aporfinóides, de peso molecular 341,1627 g/mol e fórmula $C_{20}H_{23}NO_4$	39

Figura 16 - Alcalóides aporfínicos isômeros, com massa molecular 341,1627 g/mol isolados e caracterizados em espécies do gênero <i>Ocotea</i> (Lauraceae).	40
Figura 17 - Espectro de massa do composto 2 de peso molecular 371,1733 correspondente a fórmula molecular $C_{21}H_{25}NO_5$	41
Figura 18 - Alcalóides aporfínicos isômeros, com massa molecular 371,1733 g/mol isolados de espécies de <i>Ocotea</i> (Lauraceae).	42
Figura 19 - Espectro de massa da substância 3, de massa molecular 355,1420 g/mol correspondente a fórmula $C_{20}H_{21}NO_5$	43
Figura 20 - Alcalóides aporfínicos isômeros, com massa molecular 355,1420 g/mol, isolados e caracterizados em espécies do gênero <i>Ocotea</i> (Lauraceae).	44
Figura 21 - Espectro de massa apresentando fragmentação por dissociação na fonte das estruturas do pico 4, identificada como um flavonóide de massa molecular 448,1275 g/mol.	45
Figura 22 - Estrutura molecular do flavonóide 3, 5, 7, 4'-tetrahidroxi-flavonol.....	46
Figura 23 - Espectro de massa referente ao pico 4, identificado como um flavonóide de fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$	47
Figura 24 - Estrutura molecular do flavonóide 3, 5, 7, 4'-tetrahidroxi-flavonol.....	48
Figura 25 - Perfis cromatográfico CLAE/DAD 254 nm da fração OPFAc obtida a partir de partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>O. paranapiacabensis</i>	49
Figura 26 - Representação da metodologia aplicada no isolamento dos flavonóide 4 e 5, utilizando cromatografia em coluna a pressão reduzida.....	50
Figura 27 - Perfil cromatográfico da Fração 4, obtida através do fracionamento da fração OPFAc, utilizando a Cromatografia em Coluna a Pressão Reduzida (CCPR).....	50
Figura 28 - Estrutura dos flavonóides kaempferol-3-O-glicosídeo (1) e kaempferol-3-O-ramnosídeo (2) isolados a partir da fração OPFAc.	52
Figura 29 - Ilustração do seqüestro do radical DPPH e a mudança em sua absorvidade em $\lambda=517$ nm.....	54
Figura 30 - Atividade sequestradora de radicais DPPH, das frações de partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>O. paranapiacabensis</i>	55
Figura 31 - Monitoramento da atividade antioxidante da fração OPFAc, em azul está representado o perfil cromatográfico DAD 254 nm e em vermelho o resultado do ensaio que mediu a capacidade seqüestradora de radicais livres, DPPH da fração analisada	56
Figura 32 - Espectro de massa da fração AFFAc oriunda do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>A. firmula</i> (Lauraceae).	58
Figura 33 - Estruturas dos constituintes identificados, como adutos na forma $[M+H]^+$ correspondentes aos picos 1, 2, 3 e 4 do espectro de massa da fração AFFAc.	59

Figura 34- Região do perfil cromatográfico da fração AFFAc representada pela área em destaque, onde não foram identificados substâncias previamente isolados do gênero <i>Aniba</i> através da análise <i>in silico</i> .	60
Figura 35 - Esquema do fracionamento de AFFAc.	61
Figura 36 - Cromatograma da fração três, obtido nas seguintes condições:	62
Figura 37- Estirilpironas isoladas a partir das folhas de <i>A. firmula</i> .	62
Figura 38: Espectro de RMN de ^1H de 1 .	82
Figura 39: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 1 .	83
Figura 40: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 1 .	84
Figura 41: Espectro de RMN de ^{13}C de 1 .	85
Figura 42: Espectro de RMN de ^1H da substância 2 .	86
Figura 43: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 2 .	87
Figura 44: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 2 .	88
Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 .	89
Figura 46: Espectro de RMN de ^1H de 4 (ESPI-2) .	90
Figura 47: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 4 (ESPI-2) .	91
Figura 48: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 4 (ESPI-2) .	92
Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C de 4 (ESPI-2) .	93
Figura 50: Mapa de contornos <i>g</i> HMBC de 4 (ESPI-2) .	94
Figura 51: Mapa de contornos <i>g</i> HMBC de 4 (ESPI-2) .	95
Figura 52: Mapa de contornos <i>g</i> HMBC de 4 (ESPI-2) .	96
Figura 53: Mapa de contornos <i>g</i> HMBC de 4 (ESPI-2) .	97
Figura 54: Mapa de contornos <i>g</i> COSY de 4 (ESPI-2) .	98
Figura 55: Espectro de RMN de ^1H da substância 3 (ESPI-1) .	99
Figura 56: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 3 (ESPI-1) .	100
Figura 57: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 3 (ESPI-1) .	101
Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C de 3 (ESPI-1) .	102
Figura 59: Mapa de contornos <i>g</i> HMBC de 3 (ESPI-1) .	103
Figura 60: Mapa de contornos <i>g</i> HMBC de 3 (ESPI-1) .	104
Figura 61: Mapa de contornos <i>g</i> HMBC de 3 (ESPI-1) .	105
Figura 62: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 3 (ESPI-1) .	106
Figura 63: Espectro de RMN de ^1H de 5 (ESPI-3) .	107
Figura 64: Espectro de RMN de ^1H de 5 (ESPI-3) .	108

Figura 65: Espectro de RMN de ^1H de 5 (ESPI-3)	109
Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C de 5 (ESPI-3)	110
Figura 67: Mapa de contorno <i>g</i> COSY de 5 (ESPI-3)	111
Figura 68: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de 5 (ESPI-3)	112
Figura 69: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de 5 (ESPI-3)	113
Figura 70: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 5 (ESPI-3)	114
Figura 71: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 5 (ESPI-3)	115
Figura 72: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 5 (ESPI-3)	116
Figura 73: Espectro de ^1H de 6 (ESPI-4)	117
Figura 74: Ampliação do espectro de ^1H de 6 (ESPI-4)	118
Figura 75: Ampliação do espectro de ^1H de 6 (ESPI-4)	119
Figura 76: Espectro de ^{13}C de 6 (ESPI-4)	120
Figura 77: Mapa de contorno <i>g</i> COSY de 6 (ESPI-4)	121
Figura 78: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de 6 (ESPI-4)	122
Figura 79: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de 6 (ESPI-4)	123
Figura 80: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 6 (ESPI-4)	124
Figura 81: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 6 (ESPI-4)	125
Figura 82: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 6 (ESPI-4)	126
Figura 83: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 6 (ESPI-4)	127
Figura 84: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 6 (ESPI-4)	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das frações de partição líquido-líquido, obtidas a partir de folhas e galhos de <i>Ocotea paranapiacabensis</i> (Lauraceae)	22
Tabela 2 - Relação das frações de partição líquido-líquido, obtidas a partir de folhas <i>Aniba firmula</i> (Lauraceae).....	22
Tabela 3 - Massa das frações obtidas a partir de 20 g de extrato hidroalcoólico das folhas de <i>O. paranapiacabensis</i>	29
Tabela 4 - Massa das frações obtidas a partir de 20 g de extrato hidroalcoólico dos galhos de <i>O. paranapiacabensis</i>	29
Tabela 5 - Massa das frações obtidas a partir de 20 g de extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Aniba firmula</i>	30
Tabela 6 - Dados da relação massa/carga, tempo de retenção e UV_{MAX} dos adutos detectados a partir da técnica CLAE/DAD-IES-EM da fração OPFAc	38
Tabela 7 - Dados de RMN de 1H e de ^{13}C (500 MHz) dos flavonóis 1 e 2 (DMSO- d_6).	52
Tabela 8 - Resultados CLAE/DAD-IES-EM (t_R , m/z e λ) obtidos a partir da análise do espectro de massa da fração AFFAc	58
Tabela 9 - Dados de RMN 1H e ^{13}C de estirilpirona ESPI-1 ($CDCl_3$, δ em ppm).....	64
Tabela 10 - Dados de RMN da estirilpirona ESPI 2 ($CDCl_3$, δ em ppm).....	66
Tabela 11 - Dados de RMN da estirilpirona ESPI 3 ($CDCl_3$, δ em ppm).....	69
Tabela 12 - Dados de RMN da estirilpirona ESPI 4 ($CDCl_3$, δ em ppm).....	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aplicação de técnicas hifenadas na abordagem de matrizes naturais complexas	4
1.2. Revisão bibliográfica	9
1.2.1. Lauraceae	9
1.2.2. Ocotea	10
1.2.3. Aniba	13
2. OBJETIVOS	15
3. EXPERIMENTAL	17
3.1. INSTRUMENTOS	18
3.2. MATERIAIS	19
3.2.1 Solventes	19
3.2.2 Suporte Cromatográfico	19
3.2.3 Amostras dos vegetais	19
3.2.4 Reagentes utilizados para avaliação da atividade antioxidante	20
3.3. METODOLOGIA	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Extração líquido-líquido e atividade das frações	29
4.2. Perfis cromatográficos (CLAE) das frações oriundas de partição líquido-líquido de <i>O. paranapiacabensis</i>	31
4.3. Perfis cromatográfico (CLAE) das frações de partição líquido-líquido de <i>Aniba firmula</i>	35
4.4. Análise in silico da fração OPFAc do extrato hidroalcoólico de <i>O. paranacabiabensis</i>	37
4.4.1. Detecção e análise estrutural do aduto representado pela banda 1	38
4.4.2. Detecção e análise estrutural do aduto representado pela banda 2	40
4.4.3. Detecção e análise estrutural do aduto representado pela banda 3	42
4.4.4. Detecção e análise estrutural do aduto representado pela banda 4	45
4.4.5. Detecção e análise estrutural do aduto representado pela banda 5	46
4.4.6. Elucidação estrutural dos flavonóides identificados através da análise in silico da fração OPFAc	48

4.4.7. Identificação das substâncias 1 (FLA 1) e 2 (FLA 2)isoladas a partir da fração OPFAc.....	51
4.5. Teste antioxidante frente a capacidade de captura do radical livre dpqh. 54	
4.6. Análise <i>in silico</i> da fração AFFAc obtida a partir do extrato hidroalcoólico de <i>Aniba firmula</i>	58
4.7. Identificação das substâncias isoladas a partir das folhas de <i>A. firmula</i>..	63
5. CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais extraídos de plantas exerceram um papel de destaque no processo de descoberta de fármacos, seja como modelos para a síntese de moléculas novas, seja por suas propriedades farmacológicas. Essa dualidade sempre fascinou a espécie humana que, desde os primórdios da civilização, vem utilizando-os racionalmente, tanto para profilaxia quanto para cura e até mesmo para alimentação.

Fazendo uma revisão histórica do desenvolvimento de fármacos, a importância dos produtos naturais é inquestionável. Já no século XIX muitas plantas tiveram seus primeiros estudos com base científica, o que resultou na descoberta da morfina, glicosídeos cardiotônicos, quinina, entre outras substâncias, isoladas de plantas medicinais e, utilizadas até hoje como medicamentos. No século passado, o domínio da química de produtos naturais no desenvolvimento de medicamentos teve um declínio significativo, especialmente após a II Grande Guerra, devido, em parte, ao fantástico desenvolvimento da síntese orgânica. Utilizando-se da síntese, a indústria farmacoquímica produziu uma quantidade expressiva de substâncias que foram testadas aleatoriamente, ficando os produtos naturais relegados a um segundo plano, por quase meio século (McCHESNEY et al, 2007).

Com a descoberta dos antibióticos e anticolésterolêmicos a partir de microrganismos, dos benefícios divulgados pela Organização Mundial de Saúde na década de 70 sobre a eficácia da medicina chinesa e da descoberta de quimioterápicos eficazes como vinblastina, vincristina, podofilotoxina, teniposídeo e taxol (Figura 1). A procura pelos produtos naturais voltou a ter seu destaque, especialmente pela indústria farmacêutica, através de grandes investimentos em cultivos, processos de extração e ampliação das pesquisas de produtos naturais para outras fontes pertencentes a outros organismos da biodiversidade até então inexplorados (HARVEY, 2008)

As dúvidas ou questionamentos sobre a exploração de fármacos de origem natural estão relacionados ao alto risco de investimento envolvendo a descoberta de produtos novos, considerando que uma fração muito pequena do total dos muitos produtos (extratos, frações e constituintes) testados, *in vitro* e *in vivo* alcançam as fases de testes envolvendo ensaios clínicos de avaliação de eficácia terapêutica e, pouquíssimos desses produtos são patenteados ou registrados nos órgãos regulatórios internacionais, para oficializar ou regularizar a sua comercialização.

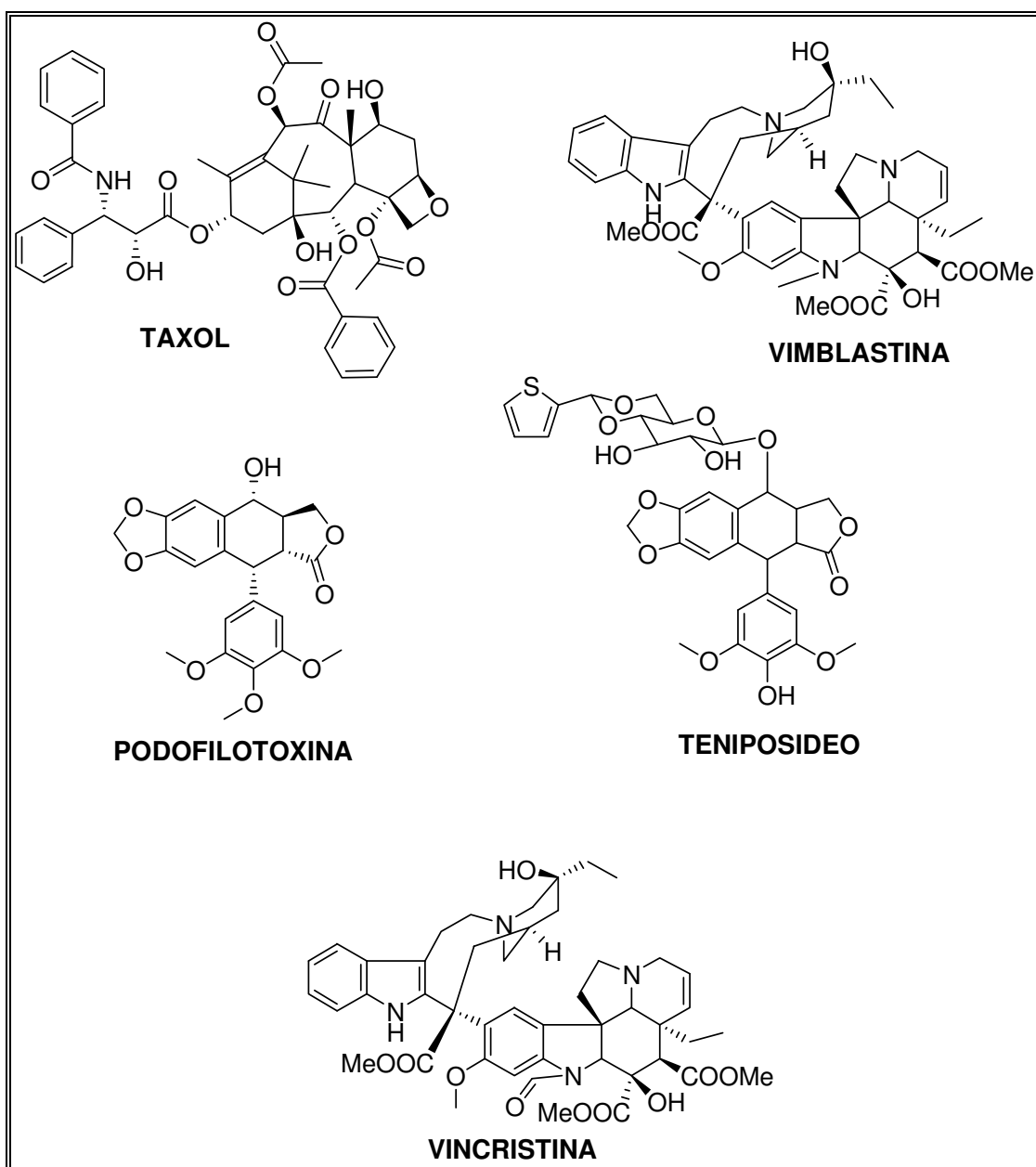


Figura 1- Estrutura molecular de fármacos extraídos a partir de fontes naturais com estruturas diversificadas: vinblastina, vincristina, podofilotoxina, teniposídeo e taxol

Nestes últimos 10 anos, mudanças importantes estão sendo aplicadas no direcionamento das pesquisas, desenvolvimentos e inovações por novos fármacos. Essas novas rotas devem-se aos avanços da biologia molecular, mapeamento genético, bioensaios automatizados, desenvolvimento de novas metodologias de bioprospecção e da quimiogenômica. Esses novos programas têm levado a indústria farmacêutica a repensar sua forma de investimento na busca por fármacos de

origem natural, considerando que estes novos ou atualizados segmentos abriram também novas perspectivas para as parcerias e colaborações entre Indústria, Universidades e Institutos de Pesquisas. Nesta nova fase é possível desenvolver pesquisa desde a bioprospecção (seleção de substâncias bioativas de fonte natural) até fases mais refinadas como a química medicinal, cujo objetivo continua sendo a descoberta, isolamento, identificação e síntese de substâncias naturais (bioativos), com estruturas novas com propriedades farmacológicas únicas.

Com relação ao Brasil, o panorama da importância dos produtos naturais para indústria farmacêutica brasileira é ainda muito tímido quando avaliado nossa biodiversidade e o número de produtos comercializados desenvolvidos com tecnologia genuinamente brasileira. Apenas seis fitoterápicos são produzidos a partir de plantas nativas brasileiras levando a conclusão de que os fitomedicamentos produzidos no país derivados de metabólitos secundários é praticamente inexistente (ANVISA Brasil 2008). Esses dados ressaltam a importância da pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos e fitoterápicos para o preenchimento desta lacuna na indústria farmacêutica nacional. Diante desses dados, um país como o Brasil que detém grande parte da biodiversidade mundial, poderá beneficiar-se desse patrimônio se programas de uso racional da nossa flora, forem dirigidos para a pesquisa multidisciplinar colaborativa objetivando a descoberta de fármacos potenciais extraídos da nossa biodiversidade. Neste sentido, o desenvolvimento de metodologias analíticas que acelerem o processo de isolamento e identificação de substâncias biologicamente ativas em uma matriz natural complexa, é de fundamental importância para sua rápida caracterização, seja na indústria ou pelo isolamento das substâncias bioativas com estrutura inédita, de interesse para a pesquisa em produtos naturais e descoberta de protótipos de fármacos ou fitoterápicos.

1.1 APLICAÇÃO DE TÉCNICAS HIFENADAS NA ABORDAGEM DE MATRIZES NATURAIS COMPLEXAS.

A quimiotaxonomia associada aos processos cromatográficos (CCD, CLAE, CG) e às técnicas espectroscópicas (UV, IV, EM, RMN ^1H e ^{13}C) estão sendo aplicadas sistematicamente na pesquisa de isolamento e identificação de produtos naturais. Essas associações resultaram no isolamento e identificação de milhares de substâncias de plantas, fungos, algas marinhas entre outras fontes naturais. Atualmente, devido ao grande número de substâncias conhecidas e extraídas destas fontes, tornou-se importante, também, pesquisar a possibilidade de novas ferramentas de prospecção para isolamento e identificação de novas substâncias ou de produtos bioativos (LANG, et al. 2008)

O uso do termo técnicas hifenadas tornou-se popular na química analítica durante os anos 80, quando os instrumentos desenvolvidos para separação de componentes de uma mistura, foram acoplados com aqueles usados na elucidação estrutural de compostos orgânicos. Esse termo tem sido mais frequentemente aplicado ao acoplamento da espectrometria de massas (EM) à cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC), e à combinação da cromatografia líquida com a ressonância magnética nuclear, CLAE-RMN (KITE et al., 2003). A figura 2 ilustra os procedimentos mais usuais de uso dos sistemas hifenados.

O impacto destas técnicas na evolução da química analítica tem sido considerável e bastante útil, permitindo ao analista obter informações estruturais precisas de substâncias presentes em misturas complexas. Em muitos casos essas informações podem ser suficientes para a identificação de novas substâncias ou, como no caso do CLAE-RMN, toda a elucidação estrutural de uma substância desconhecida, torna-se potencialmente possível. (STOBIECKI, 2001).

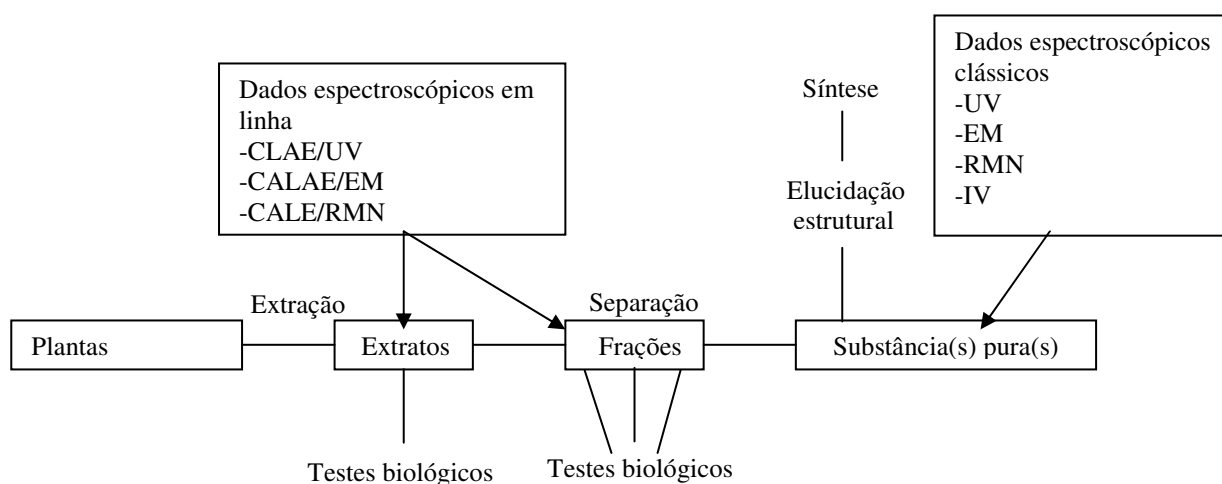


Figura 2- Procedimento para obtenção dos princípios ativos de plantas auxiliado por técnicas hífenadas

Um extrato vegetal bruto, seja obtido por percolação ou por decocção, usando solventes inorgânicos (água) ou orgânicos (polares ou apolares), em geral são matrizes complexas contendo muitos metabólitos secundários. Por isso, uma eficiente separação, detecção e rápida caracterização, têm papel fundamental na pesquisa de produtos biologicamente ativos, nesse sentido, uma eficiente triagem dos extratos é alcançada através do monitoramento biológico e químico das matrizes analisadas auxiliado por técnicas hífenadas.

Assim, a utilização de técnicas hífenadas, é uma ferramenta útil, pois pode fornecer numerosas informações estruturais sobre os metabólitos, antes mesmo do seu isolamento. A técnica de separação acoplada a um detector espectrométrico, como por exemplo, CLAE-EM, constitui uma das principais ferramentas utilizadas no estudo de plantas medicinais, onde a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida estão entre esses métodos de separação acoplados ao detector espectrométrico. (ESPADA et. al, 2008).

O emprego das primeiras técnicas acopladas à cromatografia líquida de alta eficiência abriu a possibilidade do uso de outros sistemas de detecção, como ultravioleta, eletroquímico e de fluorescência entre outras técnicas. Nenhum desses

sistemas pode ser considerado universal, mas, possibilitam a realização de análise de matrizes não voláteis simples e de alto peso molecular.

Em todas as técnicas de separação existem limitações para a sua aplicação, na cromatografia líquida de alta eficiência que opera com detector UV/VIS, a limitação da detecção de algumas substâncias pode ser atribuída à presença de cromóforos, (comumente encontrados em produtos naturais) na faixa de aplicação selecionada para esse detector. Essa limitação foi facilitada pelo desenvolvimento do detector de arranjo de diodo (DAD) realizando uma varredura que se estende de 200-800 nm. O baixo preço deste equipamento em relação a outras técnicas foi à principal alavanca para seu sucesso, contudo, a necessidade de maiores informações sobre as estruturas moleculares de cada componente das matrizes analisadas levou ao desenvolvimento de técnicas hífenadas mais modernas, como o acoplamento da CLAE com o espectrômetro de massas e com a ressonância magnética nuclear (PINTO et al, 2002).

Para a análise de produtos naturais, as interfaces mais utilizadas em CLAE/EM são: a ionização química a pressão atmosférica (IQPA), *electrospray* (IES) e *termospray* (TSP). No Brasil, a maioria dos instrumentos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa (CLAE-EM) possui interface *electrospray* como fonte geradora de íons (Figura 3). Por se tratar de ionização branda, nos espectros de massas utilizando esta interface, são observados os íons precursores. Esse fato é extremamente importante para a determinação da massa molecular de um analito (ESPADA, et al. 2008; RODY, et al. 2007).

A Figura 3 abaixo ilustra uma representação esquemática de uma fonte de *electrospray* acoplado ao espectrômetro de massa.

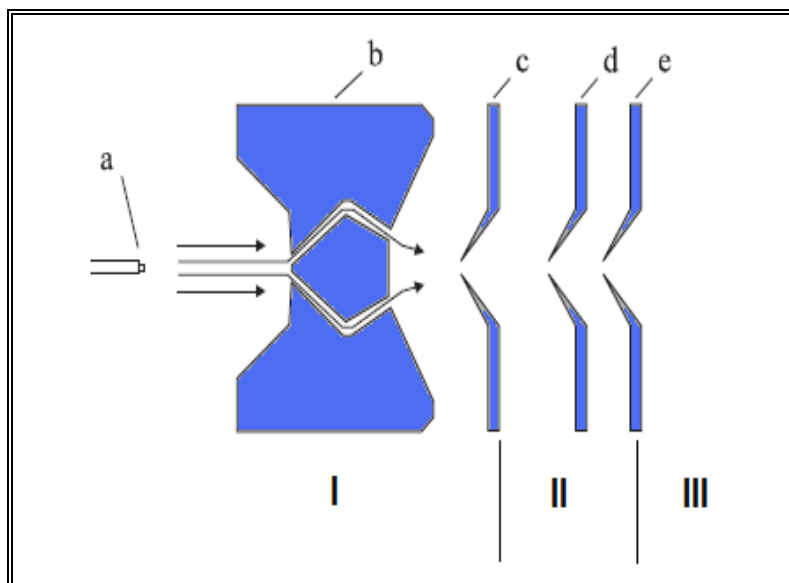


Figura 3- Representação esquemática da interface *electrospray*.

a) capilar, **b)** contra-eletrodo, **c)** cone de amostragem, **d)** skimmer e, **e)** lentes do skimmer.

Nas análises de compostos polares, presentes em extratos vegetais, as hifenações envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa são as mais utilizadas, principalmente configurada para experimentos *tandem*, CLAE-EM/EM.

As metodologias hifenadas baseadas no uso das técnicas de CLAE-EM e CLAE-EM/EM são sensíveis e fornecem informações substanciais, as quais, quando contrastadas com os principais bancos de dados de substâncias orgânicas como *AntiBase*, *Dictionary of Natural Products* e *MarinLit*, tornam-se uma ferramenta de grande valia, tanto no processo de identificação de novas substâncias como no mapeamento metabolômico de determinadas espécies (BUGNI et al. 2008).

Por outro lado, a geração de dados oriundos dessas técnicas pode conduzir a incerteza nas análises espectrométricas de identificação de compostos. Isto pode ocorrer devido a incerteza quanto aos íons precursores registrados nos espectros de massas, facilmente atribuído a determinados adutos ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+CH_4CN]^+$), ou ainda, devido a presença de íons minoritários interferentes gerados a partir de componentes menores que ionizam-se mais facilmente do que o componente de interesse, levando a uma identificação incorreta dos constituintes presentes na matriz analisada (NIELSEN e SMEDSGAARD, 2003).

Desta forma o emprego da CLAE-EM-EM não somente permite o registro de formação de fragmentos de estrutura específica, mas também reduz a interferência da coeluição de compostos. A tendência futura é de que novas técnicas hífenadas deverão surgir devido às necessidades de agilização em análises de material biológico como também devido aos avanços tecnológicos, permitindo acoplamentos de técnicas mais sofisticadas, através de interfaces modernas e otimizadas, aliando métodos de separação altamente eficientes e de amplo domínio, como a cromatografia, com um ou mais detectores espectroscópicos e/ou espectrométricos.

Avanços nesse sentido vêm sendo observados desde 2003, onde a combinação de todas essas técnicas numa única etapa é possível e, a criação de um “equipamento de análise única” foi demonstrada no caso de análises *on-line* utilizando CLAE-DAD-IV-RMN-EM. O acoplamento de todas essas técnicas, entretanto, não é fácil de ser aplicado devido à diversidade das condições de operação de cada técnica isoladamente e, devido aos custos operacionais dispendiosos dos equipamentos e dos solventes utilizados nas técnicas de CLAE e principalmente de RMN. (WOLFENDER et. al., 2003).

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Lauraceae

A família Lauraceae é constituída de aproximadamente 2.500 espécies vegetais divididas em cerca de 50 gêneros, distribuídas através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, conforme Figura-4 apresentada abaixo (JUDD et al., 1999). No Brasil, ocorrem 22 gêneros, frequentemente encontrados em florestas pluviais, restingas e áreas de cerrado (BARROSO, 2002).

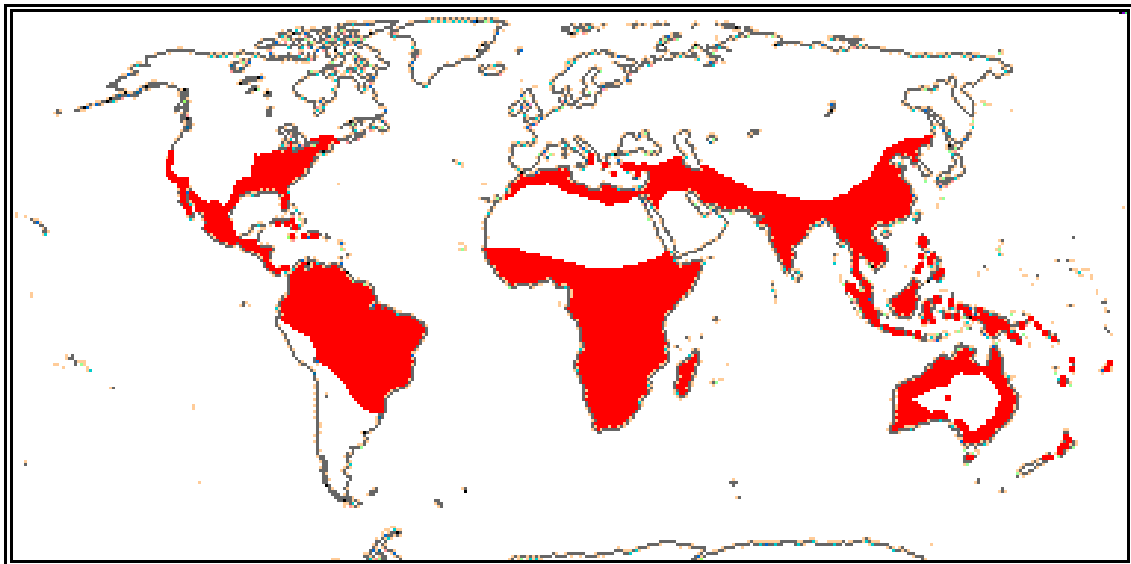


Figura 4- Distribuição geográfica mundial das espécies vegetais pertencentes à família Lauraceae. (Fonte: <http://www.arbolesornamentales.com/familias.htm>)

Economicamente, a família Lauraceae é considerada uma das mais importantes dentre as espécies encontrada nas florestas equatoriais e tropicais, em virtude da boa qualidade da madeira utilizada na fabricação de papel (celulose), marcenaria (móveis), construção civil (pranchas de madeiras / escoras); do alto valor comercial dos seus óleos essenciais, usados nas indústrias farmacêuticas, de cosmético, de perfumarias e também na culinária como condimentos e odoríferos. Muitas espécies também fornecem resinas e óleos essenciais, úteis na medicina popular (MARQUES, 2001; QUINET et al, 2002).

1.2.2. *Ocotea*

O gênero *Ocotea* pertencente à família Lauraceae, possui 350 espécies, a maioria difundida na América tropical e subtropical. Estima-se que o Brasil abriga cerca de 120 a 160 espécies vegetais deste gênero, contudo, muitas destas espécies estão ameaçadas de extinção, pois, além do desmatamento, as espécies deste gênero não possuem constância na frutificação, fato que dificulta sua propagação (MORAES, 2005). A figura 5 ilustra o registro fotográfico de quatro espécies pertencentes a esse gênero.

O gênero *Ocotea* também desperta interesse científico e tecnológico devido às inúmeras atividades farmacológicas atribuídas as lignanas e alcalóides acumulados em espécies desse gênero, distribuídas no território nacional. Dentre as atividades farmacológicas já encontradas em algumas espécies do gênero *Ocotea*, destacam-se, antibacteriana, antifúngica (SOUZA et al., 2004), antiinflamatória (ZSCHOCKE, et al., 2000), antialérgica (SERRA et al., 1997) entre outras.

A espécie *O. paranapiacabensis* é uma árvore de aproximadamente 17 metros nativa da Mata Atlântica e cerrado, conhecida popularmente como “canela-gosmenta”. Não há relatos bibliográficos sobre o estudo fitoquímico desta espécie.



O. bullata



O.lancifolia



O. catharinensis

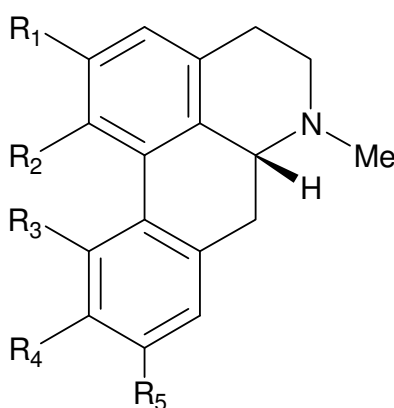


O. odorífera

Figura 5- Registro fotográfico de quatro espécies do gênero *Ocotea* pertencentes a família Lauraceae (Fonte: LORENZI, 1992)

Quimicamente este gênero caracteriza-se por apresentar, em sua composição, metabólitos secundários, como alcalóides isoquinolínicos, indólicos e aporfínicos; lignanas, neolignanas, arilpropanoides além de uma grande variedade de sesquiterpenos, componentes principais de óleos essenciais muito característicos desse gênero (BUDEL et al., 2004; DIAS, 2003; BARBOSA et al., 1999; GARCEZ et al., 2004). Vários alcalóides aporfinóides (Figura 6) comumente encontrados neste gênero apresentam propriedades farmacológicas, como a nantenina (bloqueador de contração muscular) (RIBEIRO et al., 2003), derivados da nantenina (antagonista α 1-adrenoreceptor) (INDRA et al., 2002), coclaurina (anti-HIV) (KASHIWADA et al.,

2005), glaucina (citotóxica) (HOET et al., 2004), derivados halogenados da predicentrina (aumento da afinidade aos receptores dopaminérgicos D1) (ASENCIO et al., 2005), dicentrina (inibição da topoisomerase II12, atividade antineoplásica) (HUANG et al., 1998), dicentrinona (inibição da topoisomerase I) (ZHOU et al., 2000). Vários alcalóides pertencentes à classe dos aporfínóides, tem sido alvo de patentes, o que tem acarretado um grande interesse na identificação e caracterização de novas substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos (ZANIN E LORDELLO, 2007)



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
ALCALOÍDES					
1	OH	OCH ₃	H	H	H
2	OCH ₃	OH	H	H	H
3	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
4	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	H
5	OCH ₂ O		H	OCH ₃	OCH ₃

Figura 6- Alcalóides aporfínóides isolados de espécies vegetais do gênero *Ocotea* da família Lauraceae.

1.2.3. Aniba

O gênero *Aniba* também pertencente a família Lauraceae, é constituído por 41 espécies neotropicais, das quais 27 estão difundidas em território brasileiro (MABBERLEY, 1990). Uma das espécies mais conhecidas deste gênero é *Aniba rosaeodora* ou pau-rosa, como é conhecida popularmente, (Figura 7). Desta espécie é extraído o linalol, substância usada como fixador de perfumes, o que levou a espécie *A. roseadora*, a quase total extinção. Nos dias atuais, essa espécie é cultivada em vários locais ao redor do país.



Figura 7- Registro fotográfico da espécie *Aniba rosaeodora* (pau-rosa)
(Fonte: <http://www.feminamedicus.com/images/rosewood.jpg>)

Existem relatos na literatura que o óleo essencial das espécies deste gênero apresenta atividade antifúngica, antibacteriana, antimicrobiana e relaxante muscular (CASTELO BRANCO et., 1991; MORAES, 2005). Dentre as substâncias descritas neste gênero pode-se citar alcalóides, neolignanas, flavonóides e especialmente pironas (KLAUSMEYER et al., 2004). Alguns desses constituintes isolados em espécies do gênero *Aniba*, estão ilustrados na figura 8.

A espécie *A. firmula*, nome popular louro-rosa (importância econômica da família Lauraceae), possui relatos bibliográficos datados da década de 60, onde foi estudada pelos pesquisadores O. Gottlieb e W. Mors, sobre o ponto de vista da constituição dos componentes químicos dos seus óleos essenciais e o estudo do isolamento de algumas estirilpironas.

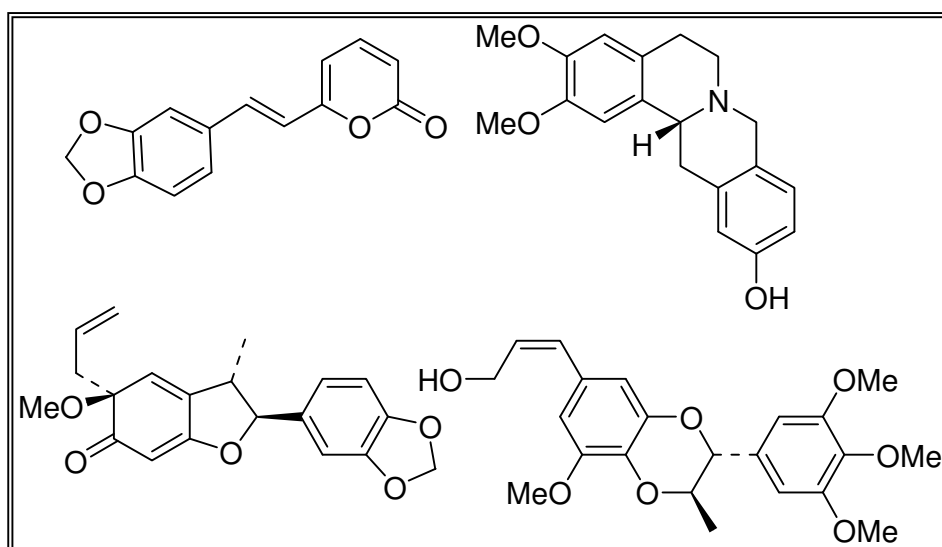


Figura 8- Constituintes químicos isolados a partir de espécies do gênero *Aniba* (família Lauraceae)

2. OBJETIVOS

1. - Aplicação de técnicas cromatográficas para a identificação, seleção e isolamento de metabólitos secundários de fontes naturais;
2. - Obtenção dos perfis metabólicos de *O. paranapiacabensis* e *A. firmula* por uma abordagem racional a partir do planejamento experimental, seleção, purificação e elucidação estrutural de micromoléculas com potencial atividade antioxidante.
3. - Fortalecimento da base de dados químicas e de espécies do grupo de pesquisa, NuBBE.

3. EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTOS

As análises cromatográficas realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em um cromatógrafo da marca Shimadzu Prominence, compostos pelos seguintes módulos

- a) degaseificador DGU-20A₅ (Prominence);
- b) duas bombas LC – 6AD;
- c) controlador CBM – 20A (Prominence);
- d) auto-injetor SIL-10AF;
- e) detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A (Prominence).

As análises com a técnica cromatográfica hifenada CLAE-DAD-IES-EM, foram realizadas em um sistema de CLAE modelo LC-20AD (Prominence) acoplado a um detector de arranjo de diodo (DAD). Os experimentos e medidas de espectrometria de massa de alta resolução foram feitos em um instrumento equipado com uma interface eletrospray (IES) como fonte de íons e analisador quadrupolo-*time of flight* (UltrOTOF-Q, Bruker Daltonics, Billerica, MA). Os parâmetros foram otimizados para a máxima transmissão de íons.

O Espectrofotômetro equipado com leitor de placas Synergy-HTS (Bio-Tek Instruments, INC. EUA), foi utilizado no ensaio de atividade antioxidante, DPPH.

Os experimentos de RMN foram realizados no Laboratório Multiusuário sob a coordenação do Dr. Nivaldo Borali. Os espectros foram registrados em espectrômetro Varian Inova 500 MHz, onde foram utilizados solventes deuterados das marcas MERCK e ALDRICH. Foram obtidos espectros unidimensionais (¹H e ¹³C) e bidimensionais (*g*HMQC; *g*HMBC e *g*COSY)

3.2 MATERIAIS

3.2.1 Solventes

Os solventes utilizados para os processos de análise e fracionamento de extratos vegetais foram: etanol, metanol, acetonitrila, *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol; todos da marca Merck (p.a) e/ou da Mallinckrodt. (p.a. e grau HPLC).

Durante as análises com CLAE, foi utilizada como fase móvel uma mistura de solventes: Bomba A água ultra pura com 0,1% de ácido fórmico; Bomba B: metanol grau HPLC, distribuída de forma a se obter um gradiente exploratório para cada fração analisada, garantido a eluição de todos os constituintes presentes nas frações analisadas.

3.2.2 Suporte Cromatográfico

Durante as análises com cromatografia líquida a pressão reduzida (CLPR) foi utilizada sílica-gel 60H (230-400 μ), (Merck), como fase estacionária. Nas análises por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (analítico) e CLAE-DAD-IES-MS, foram empregadas colunas cromatográficas monolíticas Phenomenex Onyx monolítica, ODS, 100 x 4,60 mm. Durante a análise preparativa foi utilizada coluna Sinergi 4 μ Hydro-RP 80A, com dimensões 250 x 21.20 mm 4 micron.

3.2.3 Amostras dos vegetais

A amostra de *Ocotea paranapiacabensis* foi coletada na reserva biológica do alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André - SP, em 20 de Março de 2007. A identificação foi realizada pela botânica Inês Cordeiro do Instituto de Botânica de

São Paulo, São Paulo - SP. O material testemunha, coletor R. A. Matos 33, está depositado na coleção do Herbário Maria Eneida P. K. Fidalgo (SP).

A mostra de *Aniba firmula* foi Coletada na Reserva Florestal Fazenda São Sebastião do Ribeirão Grande, Município de Pindamonhangaba - SP, em 14 de Agosto de 2007. A identificação foi realizada pela botânica Suely A. Nicolau do Centro de Monitoramento Ambiental da Serra do Itapety (CEMASI), Pindamonhangaba, SP. O material testemunha, coletor A. L. Nascimento 65, está depositado na coleção do Herbário Maria Eneida P. K. Fidalgo (SP).

3.2.4 Reagentes utilizados para avaliação da atividade antioxidante

- *DPPH* (2,2-difenil-1-picrilidrazina): 4,00 mg de DPPH (Sigma-Aldrich, Alemanha) foram dissolvidos em MeOH (grau HPLC) utilizando um balão de 25 mL. A solução foi guardada em um lugar ao abrigo da luz.

- 1,0 mg de rutina (Sigma-Aldrich, Alemanha), foi dissolvida em 1,0 mL de MeOH em um recipiente Ependdorff™.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Preparação dos extratos de *Ocotea paranapiacabensis*

As folhas e galhos (separadamente) de *O. paranapiacabensis* (Lauraceae) secas em estufas com temperatura controlada (50 °C), foram trituradas em liquidificador com etanol 90%, em seguida submetidas a extração ultrassônica por 1 hora na temperatura ambiente (32 °C). Após este processo de extração, o extrato resultante foi filtrado utilizando papel de filtro, e este filtrado foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida na temperatura de 40 °C.

3.3.2 Preparação dos extratos de *Aniba firmula*

As folhas e galhos de *A. firmula* (Lauraceae) secas em estufas com temperatura controlada (50 °C) e trituradas em liquidificador com etanol 90% foi, em seguida submetidas a extração ultrassônica por 1 hora na temperatura ambiente (32 °C). Em seguida, o extrato foi filtrado a vácuo em funil de Büchner e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, na temperatura de 40 °C.

3.3.3 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido aplicada aos órgãos estudados de *A. firmula* e *O. paranapiacabensis*, separadamente está descrita na Figura 9.

A massa de 20,0 g do extrato hidroalcoólico foi suspensa em uma solução de MeOH:H₂O (8:2) e em seguida transferida para um funil de separação. Esta solução foi extraída três vezes com hexano. A fase hidroalcoólica resultante, foi adicionada água suficiente para tornar a solução 40% de MeOH. Esta nova fase foi submetida a extração três vezes com acetato de etila. A fase hidroalcoólica foi concentrada em evaporador rotatório, para a eliminação do metanol e em seguida submetida a extração com *n*-butanol por três vezes. Após separação e coleta das fases

orgânicas, estas foram concentradas a pressão reduzida. As frações de partição líquido-líquido foram designadas conforme as tabelas abaixo:

Tabela 1- Relação das frações de partição líquido-líquido, obtidas a partir de folhas e galhos de *O. paranapiacabensis* (Lauraceae)

Órgão	Designação das frações de partição líquido-líquido			
	hexânica	AcOEt	<i>n</i> -BuOH	aquosa
Folhas	OPFHEx	OPFAc	OPFBu	OPFaq
Galhos	OPGHex	OPGAc	OPGBu	OPGaq

Tabela 2- Relação das frações de partição líquido-líquido, obtidas a partir de folhas *A. firmula* (Lauraceae)

Órgão	Designação das frações de partição líquido-líquido			
	hexânica	AcOEt	<i>n</i> -BuOH	aquosa
Folhas	AFFHEx	AFFAc	AFFBu	AFFaQ

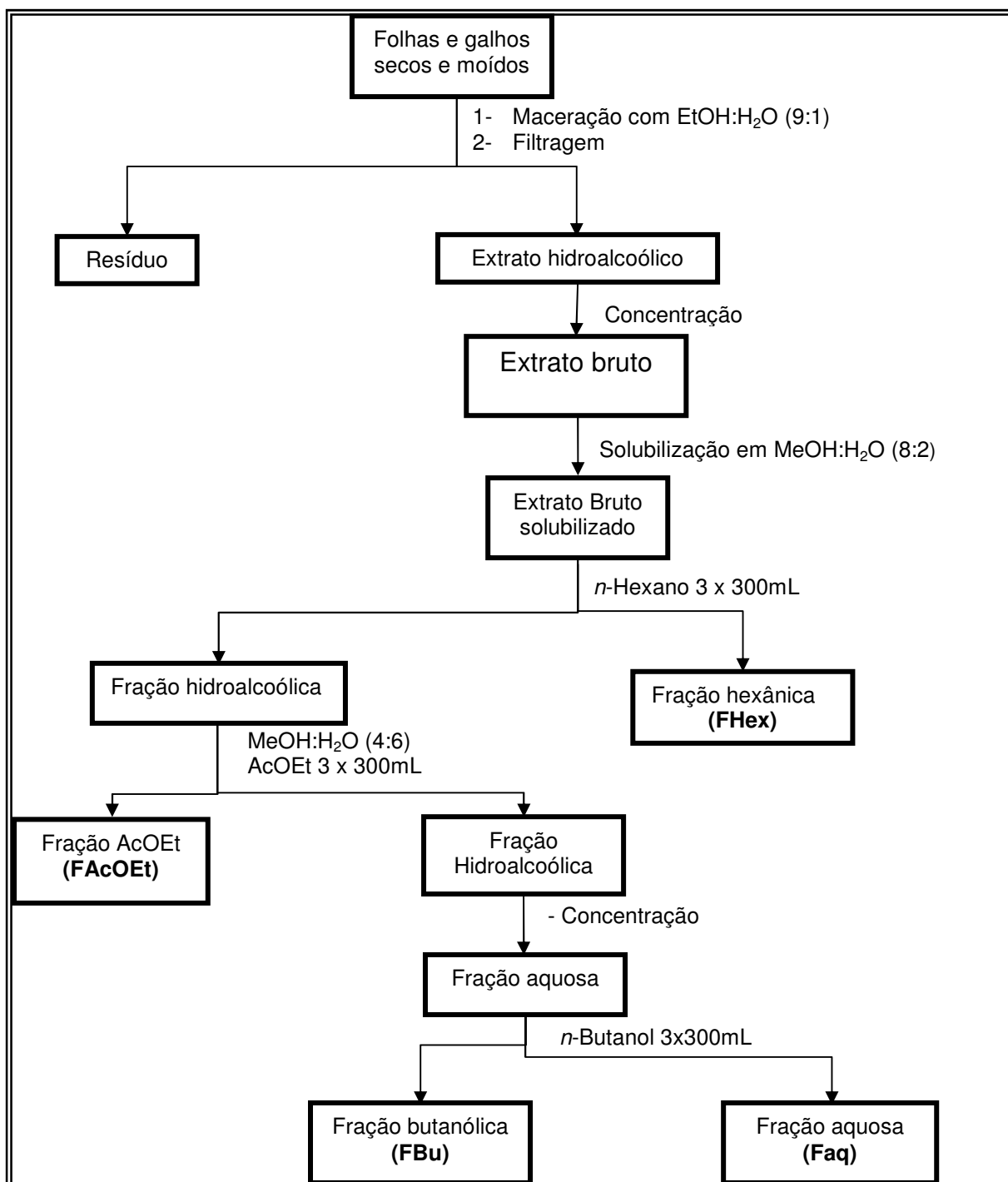


Figura 9 – Esquema da partição líquido-líquido dos extratos hidroalcoólicos das folhas e galhos de *O. paranapiacabensis*, separadamente, e folhas de *A. firmula*.

3.3.4 Procedimento para obtenção dos perfis cromatográficos utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foi utilizada a técnica de CLAE-DAD, com o intuito de se obter os perfis cromatográficos (*Fingerprints*) dos extratos hidroalcoólicos das folhas e dos galhos de *O. paranapiacabensis* e dos extratos hidroalcoólicos das folhas e de *A. firmula* e das frações oriundas das etapas de extração líquido-líquido, conforme a Figura 10 apresentada abaixo.

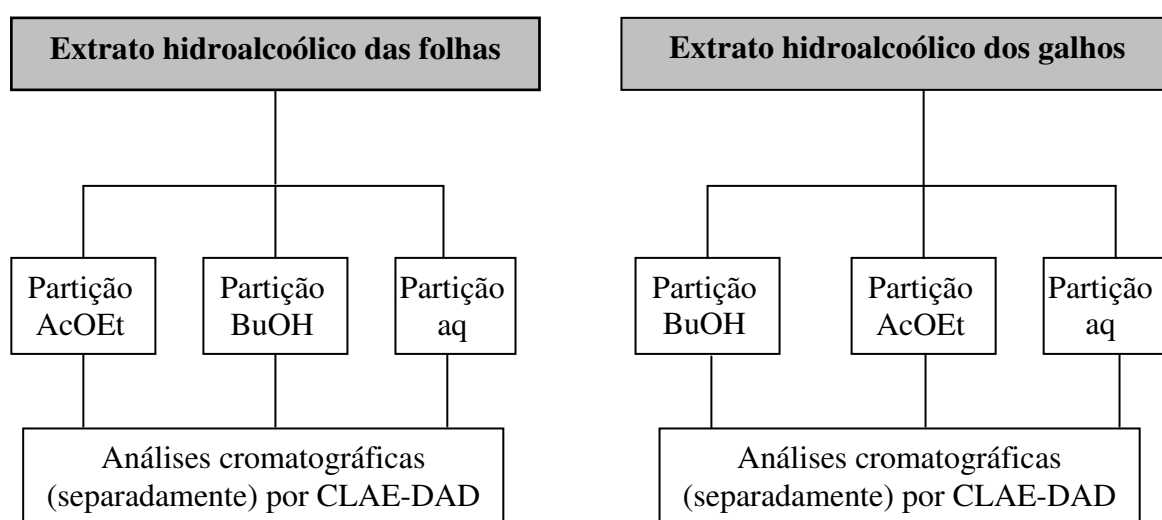


Figura 10 - Procedimento experimental de separação e análise através de CLAE-DAD dos extratos das folhas e dos galhos de *O. paranapiacabensis*, das folhas *A. firmula* e suas respectivas frações de partição líquido-líquido.

3.3.5 Pesquisa para a obtenção dos perfis cromatográficos

Durante as análises cromatográficas (CLAE) as frações foram submetidas a diferentes sistemas de eluentes. A otimização da resolução cromatográfica foi realizada com o auxílio do triângulo de seletividade de Snyder (SNYDER; KIRKLAND, 1976). Com esse suporte primeiramente, otimiza-se uma condição inicial no modo gradiente, utilizando-se metanol como solvente orgânico e em

seguida, tenta-se mudar a seletividade com outro solvente que interaja de forma diferente com a fase estacionária e/ou com o analito. Utilizou-se ACN e THF, nas proporções que mantivessem a força de eluição da fase móvel, otimizada inicialmente com MeOH. Assim precedendo, após os testes com diferentes eluentes, pode-se concluir que a melhor resolução entre os picos dos cromatogramas foram obtidos utilizando MeOH como solvente na fase móvel.

A vazão utilizada em cada análise foi de 3,0 mL/min. As amostras foram preparadas diluindo-se 10,0 mg de resíduo seco em 1,0 mL de metanol-água ultra pura, distribuídas na proporção da condição inicial da análise por CLAE, seguidas de filtração em membrana PTFE (Sartorius AG, Alemanha) com porosidade de 0,20 µm. Os volumes injetados das amostras foram de 20 µL e os cromatogramas foram observados em 254 nm com detector de arranjo de diodos (DAD).

Na análise das frações de partição líquido-líquido das folhas de *O. paranapiacabensis*, foi utilizado um sistema de solventes em modo gradiente, iniciando com: 5% de metanol (Bomba B) e 95% água:ácido fórmico (99,9:0,1) (Bomba A) como condição inicial, permanecendo por 5 minutos nessa proporção; 5-18 minutos, 5-30% B; 18-23 minutos, 30-100% B permanecendo por 3 minutos em 100% de metanol para garantir a total eluição dos constituintes das frações analisadas; 24-27 minutos, retorno a condição inicial de 5% de B; 27-30 minutos permanecendo em 5% de B para o reequilíbrio da coluna.

A análise das frações de partição líquido-líquido dos galhos de *O. paranapiacabensis* foi realizada em modo gradiente iniciando com 15% metanol (Bomba B), permanecendo nesta proporção por 10 minutos, 15-20% B; 10-20 minutos, 20-50% B; 20-25 minutos, 50-100% B; 25-27 minutos, 100-15% B e 27-30 minutos 15% B para o condicionamento da coluna.

As subfrações de OPFAc, obtidas a partir de cromatografia líquida a pressão reduzida, foram submetidas a análise por CLAE, utilizado as mesmas condições cromatográficas, da fração de partição OPFAc. A partir deste tratamento, selecionou-se a fração F3 que foi novamente analisada, sendo desenvolvido um novo método de análise cromatográfica. Este novo método em modo gradiente, inicia-se com 30-80% de metanol (bomba B) durante 20 min; 80-100% B 20-25 min,

100-30% B 25-27 min; mantendo-se na condição inicial por 3 minutos para o condicionamento da coluna.

As frações de partição líquido-líquido de AFFAc foram submetidas a seguinte condição cromatográfica em modo gradiente: 5-50% de metanol (bomba B) em 15 min; 50-80% B 15-29 min; 80-100% 29-32 min, mantendo-se em 100% B por 3 minutos garantindo a total eluição dos constituintes presentes nas frações analisadas.

3.3.6 Detecção *in silico* dos constituintes majoritários

As condições cromatográficas utilizando a técnica CLAE-DAD nos gradientes exploratórios foram otimizadas em um sistema CLAE-DAD-IES-EM, fazendo uso da interface electrospray como fonte geradora de íons. As análises das massas de alta resolução foram realizadas com o programa Bruker Data Analysis, obtidas dos respectivos fragmentogramas. As análises após serem contrastadas com os dados presentes no Dicionário de Produtos Naturais (DNP) (<http://www.chemnetbase.com>), permitiram a detecção de alguns metabólitos secundários, característicos dos gêneros *Ocotea* e *Aniba*. Para tornar mais seletivo o leque de possibilidades de identificações preliminares, foi consultada a base de dados do DNP, para cada íon majoritário, utilizando uma varredura apenas para as moléculas previamente isoladas nos gêneros *Ocotea* e *Aniba* (Lauraceae). Através deste procedimento analítico e estudo dos fragmentogramas das frações analisadas através da técnica hifenada CLAE-DAD-IES-EM, pode-se propor a presença de algumas substâncias previamente isoladas nas espécies vegetais estudadas.

3.3.7 Teste antioxidante preliminar com o reagente DPPH.

Cerca de 200 µL de uma solução 101,4 µM de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina) foram adicionados as amostras das frações de partição líquido-líquido de *O. paranapiacabensis* e *A. firmula*, diluídas em MeOH (grau HPLC), nas concentrações de 0,2; 0,1; 0,03; 0,02; 0,01; 0,008 e 0,005 mg/mL e distribuídas em poços de placas Multi-Well 96. As amostras foram preparadas em triplicata, tendo como controle positivo, uma solução de rutina (Sigma-Aldrich), nas concentrações de 100,0; 80,0; 60,0; 40,0; 20,0; 10,0 e 5,0 µM. Para o controle do ensaio, (apenas o DPPH e MeOH (grau HPLC)) foi utilizado volume de 200 µL DPPH e 100 µL de MeOH. Decorridos 30 minutos sob abrigo da luz, tomou-se a medida das absorbâncias dos poços a 517 nm, em espectrofotômetro leitor de placas acoplado a um computador. Os cálculos do percentual do radical livre foram efetuados a partir da seguinte equação:

$$\% = \frac{(A_{\text{CONTROLE-DPPH}} - A_{\text{AMOSTRA}}) * 100}{A_{\text{CONTROLE-DPPH}}}$$

Onde:

A = Absorbância

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração líquido-líquido e atividade das frações

As tabelas 3, 4 e 5 a seguir, apresentam os resultados das massas de cada uma das frações obtidas a partir dos extratos hidroalcoólicos através do emprego da metodologia de partição líquido-líquido. Na Tabela 3, estão agrupados os resultados obtidos a partir de 20,0 g do extrato hidroalcoólico das folhas *O. paranapiacabensis*; Tabela 4 apresenta os resultados obtidos a partir de 20,0 g de extrato hidroalcoólico dos galhos de *O. paranapiacabensis* e na Tabela 5 estão agrupados as massas obtidas a partir de 20,0 g de extrato hidroalcoólico das folhas de *A. firmula*.

Tabela 3- Massa das frações obtidas a partir de 20 g de extrato hidroalcoólico das folhas de *O. paranapiacabensis*

FRAÇÃO	MASSA OBTIDA (g)	% DA MASSA
OPFhex	0,97	4,9
OPFAc	1,49	7,5
OPFBu	5,17	25,9
OPFaq	11,3	56,5
MASSA TOTAL	18,9	94,8

Tabela 4 - Massa das frações obtidas a partir de 20 g de extrato hidroalcoólico dos galhos de *O. paranapiacabensis*

FRAÇÃO	MASSA OBTIDA (g)	% DA MASSA
OPGhex	2,29	11,5
OPGAc	2,31	11,6
OPGBu	8,06	40,3
OPGaq	6,14	30,7
MASSA TOTAL	18,8	94,1

Tabela 5- Massa das frações obtidas a partir de 20 g de extrato hidroalcoólico das folhas de *A. firmula*

FRAÇÃO	MASSA OBTIDA (g)	% DA MASSA
AFFHex	1,23	6,96
AFFAc	2,17	12,23
AFFBu	6,14	34,58
AFFaq	8,21	46,20
<i>total</i>	17,77	88,83

4.2 Perfis cromatográficos (CLAE) das frações oriundas de partição líquido-líquido de *O. paranapiacabensis*

Os perfis cromatográficos das frações de partição líquido-líquido dos extratos hidroalcoólicos das folhas (Figura 11) e das frações de partição dos galhos (figura 12) de *O. paranapiacabensis* estão demonstrados a seguir, onde foi utilizada a técnica de CLAE-DAD.

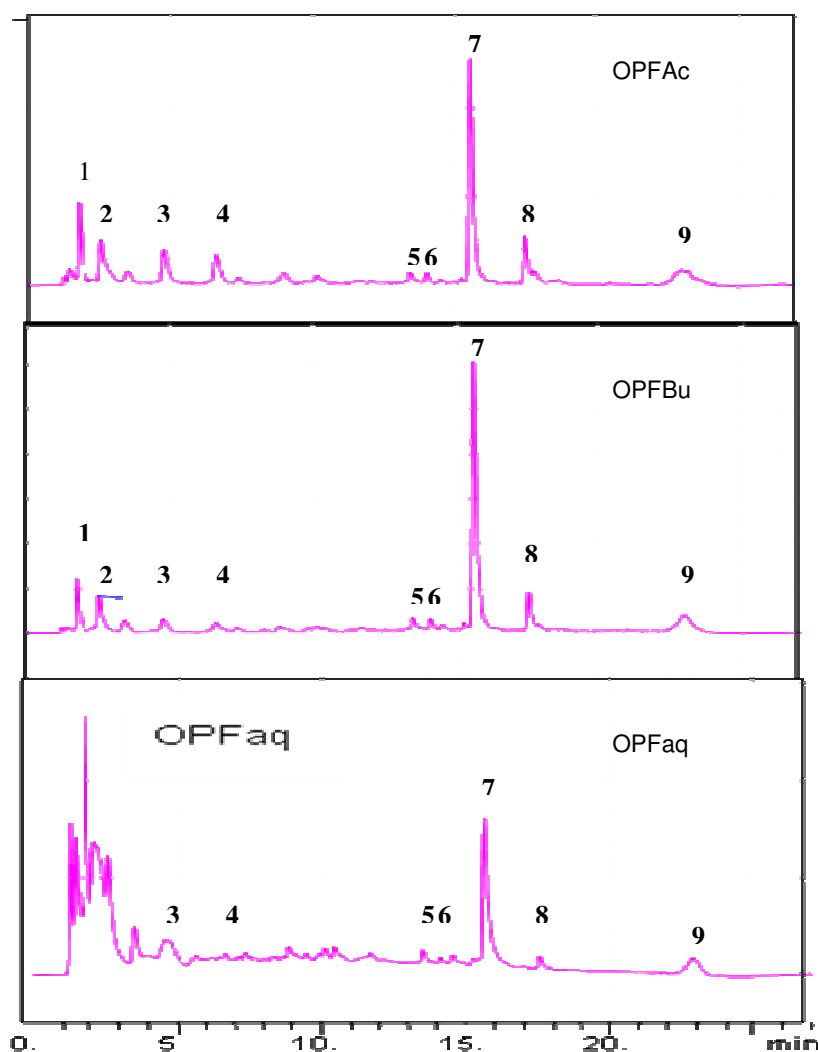


Figura 11- Perfis cromatográficos da partição acetato de etila (OPFAc), butanólica (OPFBu) e aquosa (OPFAq) do extrato hidroalcoólico das folhas de *O. paranapiacabensis*, utilizando CLAE-DAD com detector 254 nm.

Analisando os perfis cromatográficos das frações de partição oriundo do extrato hidroalcoólico das folhas de *O. paranapiacabensis* observa-se que os respectivos cromatogramas obtidos nas mesmas condições experimentais, apresentam perfis semelhantes. As bandas dos cromatogramas das partições OPFAc e OPFBu deste extrato, apresentam como mais intenso o registrado com tempo de retenção (t_R) de 15,8 min, seguidos das bandas com t_R de 1,8 e 17,0 min. Outra semelhança pode ser observada no alargamento da base da banda com t_R 22,8 min, em ambos os cromatogramas.

A relação entre a sequência de intensidade das bandas registradas nos dois cromatogramas são idênticas, ou seja, em ambos os cromatogramas as bandas número 7, 8 e 9 apresentam as mesmas sequências de intensidade o mesmo intervalo de t_R . As análises dos cromatogramas destas frações mostram que os picos número 1, 2, 3 e 4 também guardam uma distância entre bandas equivalente.

Através destes dados pode-se concluir que o perfil cromatográfico das frações de partição OPFAc e OPFBu são idênticos no que se refere a uma análise qualitativa.

A fração de partição OPFaq apresenta diferença em seu perfil cromatográfico com relação as duas outras frações analisadas OPFAc e OPFBu. Essa diferença fica facilmente visualizada no que se refere aos constituintes mais polares registrados com tempo de retenção entre 1 e 5 min. Nessa região do cromatograma de OPFaq encontra-se registrado a banda de maior intensidade (t_R 1,8 min) cercado de bandas próximas e intensas, que juntas, diferenciam-se do perfil cromatográfico de OPFAc e OPFBu

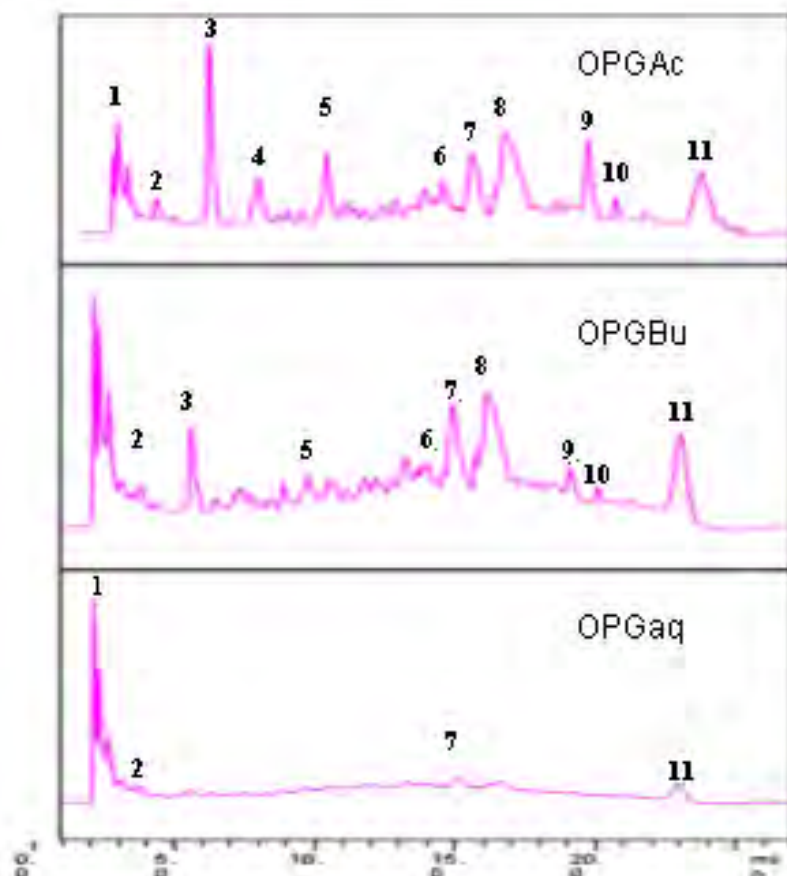


Figura 12- Perfis cromatográficos da partição acetato de etila (OPGAc), butanólica (OPGBu) e aquosa (OPGAq) do extrato hidroalcoólico dos galhos de *O. paranapiacabensis*, utilizando técnicas hífenadas CLAE-DAD com detector 254 nm.

Observando os perfis cromatográficos apresentados anteriormente na Figura 12, pode-se constatar que as frações das partições OPGAc e OPGBu apresentam um perfil semelhante. Uma análise detalhada mostra que, entre estes cromatogramas existem semelhanças consideráveis registrados para as bandas 6, 7, 8, 9, 10 e 11 com tempo de retenção 14,0; 15,0; 16,2; 19,2; 20,0 e 23,0 min, respectivamente. No cromatograma de OPGBu as bandas mais proeminentes estão registradas entre 1,0 e 5,0 minutos, por se tratar de um solvente de extração de maior polaridade em relação ao de acetato de etila utilizado na extração da fração OPFAc.

A relação entre a sequência de intensidade das bandas registradas nos cromatogramas de OPGAc e OPGBu são diferentes, ou seja, em ambos os cromatogramas as bandas 6, 7, 8, 9, 10 e 11 apresentam os mesmos intervalos de t_R , mas diferem na sequência de intensidade relativa. Por exemplo, no cromatograma de OPGAc os picos 7 e 8 são próximos da intensidade da banda 9, enquanto que, no cromatograma de OPGBu observa-se uma grande diferença entre as intensidades relativas das bandas.

A fração de partição OPGaq apresenta diferença significativa em seu perfil cromatográfico com relação as outras duas frações analisadas OPGAc e OPGBu. Essa diferença fica facilmente visualizada no que se refere aos constituintes polares registrados com tempo de retenção entre 1,0 e 5,0 min. Nesta região do cromatograma de OPGaq, encontra-se registradas as bandas de maior intensidade
(t_R 1,0 - 2,0 min) .

4.3 Perfis cromatográfico (CLAE) das frações de partição líquido-líquido de *A. firmula*

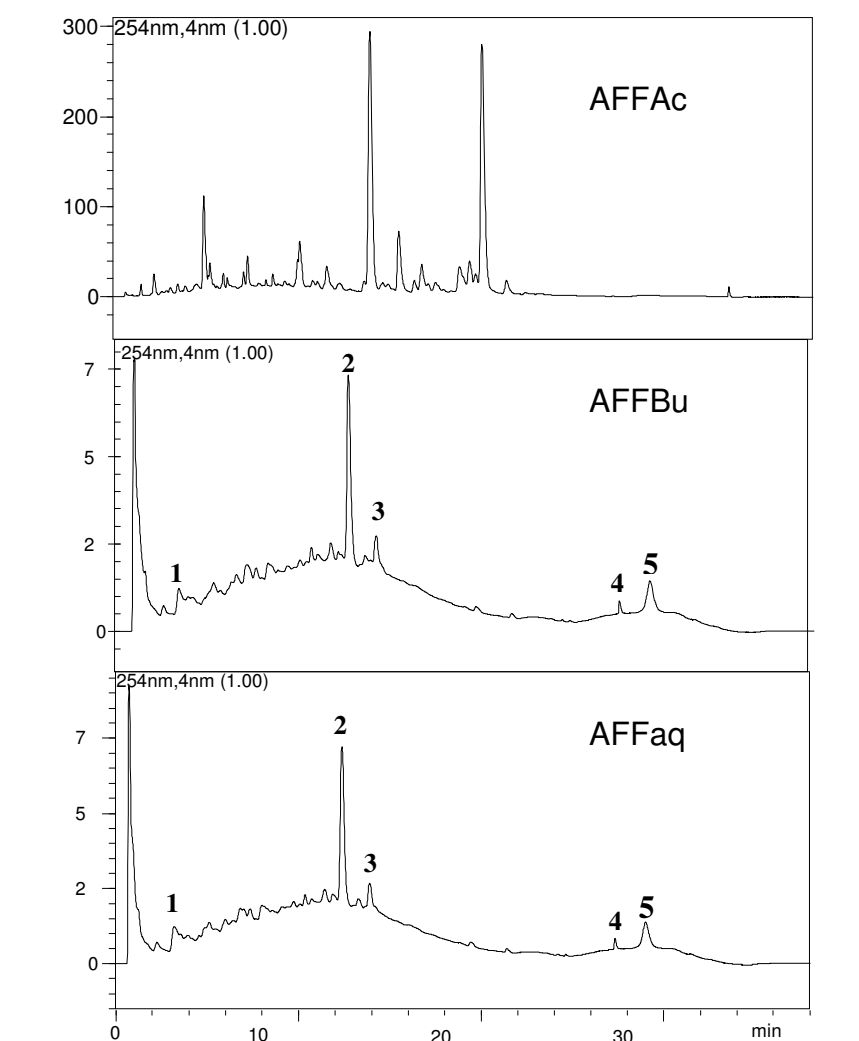


Figura 13 - Perfis cromatográficos das frações de partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. firmula* (Lauraceae)

Observando os cromatogramas na Figura 13 apresentados acima, podemos constatar que existem semelhanças entre os perfis cromatográficos das frações AFFBu e AFFaq. Este fato pode ser melhor analisado quando comparamos, nos dois cromatogramas, os tempos de retenção e as intensidades relativas dos picos 1, 2, 3, 4 e 5 com tempo de retenção de 3,0; 12,2; 14,0; 27,0 e 29,0 min, respectivamente.

A fração AFFAc possui um perfil cromatográfico diferente em relação aos cromatogramas das outras duas frações analisadas (AFFBu e AFFaq), isto deve-se ao fato dessa fração possuir mais componentes apolares em maior concentração, devido ao uso de, acetato de etila, em comparação ao solvente *n*-butanol, utilizado na extração líquido-líquido da fração AFFBu.

4.4 Análise *in silico* da fração OPFAc do extrato hidroalcoólico de *O. paranacabiabensis*

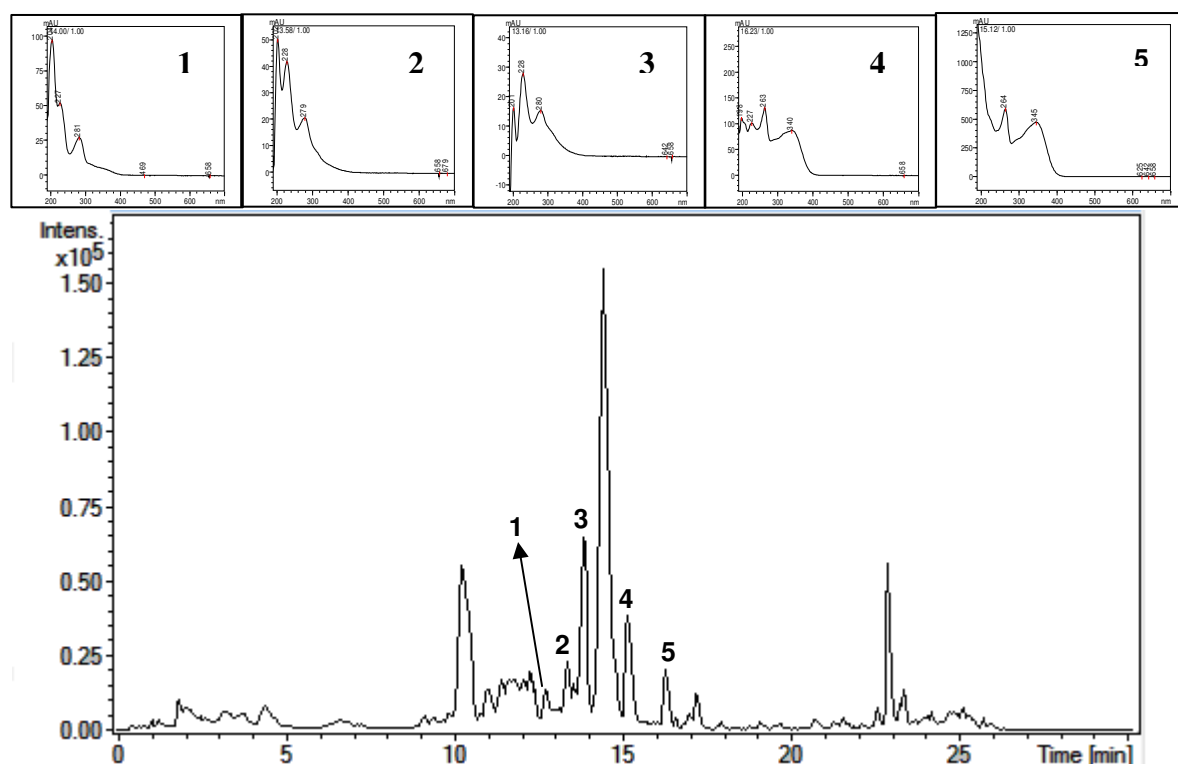


Figura 14 - TIC modo positivo da fração OPFAc obtidos a partir da técnica CLAE-DAD-IES-EM e as respectivas bandas de UV dos adutos identificados

Os dados obtidos na Figura 14, onde está representado o cromatograma de íons totais (TIC) dos componentes da fração OPFAc, obtidos a partir da técnica CLAE/DAD-IES-EM, estão resumidos na Tabela – 6, apresentada baixo. Nesta tabela pode-se observar a relação massa/carga dos adutos detectados com os respectivos tempos de retenção e os $\lambda_{\text{máx}}$ dos constituintes químicos detectados nesta fração.

Tabela 6 - Dados da relação massa/carga, tempo de retenção e UV_{MAX} dos adutos detectados a partir da técnica CLAE/DAD-IES-EM da fração OPFAc

Aduto	t_r (min)	m/z (IES pos.)	λ_{Max} (nm)
1	6,5	342,1926	227; 281
2	12,1	372,2061	228; 279
3	15,6	356,2108	228; 280
4	15,0	449,1391	264; 345
5	16,6	433,1448	263; 340

4.4.1. Detecção e análises estrutural do aduto representado pela banda 1

Na Figura 14 pode-se observar a banda 1, representativa do composto detectado como aduto $[M+H]^+$, de relação massa/carga (m/z) 342,1926. Por se tratar de uma m/z de número par (342) significa que, a sua massa molar (levando em consideração o aduto proposto) é na realidade ímpar e equivalente, portanto, a massa molecular de 341,1627 g/mol. Outro dado relevante para identificação deste aduto foi a análise do seu espectro de UV, representado por duas bandas com absorbâncias relativas em 227 e 281 nm respectivamente. Estes dados fornecem informações adicionais de que, o composto referente a banda 1, trata-se de um alcalóide com número ímpar de nitrogênios. As análises destas informações juntamente com os dados de absorbância de UV, Base de Dados do *Dictionary of Natural Products* (DNP) e comparados a composição dos constituintes das espécies do gênero *Ocotea* publicados na literatura, evidenciaram a presença deste constituinte como sendo um alcalóide tipo aporfínico.

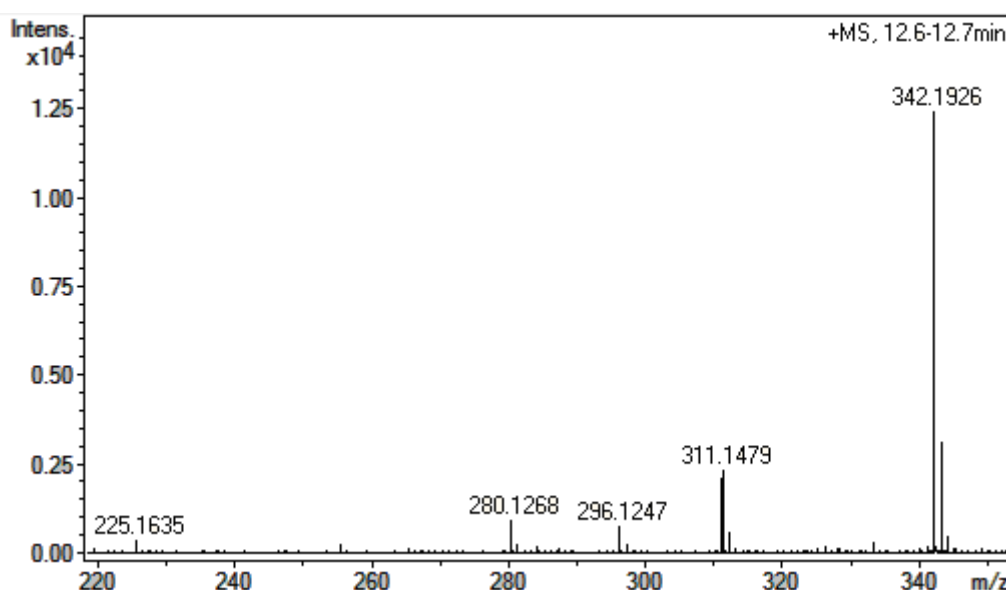
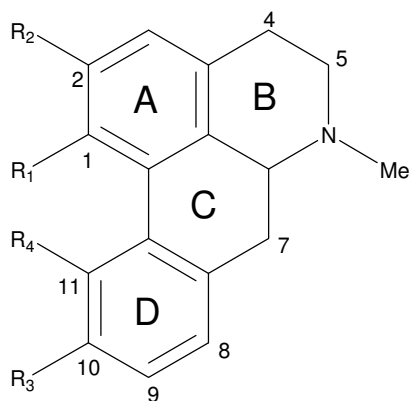


Figura 15 - Espectro de massa do composto 1, detectado com um alcalóide da classe dos aporfinóides, de peso molecular 341,1627 g/mol e fórmula $C_{20}H_{23}NO_4$.

O espectro de massa deste alcalóide (Figura 15) apresentou fragmentações características da presença de metoxilas através das perdas de massa $[M+H-31]^+$, representados pelos fragmentos m/z 311,1479 e 280,1268 e pela presença de grupo metilênico evidenciado pelo do fragmento m/z 296,1247 proveniente da quebra molecular m/z 311,1497. A análise minuciosa desses dados sugeriu que o alcalóide proposto tem fórmula molecular $C_{20}H_{23}NO_4$, e que existem três isômeros a partir da fórmula molecular proposta, previamente isolados em espécies do gênero *Ocotea*, segundo relatos bibliográfico obtidos a partir do DNP. A diferença destes três isômeros está relacionada quanto à posição dos substituintes no esqueleto do alcalóide proposto, como representado na Figura 16 a seguir. Outro fato relevante é que as estruturas isoméricas possuem uma amina terciária.



$R_1 = R_2 = R_3 = \text{OCH}_3$, $R_4 = \text{OH}$ (*O. minarium*)

$R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = R_4 = \text{OCH}_3$ (*O. sp.*)

$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OCH}_3$ (*O. porosa*)

Figura 16 - Alcalóides aporfínicos isômeros, com massa molecular 341,1627 g/mol isolados e caracterizados em espécies do gênero *Ocotea* (Lauraceae).

Levando em consideração a dificuldade de isolamento e purificação dessa classe de alcalóides, principalmente quando existem dois ou mais componentes com o mesmo esqueleto na mesma fração, devido ao mesmo comportamento cromatográfico destas substâncias, quando são fracionados por métodos usuais de cromatografia (cromatografia em coluna com sílica ou alumina, cromatografia em camada analítica ou preparativa) (SILVA et al., 2007; SIQUEIRA, et al., 2001), a técnica CLAE-DAD-IES-EM empregada na análise dessa fração de partição, foi uma alternativa eficaz na detecção, *in situ*, dos constituintes presentes na matriz complexa OPFAc.

4.4.2. Detecção e análise estrutural do adulto representado pela banda 2

A análise do espectro de massa representado na Figura – 14 (p. 37) pode-se observar a banda 2, representativo do composto detectado como aduto na forma $[\text{M}+\text{H}]^+$, de relação massa/carga 372,2061. Levando em consideração o aduto proposto, $[\text{M}+\text{H}]^+$, o constituinte identificado tem massa molecular ímpar, levando a

concluir que a substância em questão trata-se de um alcalóide, o qual possui número ímpar de átomos de nitrogênio. Estes dados juntos as informações obtidas junto a base de dados do *Dictionary of Natural Products* (DNP) e juntamente com os dados obtidos a partir da análise do espectro de UV obtido através de CLAE-DAD, evidenciaram que o constituinte detectado é um alcalóide da classe dos aporfinóides.

O espectro de massa deste alcalóide (Figura 17) apresentou fragmentações características da presença de metoxilas, através das perdas de massa $[M^+ + H - 31]$, representados pelos fragmentos m/z 341,1619; 325,1624 e 310,1399, e pela presença de grupo metilênico, evidenciado através do fragmento m/z 341,1619. A reunião destes dados sugeriram tratar-se de um alcalóide aporfínico de fórmula molecular $C_{21}H_{25}NO_5$, com 4 grupos metoxílicos e um substituinte hidroxílico, complementando o valor da massa molecular apresentado no espectro de massas.

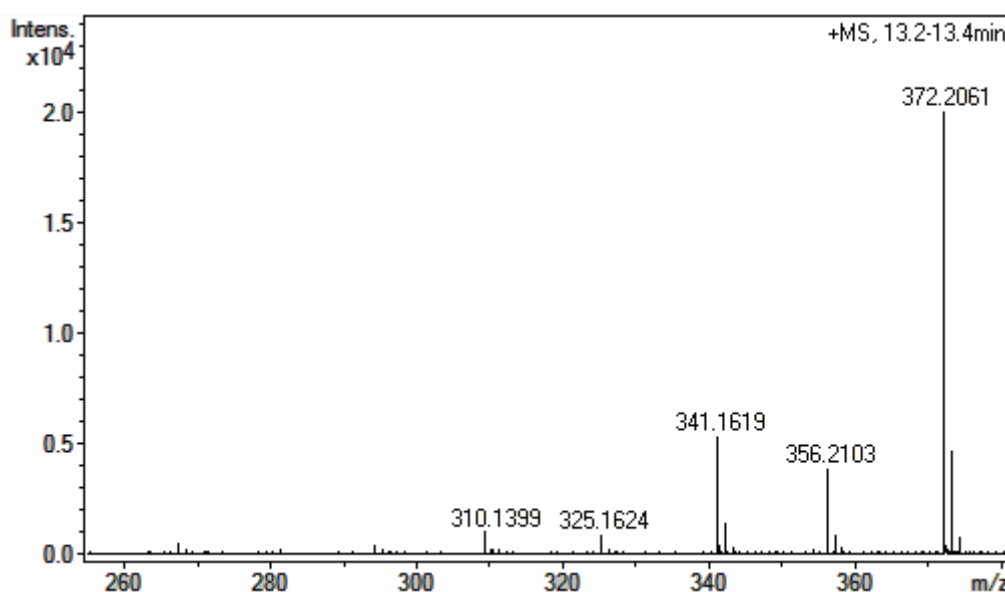
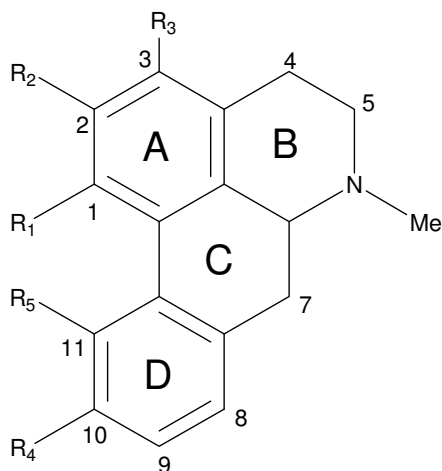


Figura 17 - Espectro de massa do composto 2 de peso molecular 371,1733 correspondente a fórmula molecular $C_{21}H_{25}NO_5$.

Segundo a base de dados consultada (DNP), em espécies do gênero *Ocotea* foram isolados três alcalóides aporfínicos com fórmula molecular idêntica a proposta para o constituinte relacionado ao pico número 2. Estes isômeros diferem apenas

quanto às respectivas posições de seus substituintes no esqueleto do alcalóide proposto, como representado na figura 18 abaixo.



$R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{OCH}_3$ (*O. minarium*)

$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{OCH}_3, R_5 = \text{OH}$ (*O. sp.*)

$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{OH}, R_4 = R_5 = \text{OCH}_3$ (*O. bucherii*)

Figura 18 - Alcalóides aporfínicos isômeros, com massa molecular 371,1733 g/mol isolados de espécies de *Ocotea* (Lauraceae).

Pelo exposto, as análises dos dados referente ao constituinte representado, no espectro de massa da fração OPFAc, pelo pico **2** (Figura 14) pode ser atribuído a qualquer um dos três isômeros com esqueleto aporfínico já isolados em espécies de *Ocotea* (Lauraceae).

4.4.3. Detecção e análise estrutural do adulto representado pela banda 3

Analisando o espectro de massa da fração de partição líquido-líquido OPFAc (Figura 14), detectou-se a banda **3**, proposta como o aduto na forma $[M+H]^+$ e de relação massa/carga 356, 2108. Por apresentar um aduto com massa par (na forma $[M+H]^+$), a massa molecular real desse constituinte é ímpar, indicando a presença de uma substância da classe dos alcalóides com número ímpar de átomos de nitrogênio.

Estes dados foram contrastados com a base de dados do *Dictionary of Natural Products* (DNP) e juntamente com os dados do espectro UV 254 nm, obtidos a partir da técnica CLAE-DAD, evidenciaram que o constituinte detectado é um alcalóide pertencente a classe dos aporfínicos.

O espectro de massa deste alcalóide (Figura 19) apresentou fragmentações características da presença de metoxilas ($[M+H-31]^+$), representados pelos fragmentos m/z 325,1655 e 294,1453, e a presença de uma metila representada pelo fragmento m/z 310,1413. O agrupamento desses dados resultou na proposta da identificação de um alcalóide aporfínico de fórmula molecular $C_{20}H_{21}NO_5$.

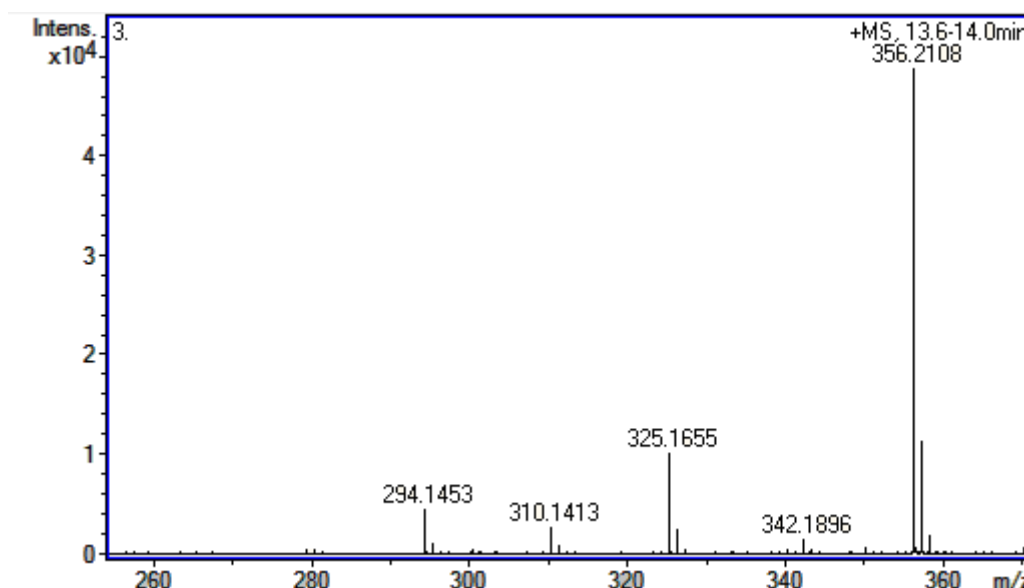
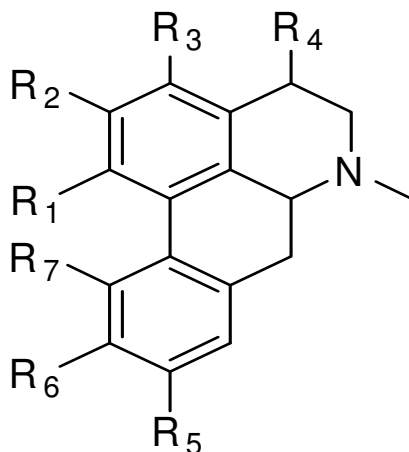


Figura 19 - Espectro de massa da substância 3, de massa molecular 355,1420 g/mol correspondente a fórmula $C_{20}H_{21}NO_5$.

No gênero *Ocotea*, são relatados três alcalóides aporfínicos possuindo a mesma fórmula molecular proposta para o constituinte químico representado pela banda **3**, de peso molecular 355,2108 g/mol, com um padrão de substituição no esqueleto dessa classe de alcalóides que difere quanto a posição dos substituintes, como pode-se observar na Figura 20 apresentada abaixo.



$R_1, R_2 = \text{OCH}_2\text{O}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OH}, R_5 = R_6 = \text{OCH}_3, R_7 = \text{H}$

$R_1, R_2 = \text{OCH}_2\text{O}, R_3 = R_4 = \text{H}, R_5 = \text{OH}, R_6 = \text{OMe}, R_7 = \text{OMe}$

$R_1, \text{OCH}_3, R_2, R_3 = \text{OCH}_2\text{O}, R_4 = R_5 = \text{H}, R_6 = R_7 = \text{OCH}_3$

Figura 20 - Alcalóides aporfínicos isômeros, com massa molecular 355,1420 g/mol, isolados e caracterizados em espécies do gênero *Ocotea* (Lauraceae).

Assim, dentro dos objetivos propostos nessa pesquisa, a ferramenta hifenada utilizada, CLAE-DAD-IES-EM, para a detecção de constituintes químicos presente em extratos de fontes naturais, nesse caso o extrato hidroalcoólico de *O. paranapiacabensis*, cumpre sua missão em evidenciar a possibilidade de detecção *in situ* dos constituintes químicos presentes numa matriz complexa. Para podermos definir o isômero presente no extrato, é necessário fazer uso de técnicas hifenadas tais como EM-EM que permitam o estudo das fragmentações do analito, permitindo através do estudo de seus fragmentos, uma maior informação estrutural.

4.4.4. Detecção e análises estrutural do adulto representado pela banda 4

O espectro de massa da fração OPFAc (Figura – 14) apresenta a banda 4, representativa do composto detectado como aduto na forma $[M+H]^+$, de relação massa/carga 449,1391. A fragmentação a partir da molécula protonada $[M+H]^+$, resultou na perda de m/z 162, que foi proposto com referente a uma hexose. Estes dados levam a uma estrutura molecular de uma aglicona e, conseqüentemente, a observação da presença de um fragmento de relação m/z 287,0747 é observado no fragmentograma desse constituinte, que segundo análises no DNP, juntamente com os dados do espectro de UV, evidenciaram que o composto detectado como um flavonóide glicosilado.

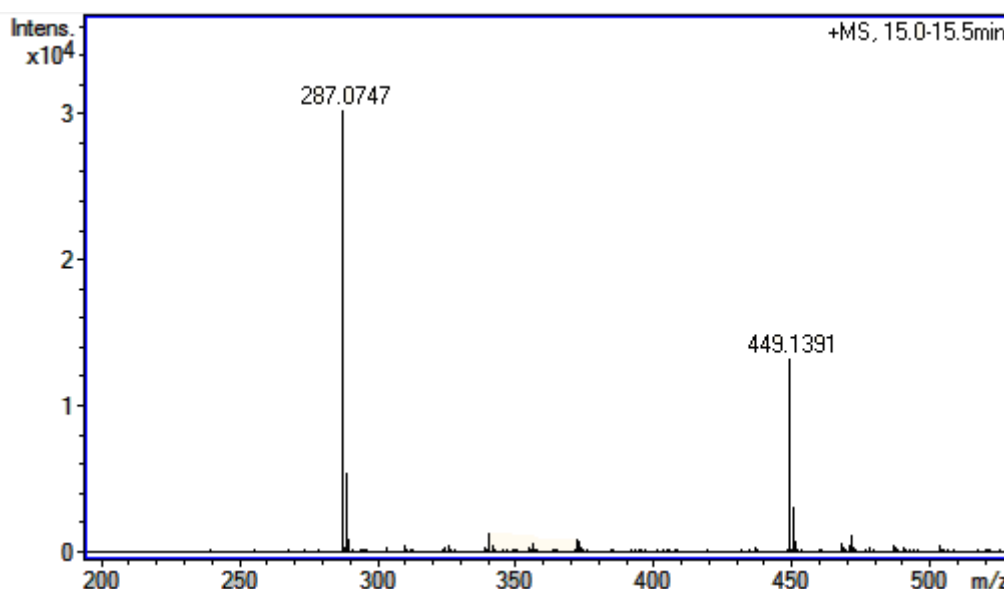


Figura 21 - Espectro de massa apresentando fragmentação por dissociação na fonte das estruturas do pico **4**, identificada como um flavonóide de massa molecular 448,1275 g/mol.

A análise estrutural desse constituinte químico, visando identificar o componente da banda **4**, considerou-se tratar-se do flavonol monoglicosilado correspondente a estrutura molecular do kaempferol-*O*-glicosídeo. Esta afirmação foi feita após comparação dos dados obtidos com a base de dados do DNP referente as substâncias previamente isoladas no gênero *Ocotea*. Analisando a aglicona desse flavonóide (kaempferol), o glicosídeo pode estar presente como substituinte nas

posições 3, 5, 7 e 4', conforme Figura 22. A identificação da posição do glicosídeo deverá ser feita através de métodos espectroscópicos de RMN.

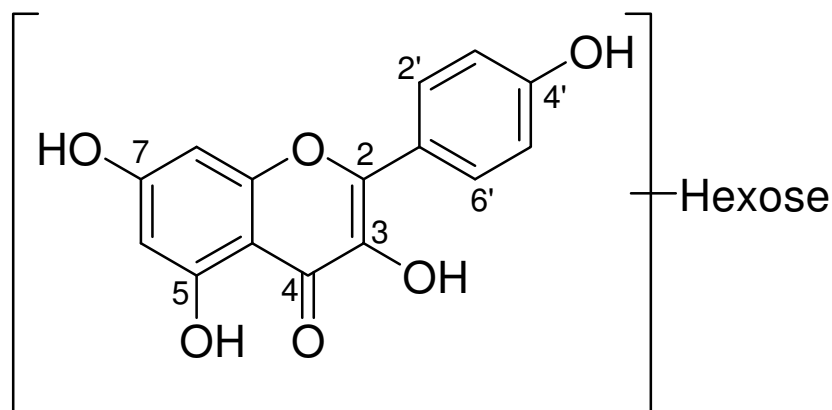


Figura 22 - Estrutura molecular do flavonóide 3, 5, 7, 4'-tetrahidroxi-flavonol

Pelo exposto, e considerando que este flavonóide glicosilado (kaempferol-O-glicosídeo), mesmo sendo qualquer um dos seus 3 isômeros possíveis, trata-se de um constituinte ainda não detectado na composição química das espécies do gênero *Ocotea* (Lauraceae), representa um fato importante para a proposta de uso da ferramenta hifenada CLAE-DAD-IES-EM, aplicadas para a detecção de constituintes presentes em extratos de fontes naturais, *in situ*, nesse caso a partir de extratos hidroalcoólico das folhas *Ocotea paranapiacabensis*.

4.4.5. Detecção e análises estrutural do adulto representado pela banda 5

Na figura 14 (p. 37), onde está representado o espectro de massa da fração de partição líquido-líquido OPFAc, observa-se a presença da banda 5, representativo do composto detectado como aduto $[M+H]^+$ e de relação massa/carga 433,1448. Observou-se uma fragmentação a partir do íon pseudo molecular $[M+H]^+$, que resultou na perda de m/z 146, esta fragmentação foi proposta como referente a uma unidade de ramnose, consequentemente observou-se a formação de um fragmento m/z 287,0751 ($[M+H-146]^+$), estes dados levaram a proposta de que este

íon precursor (m/z 287,07251) está relacionado a estrutura molecular de uma aglicona.

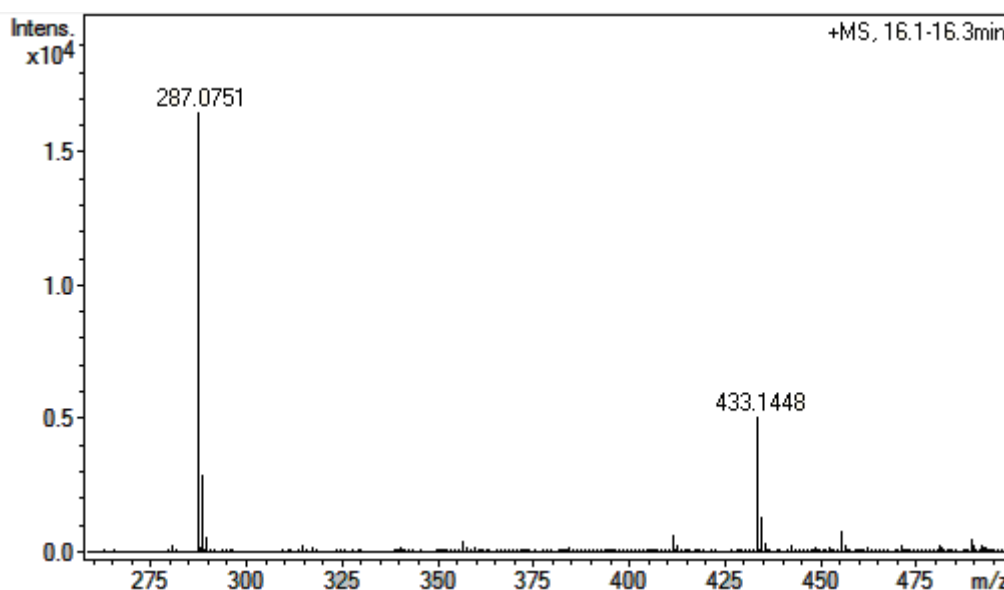


Figura 23 - Espectro de massa referente ao pico 4, identificado como um flavonóide de fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$.

Desta maneira, estes dados, juntamente com as informações referentes ao espectro de UV 254 nm, foram contrastados com a base de dados do *Dictionary of Natural Products* (DNP), resultando na detecção do constituinte referente ao pico **5** do espectro de massa ilustrado na figura 14, como pertencente a classe dos flavonóides monoglicosilado. Esta proposta foi feita com base na análise desta base de dados (DNP), onde está relatado o prévio isolamento de um flavonóide do gênero *Ocotea* (*O. vellosiana*) com a mesma aglicona do kaempferol, mas com diferentes substituintes. Sendo assim, como ilustrado na figura 24 a seguir, existe a possibilidade de existir três isômeros para a estrutura deste flavonol-*O*-ramnosídeo, onde da molécula da ramnose pode estar presente nas posições 3, 5, 7 e 4'. A técnica de CLAE-DAD-IES-EM, empregada na análise desse constituinte, não pode aferir a real posição da unidade de ramnose, sendo necessária a utilização de técnicas hífenadas mais modernas como CLAE-RMN, para a identificação da posição deste substituinte e sua confirmação estrutural *in situ*.

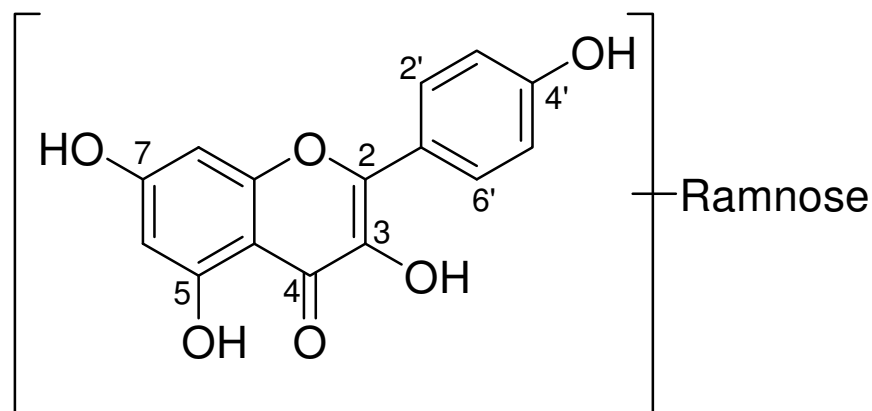


Figura 24 - Estrutura molecular do flavonóide 3, 5, 7, 4'-tetrahydroxi-flavonol

4.4.6. Elucidação estrutural dos flavonóides identificados através da análise in silico da fração OPFAc

A fração oriunda de partição líquido-líquido OPFAc, onde foram detectados os flavonóides **4** e **5**, utilizando a técnica CLAE-DAD-IES-EM, foi analisada, com a finalidade de confirmar as estruturas identificadas referentes as bandas **4** e **5**, com dados adicionais de RMN ^1H e de ^{13}C . Esses constituintes químicos foram inicialmente detectados por meio de CLAE-DAD, registrados no cromatograma apresentado na Figura – 14 (p. 37), e representado no cromatograma de íons totais da fração OPFAc pelos picos **4** e **5**. Um dos fatores importantes no planejamento experimental para o isolamento e caracterização dos flavonóides kaempferol-*O*-glicosídeo e kaempferol-*O*-ramnosídeo, foi a intensidade e resolução das duas bandas referentes aos compostos identificados, além de apresentarem as bandas com maior absorbância dentre aquelas presentes no perfil cromatográficos da fração OPFAc (CLAE-DAD) (figura 25).

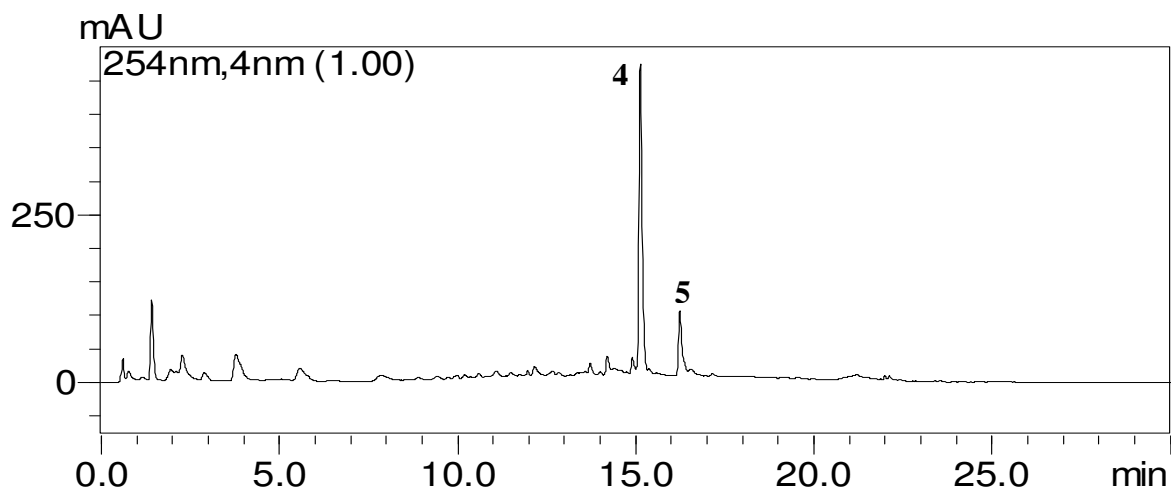


Figura 25 - Perfis cromatográfico CLAE/DAD 254 nm da fração OPFAc obtida a partir de partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico das folhas de *O. paranapiacabensis*

A técnica utilizada para o fracionamento de OPFAc foi a cromatografia em coluna a pressão reduzida (CCPR), com a finalidade de obter a fração enriquecida com os constituintes de interesse. A metodologia aplicada para tal finalidade está representada na Figura 26, demonstrado a seguir.

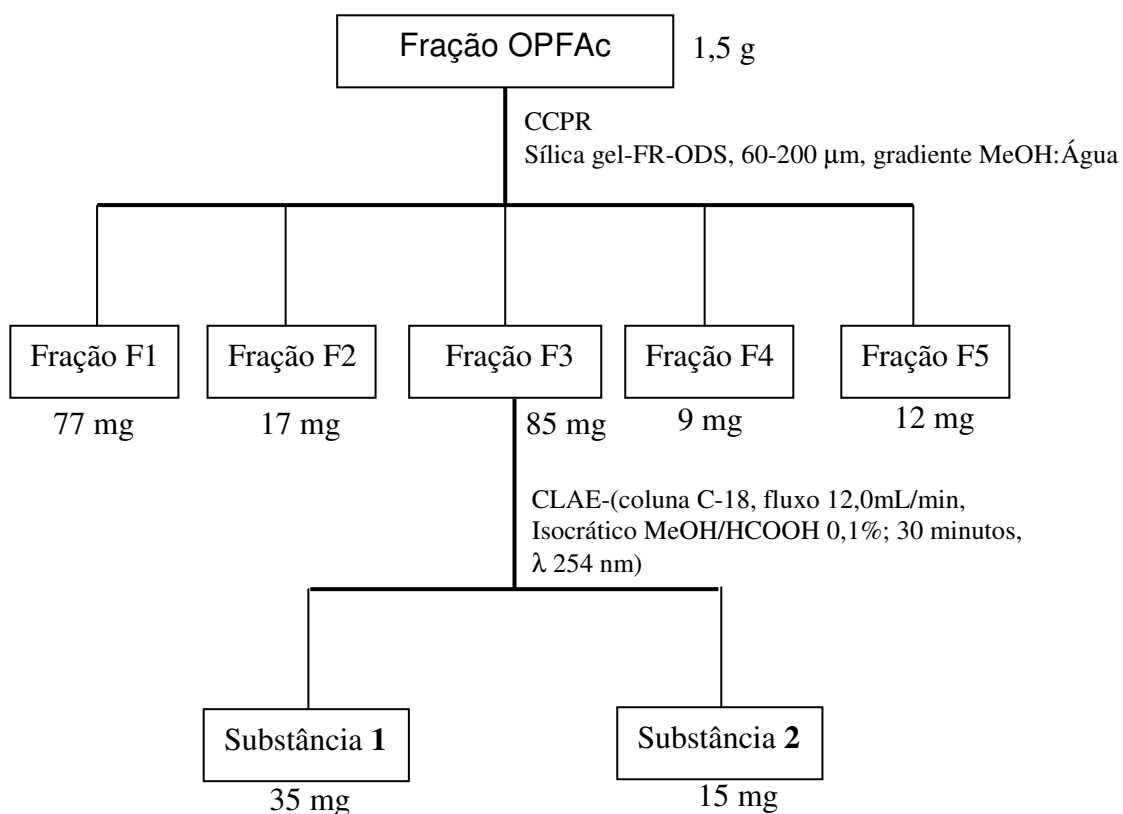


Figura 26 - Representação da metodologia aplicada no isolamento dos flavonóide 4 e 5, utilizando cromatografia em coluna a pressão reduzida

Foi utilizado um gradiente de metanol:água, nas proporções 1:9; 3:7; 1:1; 6:4 e 1:0 para a obtenção das 5 frações. Após coletadas, estas foram concentradas em evaporador rotatório a pressão reduzida e, em seguida, novamente analisadas através da técnica de CLAE-DAD. O perfil cromatográfico da fração de número 4 representado na Figura 28, demonstrou que o processo de fracionamento, com o objetivo de obter um fração enriquecida com os constituintes químicos **4** e **5**, foi bem sucedido.

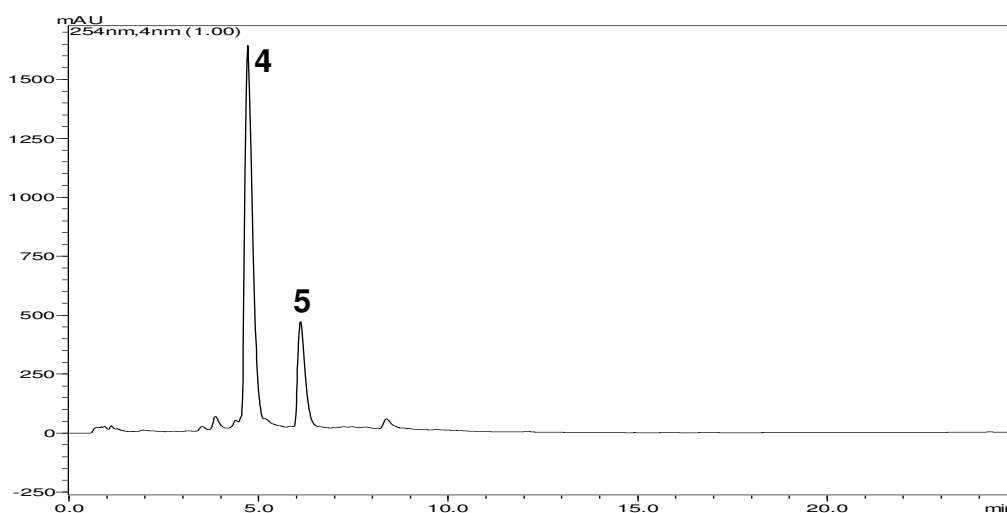


Figura 27 - Perfil cromatográfico da Fração 4, obtida através do fracionamento da fração OPFAc, utilizando a Cromatografia em Coluna a Pressão Reduzida (CCPR).

Foram utilizadas técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e de ^{13}C para a confirmação estrutural das substâncias isoladas. Os dados de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio e carbono nos espectros de RMN ^1H e de ^{13}C estão consistentes com os valores da literatura (VEGA, et al., 2007).

4.4.7. Identificação das substâncias **1** (FLA 1) e **2** (FLA 2) isoladas a partir da fração OPFAc.

Os espectros de RMN de ^1H das substâncias **1** e **2**, (página 85 e 86) sugerem a presença de flavonóides glicosilados. A presença de sinais em δ 5,22 (**1**) e δ 5,28 (**2**) são características de hidrogênios anoméricos. Nos deslocamento químicos em δ 6,8-8,0, foram observados sinais com constante de acoplamento (8,5 Hz) que correspondem aos hidrogênios equivalentes H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel 1,4-dissubstituído de um flavonóide. Na região de δ 6,0 e 6,3 observam-se dois sinais com aparência de singlete alargado, referente aos hidrogênios H-6 e H-8. Além disso, no espectro de RMN de ^1H da substância **2**, observa-se um dubleto em δ 0,88 característico de hidrogênios da metila correspondente ao C-6 (δ 17,4) da ramnose.

Os espectros de RMN de ^{13}C (página 85 e 89) trazem sinais em δ 131,2 e δ 134,8 estes valores permitem sugerir um flavonol com açúcar na posição 3, pois o deslocamento químico do C-3 de flavonol é bastante característico e bem conhecido (VEGA, et al, 2007). Além disso, nos espectros de carbono ^{13}C das substâncias **1** e **2**, pode-se observar a presença de um carbono com deslocamento químico δ 178,4 (**1**) e δ 177,4 (**2**), absorção característica de carbono carbonílico de flavonol com hidroxila em C-5.

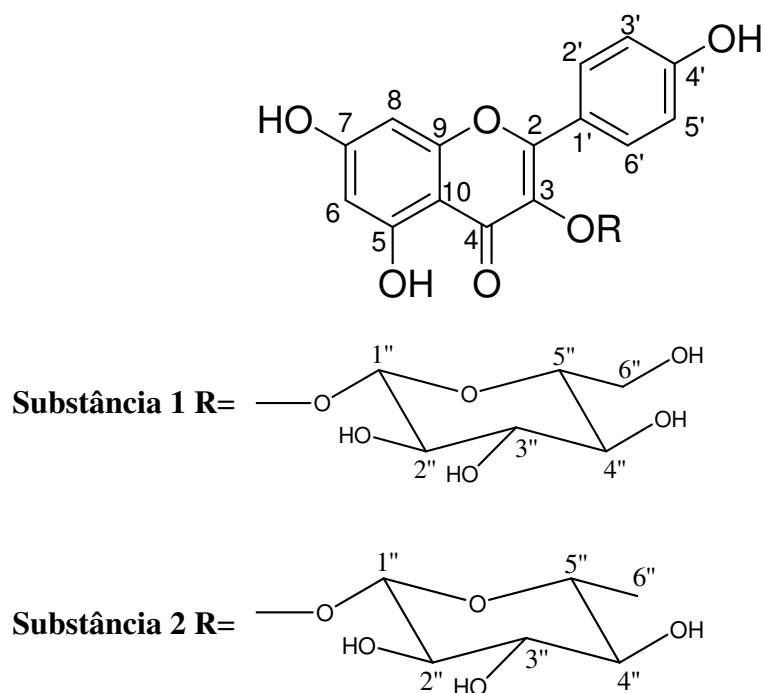


Figura 28 - Estrutura dos flavonóides kaempferol-3-*O*-glicosídeo (**1**) e kaempferol-3-*O*-ramnosídeo (**2**) isolados a partir da fração OPFAc.

Tabela 7- Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (500 MHz) dos flavonóis 1 e 2 (DMSO- d_6).

	Flavonóide (1)		Flavonóide (2)	
Posição	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) multiplicidade; J (Hz)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) multiplicidade; J (Hz)
2	157,9	-	156,9	-
3	131,2	-	134,1	-
4	178,4	-	177,4	-
5	162,1	-	161,2	-
6	99,7	6,0; s	99,1	6,14; s
7	162,5	-	165,6	-
8	99,5	6,2; s	93,9	6,33; s
9	157,9	-	156,1	-
10	105,2	-	103,5	-
1'	122,7	-	120,5	-

2' e 6'	132,1	6,87; <i>d</i> ; 8,5 Hz	130,5	6,90; <i>d</i> ; 8,5 Hz
3' e 5'	116,3	8,03; <i>d</i> ; 8,5 Hz	115,3	7,74; <i>d</i> ; 8,5 Hz
4'	159,9	-	160,0	-
1''	103,0	5,22; <i>d</i> ; 7,0	101,7	5,28; <i>d</i> ; 7,5
2''	75,7		70,3	3,13 -3,49; <i>m</i>
3''	78,2	3,50; <i>dd</i> ; 5,5 Hz	70,5	3,13 -3,49; <i>m</i>
4''	71,3	3,18; <i>m</i>	70,0	3,13 -3,49; <i>m</i>
5''	78,3	3,67; <i>dd</i> ; 2,0 Hz	71,1	3,13 -3,49; <i>m</i>
6''	62,1	3,18; <i>m</i>	17,4	0,77; <i>d</i>

4.5 Teste antioxidante preliminar frente à capacidade de captura do radical livre DPPH.

Princípio do método: Quando o radical DPPH, em presença de um antioxidante doador de hidrogênio, passa à sua forma reduzida DPPH-H, o seu elétron desemparelhado deixa de estar em conjugação com os grupos arilas. Nesta forma, o DPPH-H sofre um decréscimo da absorvidade molar em 517 nm e a coloração da solução muda de púrpura para amarela (Figura 29). O resultado é observado por uma curva de concentração da amostra antioxidante pela % ΔA (CARDOSO et al., 2004).

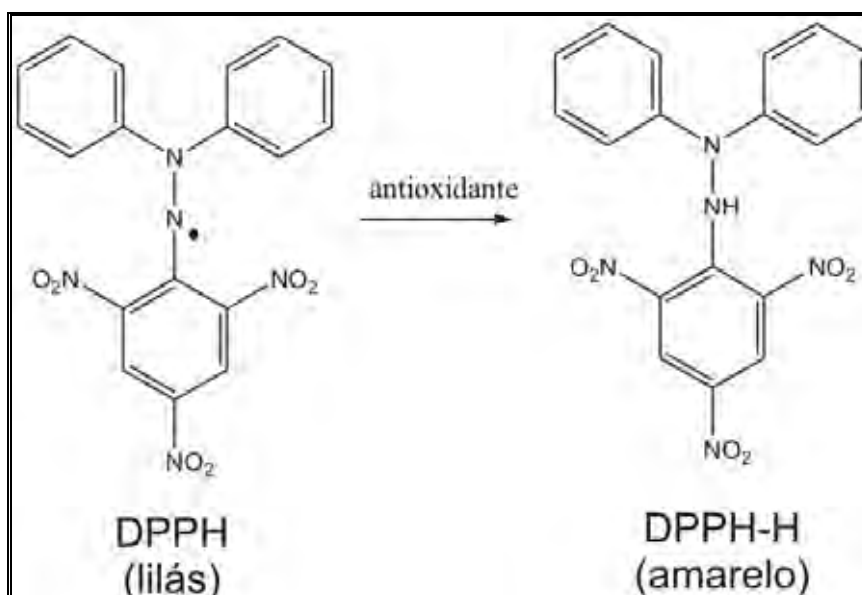


Figura 29- Ilustração do seqüestro do radical DPPH e a mudança em sua absorvidade em $\lambda=517$ nm

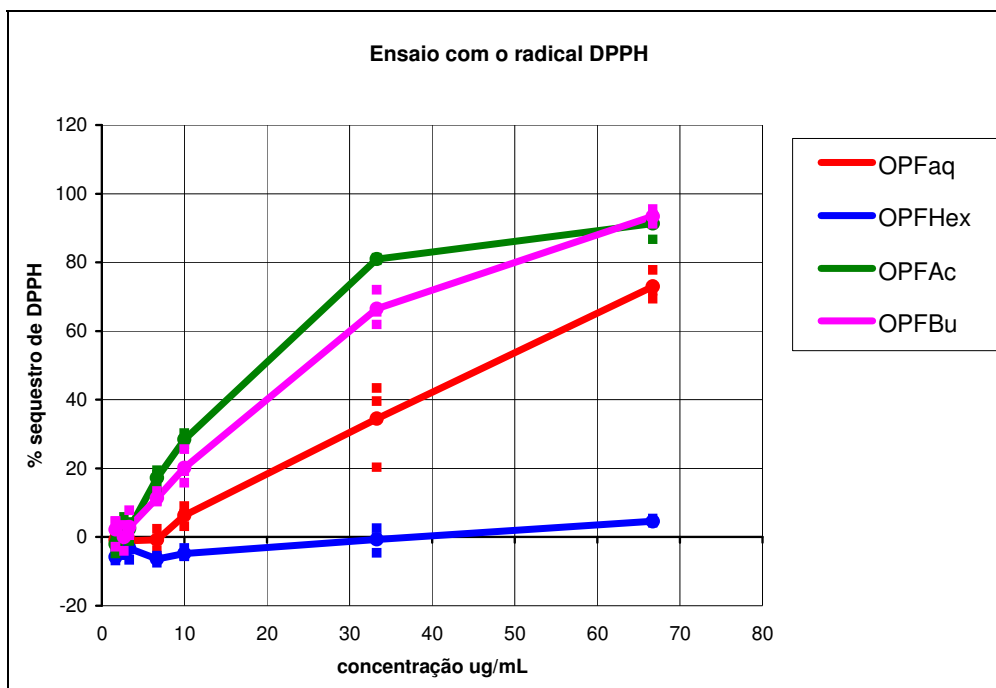


Figura 30 - Atividade sequestradora de radicais DPPH, das frações de partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico das folhas de *O. paranapiacabensis*.

As frações de partição líquido-líquido das folhas de *O. paranapiacabensis*, foram avaliadas quanto a capacidade de sequestro do radical livre DPPH (Figura 30). As frações OPFAc, OPFBu e OPFaq analisadas, apresentaram percentual de sequestro de 50%, 40% e 20% respectivamente, em uma concentração de 20,0 $\mu\text{g/mL}$. O fato das frações possuírem diferentes capacidades de sequestro na mesma concentração pode ser atribuído a semelhança nos perfis cromatográficos CLAE-DAD 254 nm (página 31), o que evidencia que os constituintes químicos presentes nas frações analisadas são semelhantes, diferindo apenas nas concentrações destes nas respectivas frações analisadas.

A fração OPFAc apresentou a maior capacidade de sequestro do radical DPPH quando comparadas com as outras frações analisadas (OPFBu e OPFaq), por esse motivo foi realizado o monitoramento da atividade antioxidante no perfil CLAE-DAD 254 nm. O procedimento utilizado para o monitoramento dessa atividade foi realizado coletando-se frações provenientes da análise CLAE-DAD 254 nm da fração de partição OPFAc, utilizando o coletor automático acoplado ao instrumento CLAE. Para visualização da atividade antioxidante, se sobrepôs o perfil cromatográfico CLAE-DAD 254 nm da fração analisada, com o gráfico de

absorbância resultante do ensaio de captura do radical livre DPPH, de cada fração coletada. O resultado do monitoramento da fração OPFAc está apresentado na figura 31, apresentada a seguir.

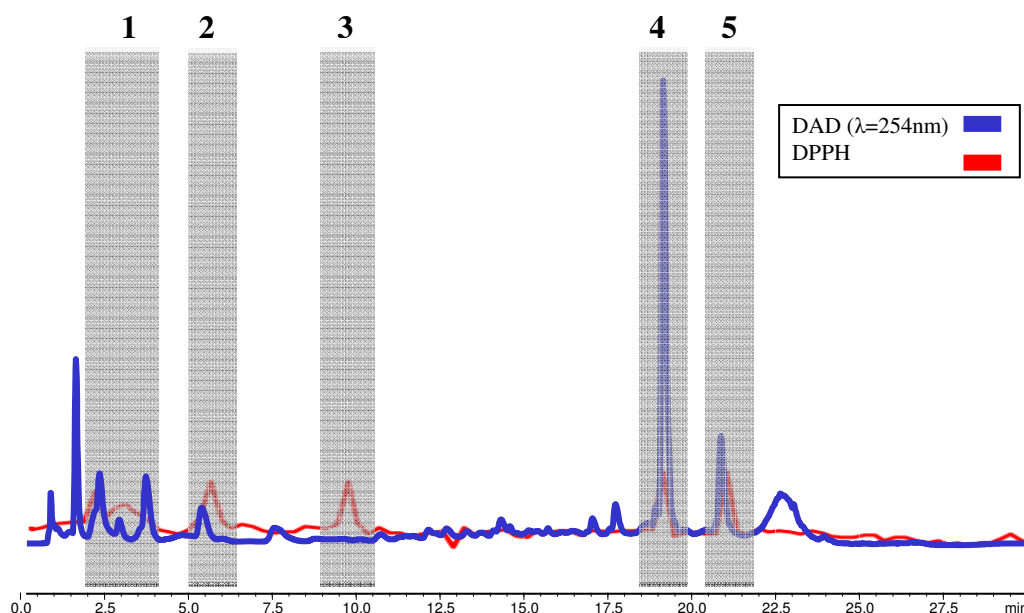


Figura 31- Monitoramento da atividade antioxidante da fração OPFAc, em azul está representado o perfil cromatográfico DAD 254 nm e em vermelho o resultado do ensaio que mediu a capacidade seqüestradora de radicais livres, DPPH da fração analisada

Pode-se observar na figura 28, que a atividade antioxidante está concentrada em 5 faixas de tempo. Através da análise *in silico*, pode-se determinar as substâncias responsáveis pelas atividades nas faixas, **4** (kaempferol-3-*O*-glicosídeo) e **5** (kaempferol-3-*O*-rhamnosídeo), o que é de grande avalia para a metodologia aplicada nesta análise, que identificou as substâncias bioativas antes mesmo de seu isolamento. A partir dos dados expostos, pode-se concluir que o estudo para identificação e/ou isolamento, de possíveis constituintes ainda não isolados no gênero *Ocotea* na fração OPFAc com capacidade antioxidante, (sequestradora de radicais livres, DPPH) deve-se deter nas substâncias mais polares, pois não há nenhum dado na literatura a partir dos adutos proposto destes constituintes. Este estudo também deve focar na tentativa da identificação ou isolamento da substância responsável pela atividade da faixa 3, pois esta tem uma potencial atividade antioxidante e uma baixa absorbância no DAD 254 nm.

4.6 Análise *in silico* da fração AFFAc obtida a partir do extrato hidroalcoólico de *A. firmula*

A fração acetato de etila (AFFAc) obtida a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. firmula*, foi submetida a análise por CLAE-DAD-IES-EM (Figura 29), onde as bandas cromatográficas referentes aos tempos de retenção de 10,8; 12,7; 13,2 e 17,9 minutos (representada na figura 32 pelos números 1; 2; 3 4 respectivamente). Essas bandas foram detectadas como os adutos protonados referentes às estirilpironas **ESPI 1-4**, que foram identificadas através do cruzamentos dos dados obtidos com aqueles presentes na base de dados do DNP para as substâncias já isoladas no gênero *Aniba*.

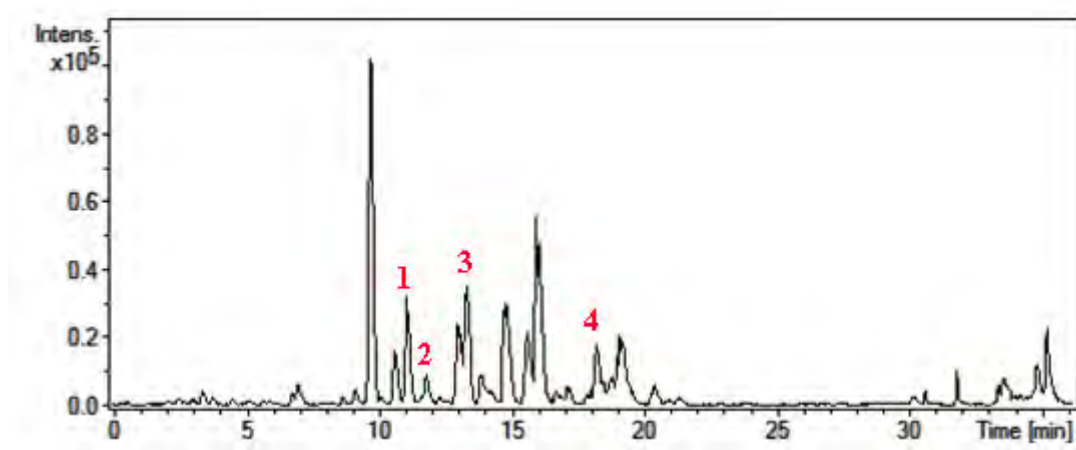


Figura 32- Espectro de massa da fração AFFAc oriunda do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. firmula* (Lauraceae).

Tabela 8 - Resultados CLAE/DAD-IES-EM (tR, m/z e λ) obtidos a partir da análise do espectro de massa da fração AFFAc

ADUTOS	t _r CLAE/EM (min)	(IES-pos.) m/z
1	10,8	289, 1216
2	12,7	273, 0843
3	13,2	229, 0897
4	17,9	457, 154

A partir da análise dos dados obtidos a partir da técnica CLAE-DAD-IES-EM, aliados a análise *in silico*, foi possível identificar as estilipironas 1-4 (Figura 33) como sendo: **(1)** 4, 11, 12-trimetoxi- 6-*trans*-estiril-pirano-2-ona; **(2)** 4-metoxi-11,12-metilenodióxido- 6-*trans*-estiril-pirano-2-ona; **(3)** 4-metoxi- 6-*trans*-estiril-pirano-2-ona; **(4)** 4-Metoxi- 8-fenil-7-[6-(4-metoxi-2-pironil)]-6`estiril-oxabiccilo[4,2,0]octa-4`-en-2`ona.

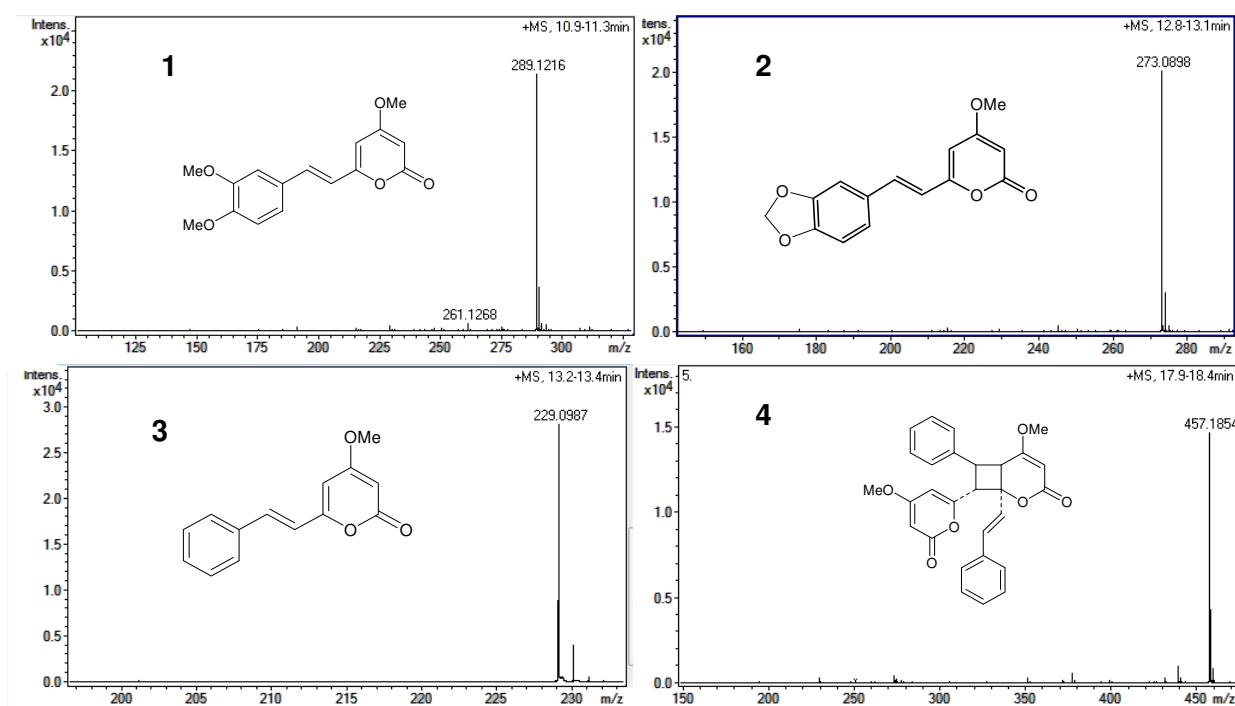


Figura 33- Estruturas dos constituintes identificados, como adutos na forma $[M+H]^+$ correspondentes as bandas 1, 2, 3 e 4 do espectro de massa da fração AFFAc.

A análise do perfil cromatográfico a 254 nm (Figura 34), possibilitou a identificação das bandas cromatográficas referentes as estilipironas identificadas **1-4**, esse dados foi obtido através da comparação do tempo de retenção dessas bandas cromatográficas com os picos presentes no cromatograma de íons totais (TIC) (Figura 32).

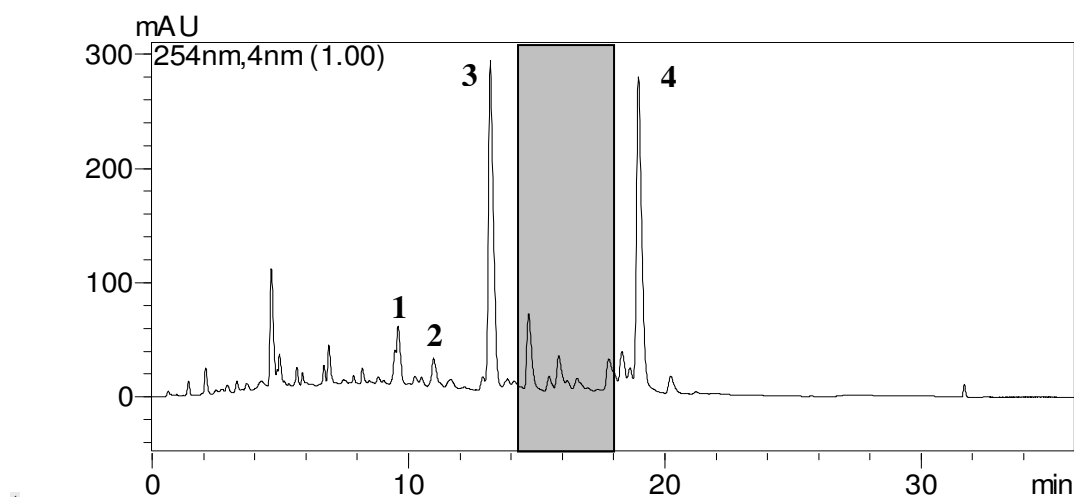


Figura 34- Região do perfil cromatográfico da fração AFFAc representada pela área em destaque, onde não foram identificados substâncias previamente isolados do gênero *Aniba* através da análise *in silico*.

A região de destaque do cromatograma a 254 nm da fração AFFAc (Figura 34), corresponde aos constituintes químicos ainda não identificados. Essa fração (150 mg) foi submetida a CLAE preparativo, onde foram coletadas quatro frações (Figura 35).

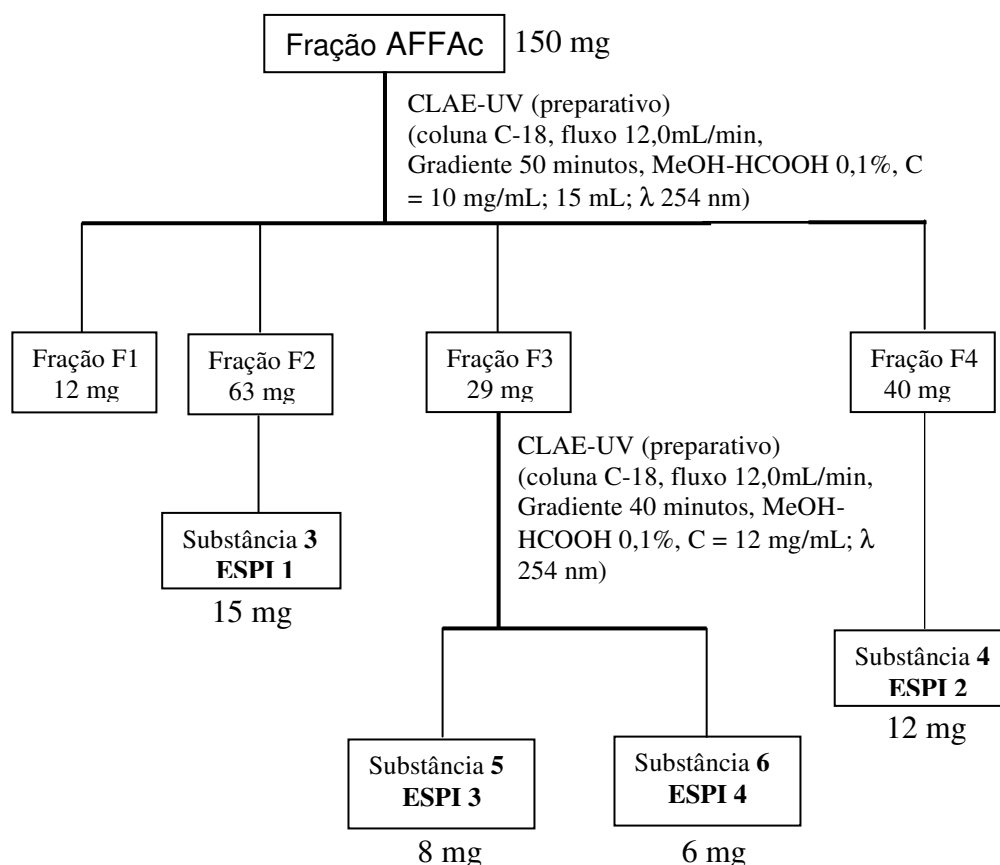


Figura 35 - Esquema do fracionamento de AFFAc.

As frações coletadas foram concentradas em evaporador rotatório a pressão reduzida, sendo que nas frações 2 e 4, observou-se a formação de um precipitado de cor branca, o qual foi coletado e posteriormente analisado por RMN mono e bidimensionais, caracterizando as estilipironas **ESPI 1** e **ESPI 2** (Figura 37). Essas substâncias foram isoladas por Mandarino et al. (1990) em espécies de *Aniba*.

O perfil cromatográfico da fração três está representado na figura 32, essa fração foi purificada através da técnica CLAE preparativo (Figura 36) com a finalidade de se isolar as substâncias não identificadas. A partir desse procedimento experimental, foram isolados os dímeros de estilipironas **ESPI 3** e **ESPI 4** inéditos na literatura, representados na Figura 36 pelas bandas cromatográficas 5 e 6.

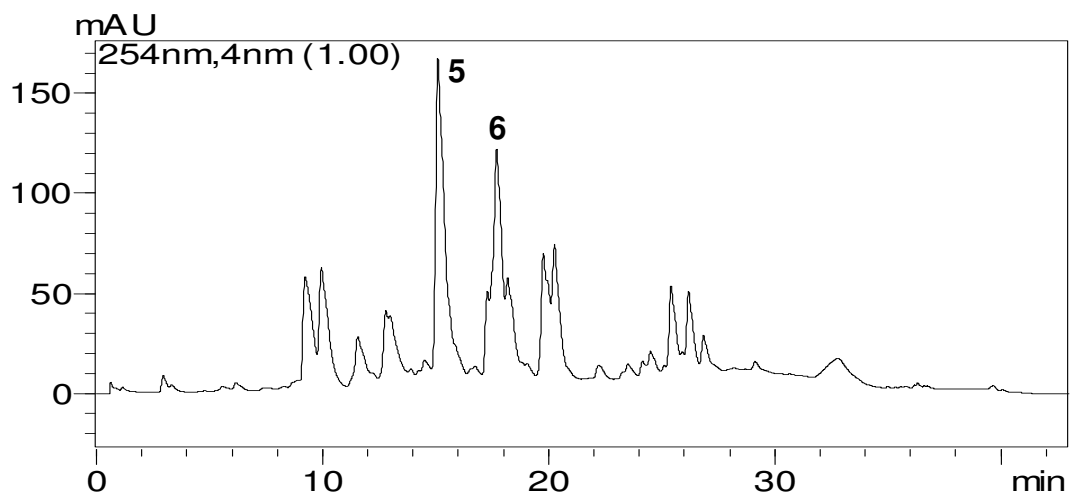


Figura 36 – Perfil cromatográfico da fração três.

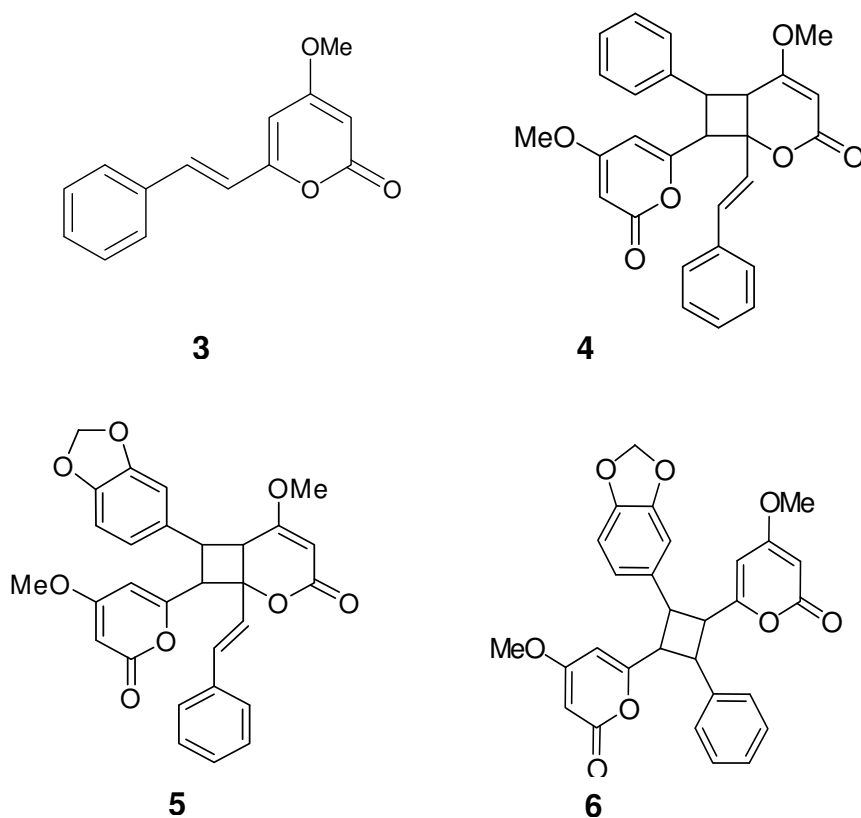


Figura 37- Estirilpironas isoladas a partir das folhas de *A. firmula*

4.7 Identificação das substâncias isoladas a partir das folhas de *A. firmula*

Substância 3 (EPSI-1)

O espectro de RMN de ^1H desta substância apresenta um par de dubletos entre δ 6-8 ppm com alta constante de acoplamento que caracterizaram a presença de dois hidrogênios olefínicos, pertencentes a dupla ligação com configuração *trans*, este dois dubletos, foram atribuídos aos hidrogênios H-7 (1H, *d*, $J = 16,0$ Hz) e H-8 (1H, *d*, $J = 16,0$ Hz), com deslocamento químico δ 6,83 e δ 7,42 respectivamente. Neste mesmo espectro, foi observado a presença de outro par de dubletos, em campo mais baixo, cada um integrando para um hidrogênio, estes foram atribuídos como pertencendo aos hidrogênios olefínicos H-3, δ 5,61 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) e H-5 δ 6,23 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz). Analisando os sinais de deslocamento químico na região de aromático δ 7-8 ppm, foram atribuídos três sinais em δ 7,34 (1H, *m*), δ 7,37 (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz) e em δ 7,57 (2H, *dl*, $J = 8,0$ Hz) referentes aos hidrogênios H-11-13, H-10-14 e H-12, do anel aromático monossustituído.

A partir da análise dos deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C da substância **ESPI 1**, foram atribuídos os sinais em δ 102,7 e δ 89,4 referentes a um sistema olefínico em C-5 e C-4 do anel pirônico, respectivamente. Ainda foram observados dois sinais de carbonos quaternários em δ 160,3 e 136,7 atribuídos aos carbonos C-6, e C-9 (Tabela 17). O sinal em δ 173,6 foi atribuído a uma carbonila de éster, em C-2 no anel pirônico e o sinal em δ 166,6 ao carbono C-4. Através dos dados de *g*COSY, *g*HMQC e *g*HMBC correlacionou-se os dados de hidrogênio-hidrogênio e hidrogênio-carbono, possibilitando assim a atribuição completa dos sinais de RMN (tabela 9). Com base nesses dados, a estrutura estirilpirona 4-metoxi-6-*trans*-estiril-piran-2-ona foi estabelecida e confirmada. Essa substância já havia sido isolada de extratos de folhas de espécies de *Aniba* (MANDARINO et al., 1990).

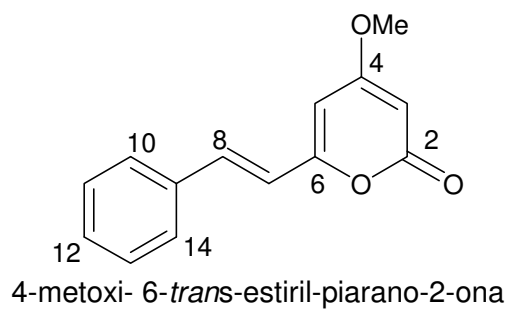


Tabela 9 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de estirilpirona ESPI-1 (CDCl₃, δ em ppm)

posição	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); multiplicidade; J (Hz)	$g\text{HMBC}$
2	173,6	-	-
3	89,4	5,61; <i>d</i> ; 2,0	6,23
4	166,5	-	-
5	102,7	6,23; <i>d</i> ; 2,0	5,61
6	160,3	-	6,07; 6,54
7	120,0	6,83; <i>d</i> ; 16	5,61
8	136,6	7,40; <i>d</i> ; 16	6,54
9	136,7	-	6,83; 7,34
10 e 14	127,4	7,37; <i>d</i> ; 8,0 Hz	7,57
12	129,4	7,34; <i>m</i>	7,37
11 e 13	128,9	7,57; <i>d</i> ; 8,0 Hz	7,30; 7,43
OMe	56,97	3,88; <i>s</i>	-

Substância 4 (ESPI 2)

O espectro de RMN de ^1H dessa substância apresentou sinais em δ 5,47 (1H, *d*, 2,5 Hz), δ 6,11 (1H, *d*, $J = 2,5$ Hz) e δ 5,37 que foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-3', H-5' e H-3 graças a comparação com os dados da literatura (MANDARINO *et al.*, 1990). A real posição dos hidrogênios H-3' e H-3, foi confirmada através do experimento de NOESY 1D, onde, irradiou-se os hidrogênios das metoxilas com deslocamento químico δ 3,8 (3H, s) e δ 3,3 (3H, s) demonstrando que realmente estes hidrogênios acoplam com os hidrogênio H-3' e H-3 respectivamente. Foi observado dois dubletos em δ 6,23 - 6,93 (1H, *d*) com constante de 16 Hz, que caracterizaram a presença de dois hidrogênios olefínicos, pertencentes a dupla ligação com configuração *trans*. Estes dubletos foram atribuídos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente. Os sinais em δ 3,75 (1H, *d*, $J = 10,0$ Hz), δ 4,35 (1H, *d*, $J = 9,5$ Hz) e em δ 4,50 (1H, *dd*, $J = 11,5$ Hz) foram atribuídos, com o auxílio do experimento *g*HMBC, aos hidrogênios H5, H7' e H8' do anel ciclobutano. Os sinais referentes ao multipletto em δ 7,29 foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos. (tabela10). Os dados de RMN de ^{13}C confirmam os sinais referentes aos carbonos olefínicos em δ 89,08 (C-3'), 92,2 (C-3) e 103,43 (C-5'). Os sinais em δ 182,86; δ 128,78; δ 128,91, δ 129,28 foram atribuídos ao sistema aromático monossustituído da estirilpirona. Os sinais em δ 46,8; 40,2; 54,6 e 80,7 são referentes aos carbonos C-5, C-8', C-7' e C-6 respectivamente, pertencentes ao anel ciclobutano (tabela 10).

Através dos dados dos espectros de *g*COSY, *g*HMQC e *g*HMBC correlacionou-se os hidrogênios aos respectivos carbonos, possibilitando assim a elucidação da substância **ESPI 2**. Segundo relatos da literatura, a irradiação de luz branca sobre cristais da estirilpirona **ESPI 1**, pode formar um artefato fotoquímico, através da isomerização *cis-trans* de **ESPI 1**, levando a formação da estirilpirona **ESPI 2** (MANDARINO *et al.*, 1990).

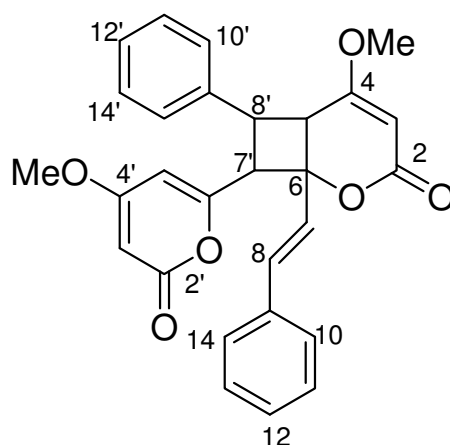


Tabela 10 - Dados de RMN da estilipirona ESPI 2 (CDCl₃, δ em ppm).

posição	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) multiplicidade; J (Hz)	$gHMBC$
2	172,6	-	-
3	92,2	5, 37, s	3,75
4	166,7	-	-
5	46,8	3,75; d ; 10,0 Hz	5,37; 6,6
6	80,7	-	6,93
7	126,1	6,6; d ; 16 Hz	-
8	132,5	6,93; d ; 16 Hz	-
9	137,4	-	6,6; 7,2
10 e 14	127,9	7,31; m	-
11 e 13	129,4	7,31; m	-
12	127,8	7,42; m	-
2'	172,6	-	-
3'	89,09	5,4; d ; 2,0 Hz	5,61
4'	167,1	-	5,4
5'	54,6	6,1; d ; 2,0 Hz	4,35
6'	161,4	-	3,74; 6,6
7'	54,6	4,5; d ; 9,5 Hz	-
8'	40,2	4,35; d ; 11,5 Hz	-
9'	137,2	-	3,75; 4,50
10' e 14'	126,2	7,31; m	-
11' e 13'	128,7	7,31; m	-
12	129,7	7,42; m	-

OMe	56,9	3,8; s	-
OMe	56,2	3,3; s	-

Substância 5 (ESPI 3)

O espectro de RMN de ^1H de **5** é semelhante a estilipirona **ESPI 2**, apresentando sinais em δ 5,5 (1H, *d*, 2,5 Hz), δ 6,13 (1H, *d*, $J = 2,5\text{Hz}$) e δ 5,42, atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-3', H-5' e H-3. A posição dos hidrogênios H-3' e H-3, foi confirmada através do experimento de NOESY 1D, onde através da irradiação das metoxilas δ 3,8 (3H, *s*) e δ 3,3 (3H, *s*) foi possível demonstrar que esses hidrogênios acoplam com os hidrogênio H-3' e H3 respectivamente. Ainda observou-se um par de dubletos atribuído aos hidrogênios H-7 δ 6,6 (1H, *d*, $J = 16\text{ Hz}$) e H-8 δ 6,9 (1H, *d*, $J = 16,0\text{ Hz}$) com alta constante de acoplamento, que caracterizaram a presença de dois hidrogênios olefínicos, pertencentes a dupla ligação com configuração *trans*. Os sinais em δ 3,7 (1H, *m*), δ 4,4 (1H, *dd*, $J = 11,5\text{ Hz}$) e em δ 4,3 (1H, *dd*, $J = 9,5\text{ Hz}$) foram atribuídos, com o auxílio do experimento *g*HMBC e *g*HMQC aos hidrogênios H-5, H-7' e H-8' do anel ciclobutano. Os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios aromáticos são idênticos aos observados na substância **4**, apresentando multiplete em δ 7,2. (Tabela 11). Observa-se também a presença de um singlete em δ 5,9 que é característico de hidrogênios de um sistema metilenodioxí.

Os dados de RMN de ^{13}C confirmam os sinais referentes aos carbonos olefínicos em δ 89,0 (C-3'), 92,2 (C-3) e 103,4 (C-5'), assim como os sinais referentes aos carbonos aromáticos em δ 128,8; δ 128,7; δ 128,9, δ 129,2 que foram atribuídos ao sistema aromático monossustituído. Os sinais em δ 47,0; 40,1; 55,0 e 80,6 são referentes aos carbonos C-5, C-8', C-7' e C-6 respectivamente, pertencentes ao anel ciclobutano (Tabela 11). O sinal característico de carbono metilênico dióxido foi atribuído δ 102,5.

Através dos dados dos espectros de, *g*COSY, *g*HMQC e *g*HMBC foi possível determinar a total correlação dos dados e assim a elucidação estrutural da molécula. Essa substância, 4-metoxi-8'-(11',12'-metilenodioxifenil)-7-[6-(4-metoxi-2-pironil)]-6'-estiril-oxabicyclo[4,2,0]-ocat-4'-em-2'-ona, é INÉDITA na literatura.

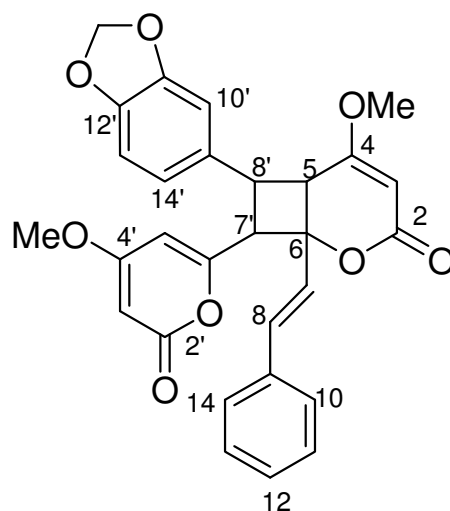


Tabela 11 - Dados de RMN da estilipirona ESPI 3 (CDCl₃, δ em ppm).

posição	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) multiplicidade; J (Hz)	g_{HMBC}
2	173,1	-	-
3	92,2	5,42, s	3,72
4	167,18		
5	47,0	3,72; m	5,42; 6,61
6	80,64	-	6,93
7	126,1	6,61; <i>d</i> ; 16 Hz	-
8	132,4	6,93; <i>d</i> ; 16 Hz	-
9	137,4	-	6,61; 7,32
10 e 14	127,9	7,27; m	-
11 e 13	129,4	7,27; m	-
12	127,8	7,44; m	-
2'	172,6	-	-
3'	89,08	5,5; <i>d</i> ; 2,0 Hz	6,13
4'	167,18	-	5,4
5'	103,42	6,13; <i>d</i> ; 2,0 Hz	5,50
6'	161,46	-	3,74; 6,6
7'	55,0	4,4; <i>d</i> ; 11,5 Hz	-
8'	40,14	4,30; <i>dd</i> ; 9,5 Hz	6,91
9'	137,4	-	3,75; 4,50
10	109,2	6,91; <i>d</i> ; 2,0 Hz	6,84
11	149,38	-	6,79

12	148,7	-	6,84
13	109,0	6,79; <i>d</i> ; 8,0 Hz	-
14	122,0	6,84; <i>dd</i> ; 8,0 e 1,5Hz	6,91
OMe	56,4	3,45; s	-
OMe	56,9	3,79; s	-
OCH₂O	102,5	5,9; s	-

SUBSTÂNCIA 6 (ESPI 4)

O espectro de RMN de ^1H de **6** apresentou sinais em δ 5,31 (1H, *d*, 2,0 Hz), δ 5,38 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz), δ 6,00 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) e 6,05 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-3, H-3', H-5' e H-5. A posição dos hidrogênios H-3' e H-3, foi confirmada através do experimento de NOESY 1D, onde, irradiou-se os hidrogênios das metoxilas δ 3,74 (3H, *s*) e δ 3,78 (3H, *s*) demonstrando que realmente estes hidrogênios acoplam com os hidrogênio H-3' e H3 respectivamente. Os sinais em δ 6,72 (1H, *d*, 8,0 Hz); δ 6,80 (1H, *dd*, 1,5 Hz); δ 6,86 (1H, *d*, 1,5 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-13', H-14' e H-10', respectivamente. Os sinais observados na região δ 7,18- δ 7,27- δ 7,32 foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-3, H-2 H-4 e H-1 H-5. Observa-se a presença de um singlete intenso em δ 5,90 que é característico de função metilenodioxí.

Os dados de RMN de ^{13}C confirmam os sinais referentes aos carbonos olefínicos em δ 88,12 (C-3'), 88,22 (C-3), 102,93 (C-5') 102,9 (C-5). Os sinais referentes aos carbonos aromáticos em δ 127,97; δ 128,47; δ 129,32 foram atribuídos aos carbonos do anel aromático monossustituído C-12, C-11-C13, C-10-C14, respectivamente. Os sinais em δ 44,4; 44,5; 45,9 e 46,2 são referentes aos carbonos C-8, C-8', C-7 e C-7' respectivamente, pertencentes ao anel ciclobutano (tabela 11). O sinal do carbono metilênico dióxido foi atribuído δ 102,5.

Através dos dados dos espectros de, *g*COSY, *g*HMQC e *g*HMBC correlacionou-se os hidrogênios aos respectivos carbonos, possibilitando a elucidação estrutural. Essa substância, 8'-(11', 12'-metilenodioxifenil)-8-fenil-7,7' *di* [6-(4,4'-dimetoxi-piran-2-ona) ciclobutano, é INÉDITA na literatura.

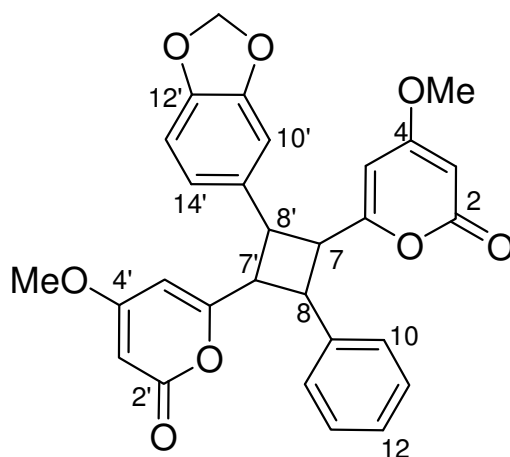


Tabela 12 - Dados de RMN da estilipirona ESPI 4 (CDCl_3 , δ em ppm).

posição	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) multiplicidade; J (Hz)	$g\text{HMBC}$
2	173,1	-	-
3	88,2	5,38; d ; 2,0 Hz	6,05
4	164,57	-	-
5	102,9	6,05; d ; 2,0 Hz	5,38
6	164,5	-	-
7	45,9	4,32; m	-
8	44,6	4,40; m	-
9	138,4	-	6,61; 7,32
10 e 14	129,3	7,32; m	-
11 e 13	128,4	7,27; m	-
12	127,9	7,17; m	-
2'	173,0	-	-
3'	88,12	5,31; d ; 2,0 Hz	6,00
4'	164,41x	-	-
5'	103,9	6,00; d ; 2,0 Hz	5,31
6'	161,4	-	3,74; 6,6
7'	46,2	4,32; m	-
8'	44,5	4,40; m	-
9'	132,7	-	6,72
10'	108,8	6,86; d ; 2,0 Hz	6,80
11'	149,10	-	6,72
12'	147,8	-	6,80

13'	108,9	6,72; <i>d</i> ; 8,0 Hz	-
14'	121,7	6,80; <i>dd</i> ; 8,0 e 1,5Hz	6,91
OMe	56,71	3,74; s	-
OMe	56,76	3,78; s	-
OCH₂O	102,18	5,90; s	-

5. CONCLUSÕES

- A partir do perfil cromatográfico obtido nas análises CLAE/DAD, foi possível observar uma acentuada semelhança qualitativa entre os extratos etanólicos preparados com os diferentes órgãos da espécie *O. paranapiacabensis* (galhos e folhas) permitindo a escolha da fração mais promissora.

- Através da técnica CLAE-DAD-IES-EM, foi possível identificar alguns compostos já relatados nos gêneros *Ocotea* e *Aniba*. Esta técnica hifenada conjugada com a abordagem *in silico*, mostrou-se eficiente na identificação dos constituintes majoritários presente nas frações AcOEt das folhas de *O. paranapiacabensis* e *A. firmula*.

- Analisando o espectro de massa da fração OPFAc, aliada a abordagem *in silico*, foi possível detectar, a partir dos adutos propostos, estruturas moleculares isoméricas de alcalóides aporfínicos. Prosseguindo a análise dessa fração, foram identificados dois flavonóides de tipo kaempferol-*O*-glicosilados ainda não relatados no gênero *Ocotea*. Esses flavonóides foram posteriormente isolados e suas estruturas confirmadas através de experimentos de RMN ^1H e ^{13}C . Os resultados evidenciam a eficiência da análise *in silico* na detecção de constituintes químicos presentes em uma matriz complexa.

- As frações obtidas a partir de partição líquido-líquido das folhas de *O. paranapiacabensis*, OPFAc, OPFBu e OPFaq, foram avaliadas quanto a propriedade sequestradora do radical livre DPPH, resultando em uma porcentagem de sequestro deste radical de 50%, 40% e 20% respectivamente, em uma concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Esses dados, aliados a semelhança nos perfis cromatográficos das frações analisadas por CLAE/DAD, evidenciaram a semelhança qualitativa entre os constituintes químicos presentes nas frações analisadas.

-Após a análise dos dados do monitoramento da atividade antioxidante na fração OPFAc, pode-se identificar que duas substâncias propostas através da análise *in silico* (kaempferol-3-*O*-glicosídeo e kaempferol-3-*O*-ramnosídeo), são responsáveis pela atividade. Fato que ressalta a aplicação da metodologia *in silico*, que possibilitou a rápida identificação das substâncias bioativas antes de seu isolamento.

- A partir das análises do espectro de massa da fração AFFAc, aliada a abordagem *in silico*, foi possível detectar, a partir dos adutos propostos, 4

estirilpironas previamente isoladas no gênero *Aniba*. Após as análises desses dados, foi planejado o isolamento cromatográfico racional dos constituintes químicos presentes em uma região específica do perfil cromatográfico onde não foram detectados adutos apartir da análise *in silico*. Esse planejamento resultou no isolamento de duas estirilpironas inéditas na literatura. **ESPI-3 e ESPI-4**

- Dentro dos objetivos propostos nessa pesquisa utilizando a técnica hifenada CLAE-DAD-IES-EM, associado à abordagem *in silico*, utilizada como ferramenta para a identificação de constituintes químicos previamente isolados nas espécies estudadas, evidenciamos que essa abordagem cumpre sua missão na detecção *in situ*, dos constituintes presentes em matrizes complexas e assim possibilita o direcionamento do estudos em regiões específicas do perfil cromatográfico visando a detecção de moléculas com características inéditas.

- As frações ainda não estudadas serão analisadas, posteriormente através da técnica CLAE-DAD-IES-EM/EM, visando identificar novos constituintes micromoleculares e co-metabólitos presentes nessas matrizes através de processos de dereplicação.

- O procedimento experimental utilizado nesse trabalho poderá ser aprimorado, com a utilização de técnicas espectroscópicas hifenadas modernas, tais como a RMN, com a finalidade de elucidar, *in situ* outras moléculas, permitindo uma análise global da matriz e auxiliando no entendimento de possíveis relações de sinergismo.

REFERÊNCIAS

- ASENCIO, M.; GUZMÁN, C. H.; LÓPEZ, J. J.; CASSELS, B. K.; PROTAIS, P.; CHAGRAOUI, A. Structure–affinity relationships of halogenated predicine and glaucine derivatives at D₁ and D₂ dopaminergic receptors: halogenation and D₁ receptor selectivity. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 3699-3703, 2005.
- BARBOSA, J. M.; VARGAS, M. R. W.; SILVA, I. G.; FRANÇA, I. S.; MORAIS L. C. S. L.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; CHAVES, C. O. M.; ALMEIDA, R. N.; AGRA, M. F. *Ocotea duckei*: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **Anais da Academia Brasileira Ciência**, v. 71, p. 231-238, 1999.
- BARBOSA FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from the fruits of *Licaria armeniaca*. **Phytochemistry**, v. 26, n.1, p.319-321, 1989.
- BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2002.
- BUDEL, J. M.; FARAGO, P. V. Aspectos botânicos e químicos do gênero *Ocotea aublet*, Lauraceae. **Revista de Estudos Vale do Iguaçu**, v. 4, p. 31-39, 2004.
- BUGNI, T. S.; RICHARDS, B.; BHOITE L.; CEMBORA, D.; HARPER, M. K.; IRELAND, C. M. Marine natural product libraries for high-throughput screening and rapid drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1095–1098, 2008.
- CARDOSO, C. L.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. S.; FURLAN, M.; EPIFANIO, R. A.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M.; LIMA, J. A.; BOLZANI, V. S. Indole glucoalkaloids from *Chimarrhis turbinata* and their evaluation as antioxidant agents and acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1882-1885, 2004.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. **Embrapa Informação Tecnológica**, v. 1, p. 318, 2003.
- CHAVEZ, J. P.; GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. 10 desmethyl-1-methyl-eudesmanes from *Ocotea corimbosa*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 849-852, 1995.
- 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 alcalóides de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 62-63, 2003.
- ESPADA, A.; MARTIN, M. M.; DAGE J.; KUO, M. S. Application of LC/MS and related techniques to high-throughput drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9, 2008.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SHIMABUKURO, A. A. Indole Alkaloid and other Constituents from *Ocotea minarum*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1382-1386, 2005.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19, 2008.

HOET, S.; STEVIGNY, C.; BLOCK, S.; OPPERDOES, F.; COLSON, P.; BALDEYROU, B.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERQ, J. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, Cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. **Planta Medica**, v. 70, p. 407-413, 2004.

HUANG, R. L.; CHEN, C. C.; HUANG, Y. L.; OU, J. C.; PO HU, C.; CHEN, C. C.; CHUNGMING, C. Anti-tumor effects of *d*-Dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. **Planta Medica**, v. 64, p. 212-215, 1998.

INDRA, B.; MATSUNAGA, K.; HOSHINI, O.; SUZUKI, M.; OGASAWARA, H.; OHIZUMI, Y. Structure–activity relationship studies with (±)-nantenine derivatives for α_1 -adrenoceptor antagonist activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 437, p. 173, 2002.

JUDD, W. S.; CAMPHELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. Utah: Sinauer Associates, 1999.

KASHIWADA, Y.; AOSHIMA, A.; IKESHIRO, Y.; CHEN, Y. P.; FURUKAWA, H.; ITOIGAWA, M.; FUJIOKA, K. M.; COSENTINO, L. M.; NATSCHKE, S. L. M.; LEE, K. H. Anti-HIV benzyloquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure–activity correlations with related alkaloids. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 443-448, 2005.

KITE, G. C.; VEITECH, N. C.; GRAYER, R. J.; SIMMONDS, M. S. J. The use of hyphenated techniques in comparative phytochemical studies of legumes. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 813-843, 2003.

KLAUSMEYER, P.; CHMURNY, G. N.; McCLOUD, T. G. A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from *Aniba panurensis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 10, p. 1732-1735, 2004.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1595–1599, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, 1992. p. 352.

MABBERLEY, D. J. **The plant-book**: a portable dictionary of the higher plants. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p. 706-709.

MANDARINO, D. G.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Photodimerization of 6-Styryl-2-Pyrones. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 1, n. 1, p. 53-54, 1990.

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

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

MORAES, P. L. R. Sinopse das Lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biota Neotrop**, v. 5, n. 2, 2005. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v5n2/pt/abstract?taxonomicreview+bn00905022005>>. Acesso em: 12 set. 2008.

MUCKE, H.; ASCHAUER, B. **Drugs from natural sources**: a mainstay of the industry. Disponível em: <www.currentdrugdiscovery.com>. Acesso em : 17 jun. 2008.

NEWMAN, T. J.; CRAGG, G. M.; SANDER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1024, 2003.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p. 111-136, 2003.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes, dos exploradores e a química de produtos naturais brasileiros. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 608-615, 1995.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n.1, p. 45-61, 2002.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae *Jussieu* na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo. **Rodriguésia**, v. 53 n. 82, p. 59-121, 2002.

RHEE, I. K.; VAN RIJN, R. M.; VERPOORTE, R. Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assays using thin layer chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 14, p. 127, 2003.

RIBEIRO, R. A.; CARMO, L. G.; VLADIMIROVA, J.; JURKIEWICZ, N. H.; JURKIEWICZ, A. Nantenine blocks muscle contraction and Ca²⁺ transient induced by noradrenaline and K⁺ in rat vas deferens. **European Journal of Pharmacology**, v. 470, p. 37, 2003.

RODDY, T. P.; HORVATH, C. R.; STOUT, S. J.; KENNEY, K. L.; HO, P.; ZHANG, J.; VICKERS, C.; KAUSHIK, V.; HUBBARD, B.; WANG, Y. K. Mass spectrometric techniques for label-free high-throughput screening in drug discovery. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 8207-8213, 2007.

SEIDL, P. R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 1, p. 145-150, 2002.

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

SHU, Y-Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, D. B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809-1812, 2007.

SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabruscula* - Annonaceae biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.

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, p. 135-143, 2004.

STOBIECKI, M. Applications of separation techniques hyphenated to mass spectrometer for metabolic profiling. **Current Organic Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 335-349, 2001.

TULP, M.; BOHLIN, L. Functional versus chemical diversity: is biodiversity important for drug discovery? **Trends in Pharmacology Society**, v. 23, n. 5, p. 225-231, 2002.

VEGA, M. R. G.; SOUZA, A. E.; VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of Brazilian American Society**, v. 18, n. 8, p. 1554-1559, 2007.

VILEGAS, J. H. Y.; GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, H. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea caesia*. **Phytochemistry**, v. 28, n.12, p. 3577-3578, 1989.

WOLFENDER, J. L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural identification of plant metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 437-455, 2003.

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

ZHOU, B. N.; JOHNSON, R. K.; MATTERN, M. R.; WANG, X.; HECHT, S. M.; BECK, H. T.; ORTIZ, A.; KINGSTON, D. G. J. Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxylon*. **Journal of Natural Product**, v. 63, p. 217-221, 2000.

ZSCHOCKE, S.; DREWES, S. E.; PAULUS, K.; BAUER R.; VAN STANDEN J. Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black tinkwood) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 219-230, 2000.

Anexo

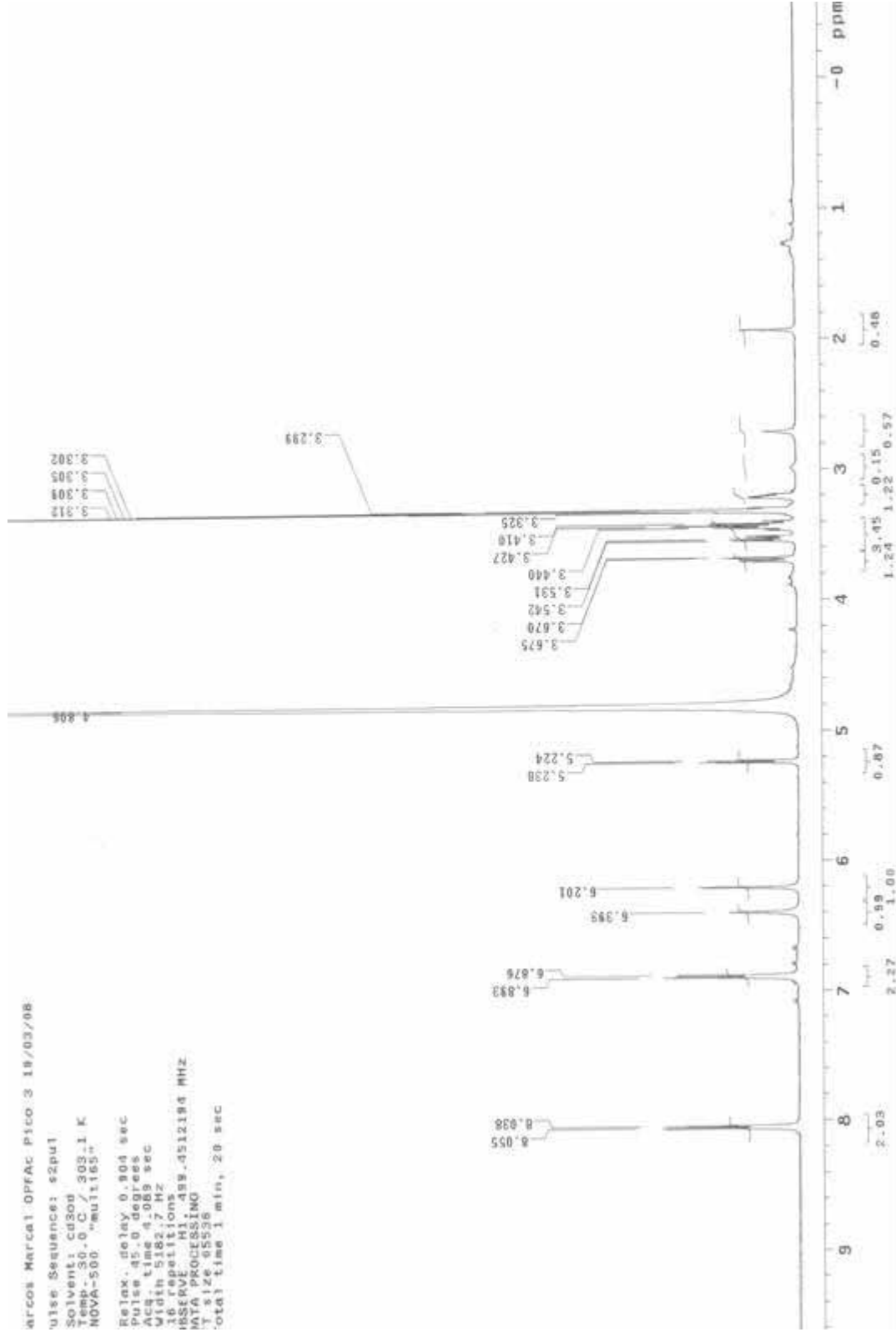


Figura 38: Espectro de RMN de ^1H de **1**.

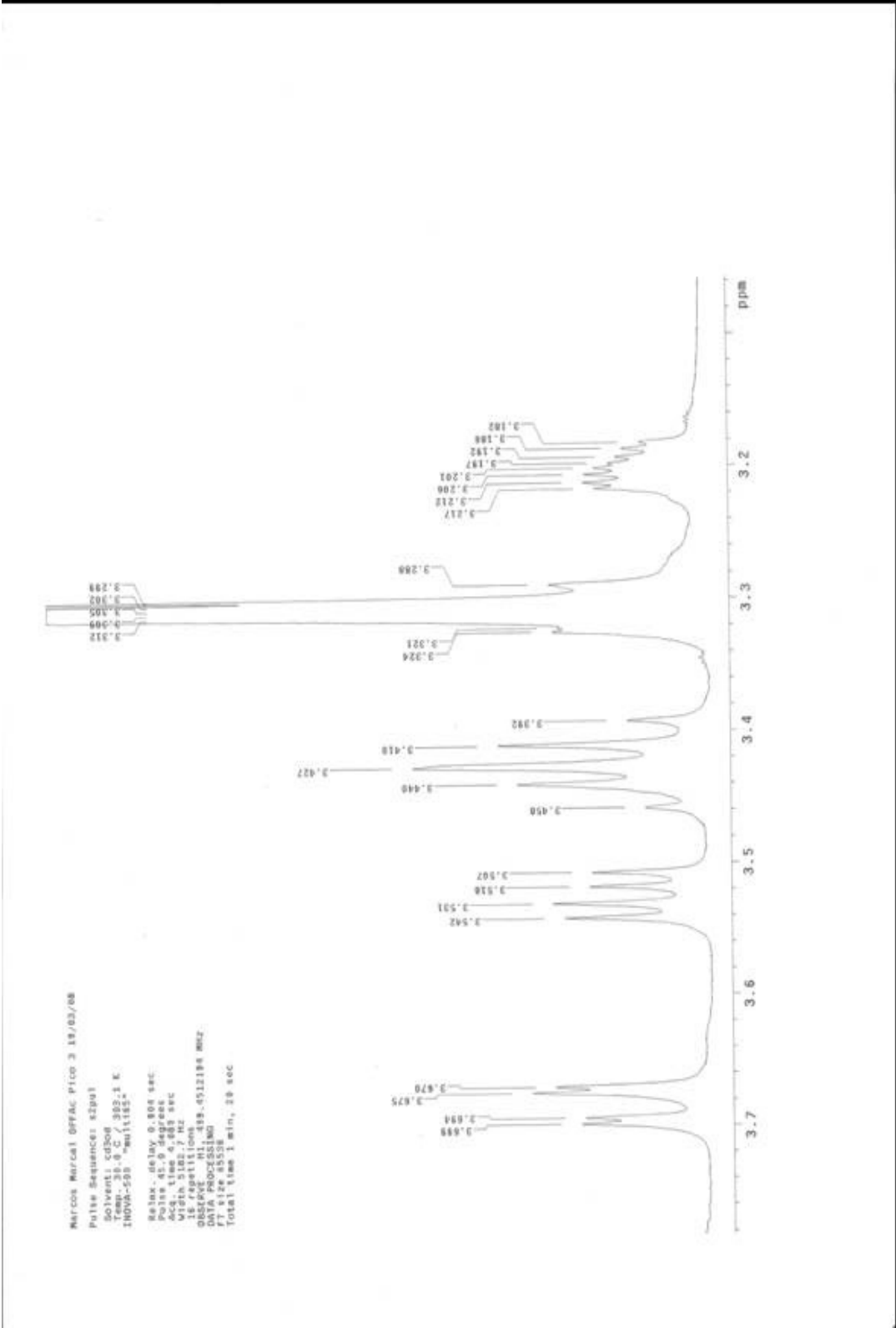


Figura 39: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **1**.

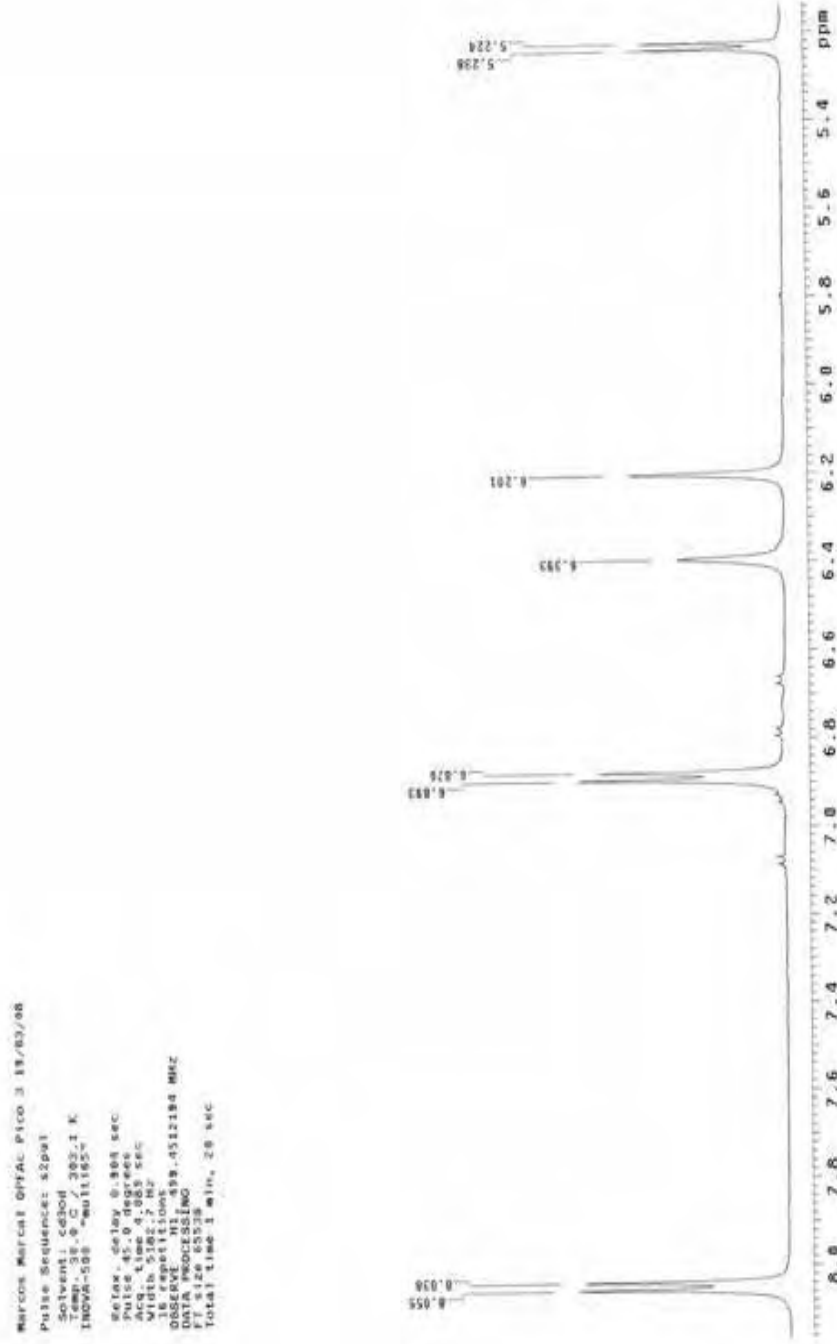


Figura 40:Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 1.

MARCOS MARCAL OFIAC FS PICO 3 19/03/08

Pulse Sequence: zgpg30

Solvent: cd3od

Temp: 30.0 C / 303.1 K

User: J-14-87

INNOVA-500 Multispec

Relax. delay 9.352 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.002 sec

Wait 0.002 sec

338 repetitions

OBSERVE C13, 125.569506 MHz

DECOUPLE H1, 459.453768 MHz

continuous on

WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Decoupling 1.0 Hz

FT size 65536

Total time 33 min, 26 sec

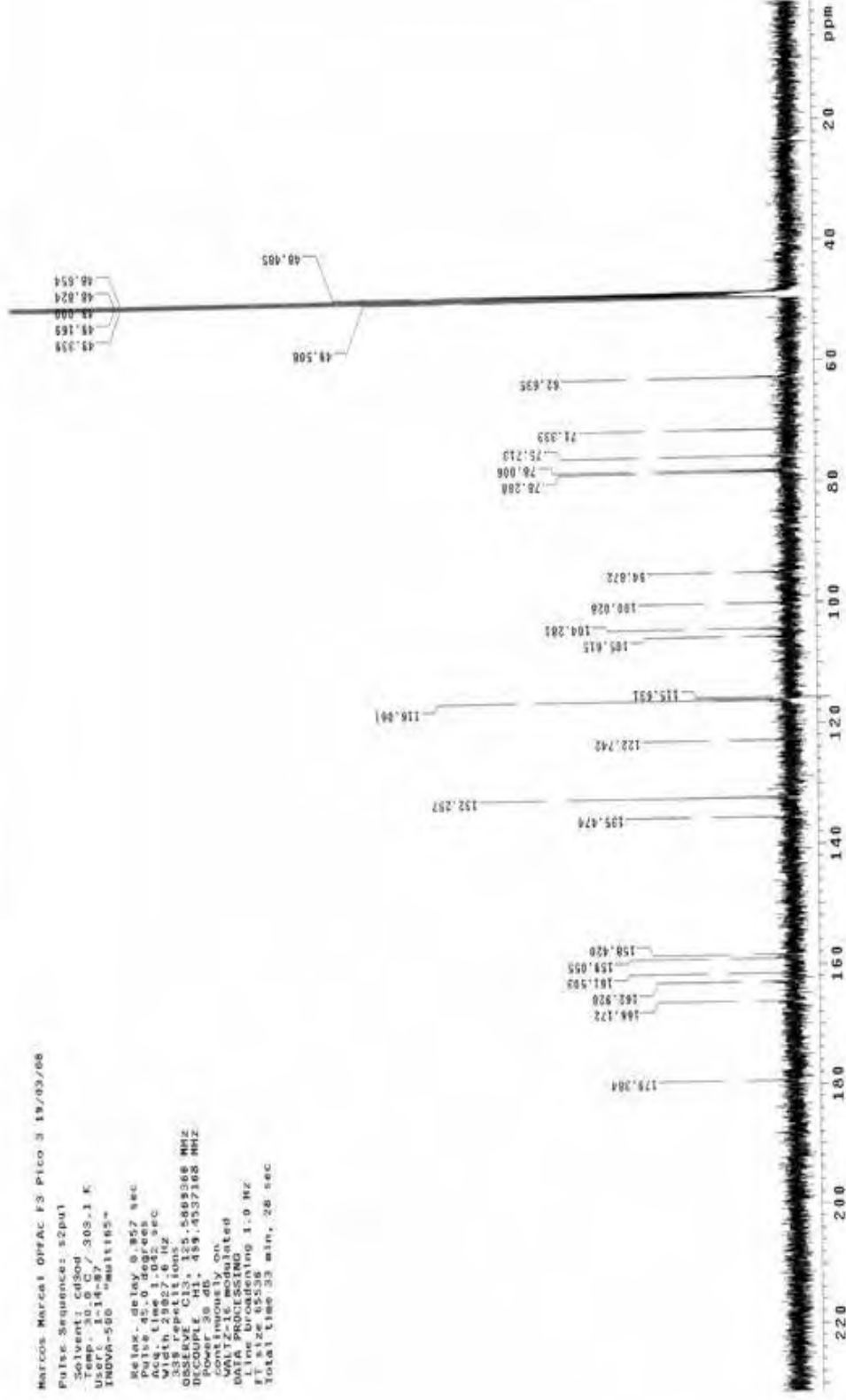


Figura 41: Espectro de RMN de ^{13}C de 1.



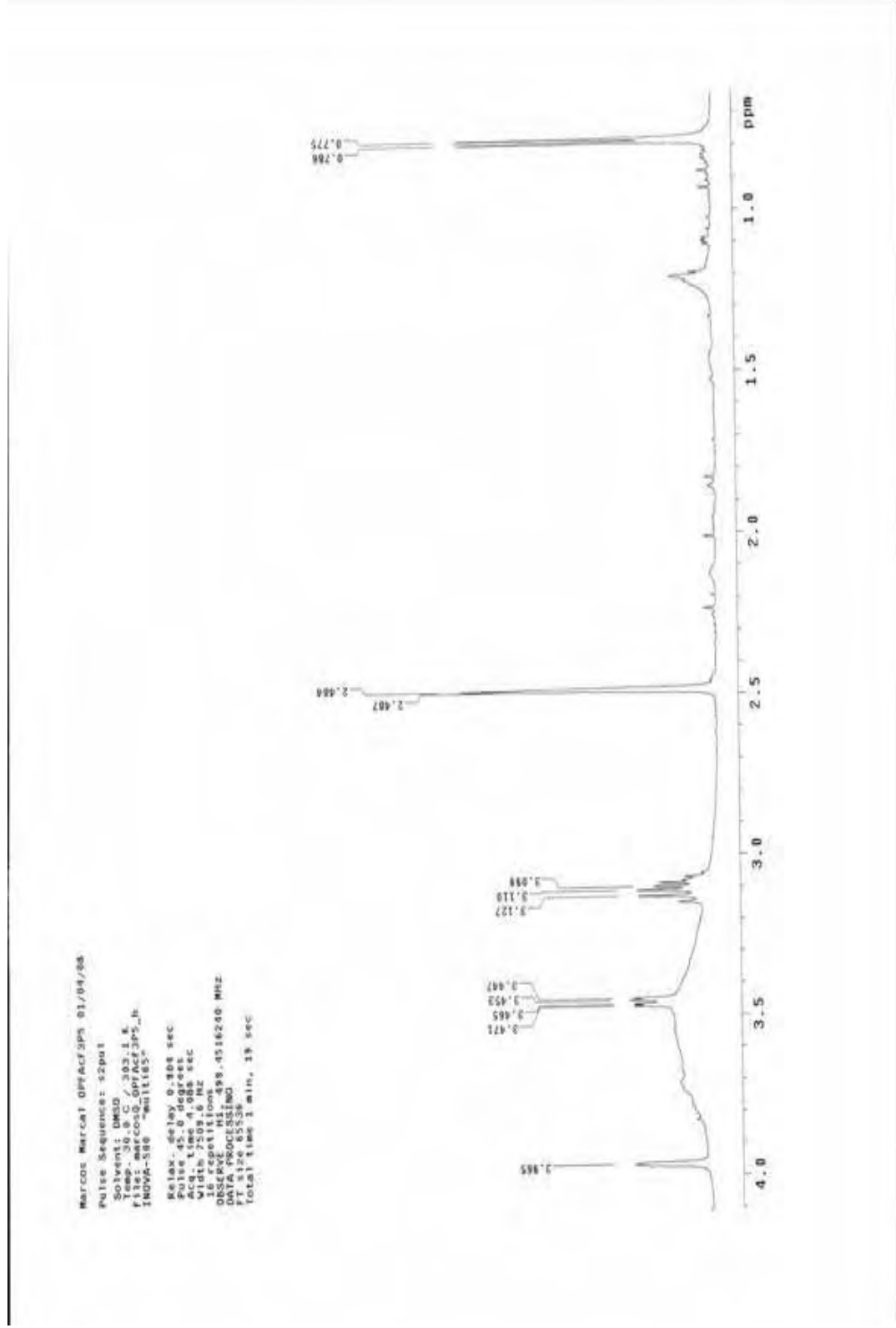


Figura 43: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 2.

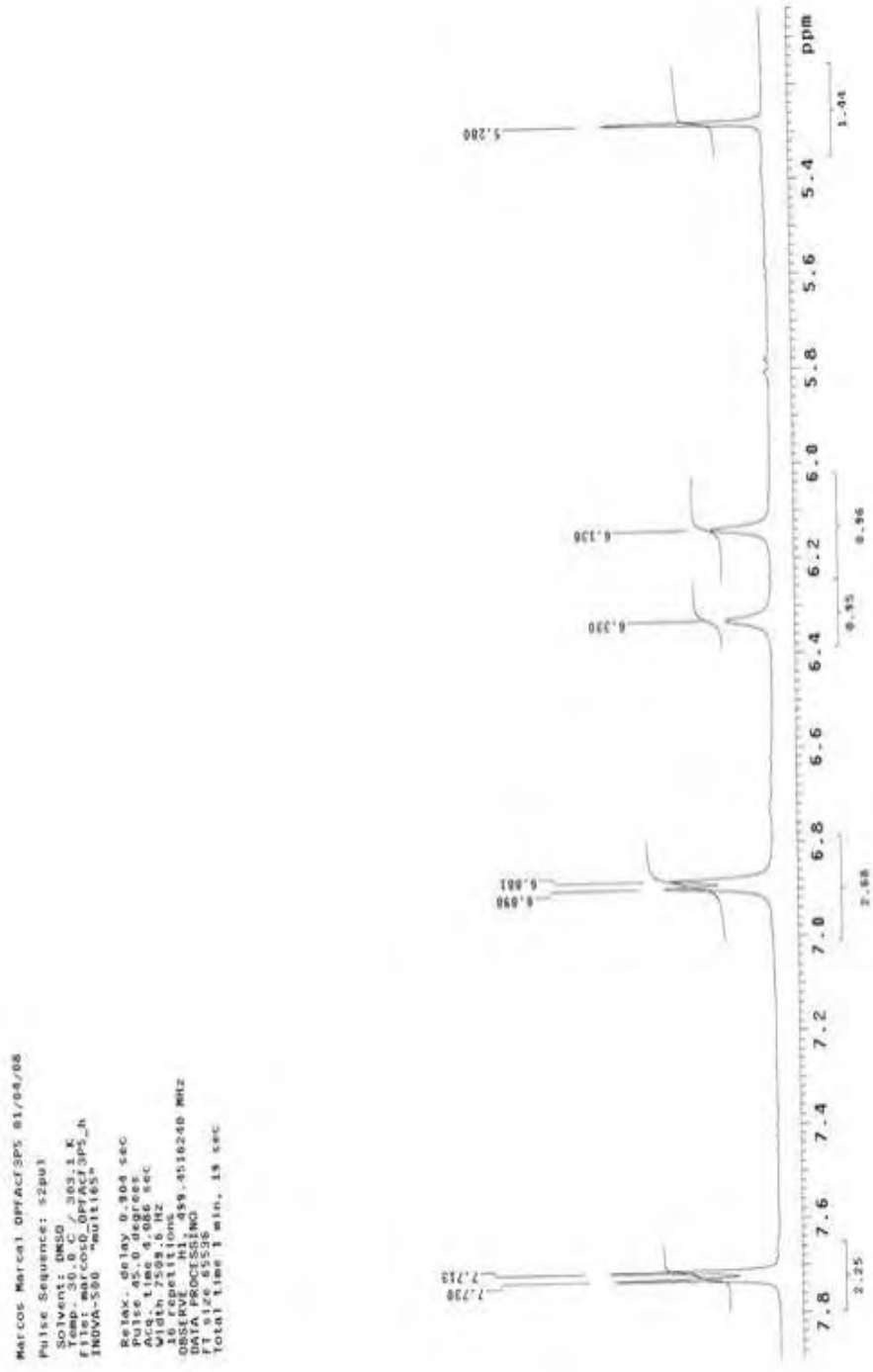


Figura 44: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **2**.

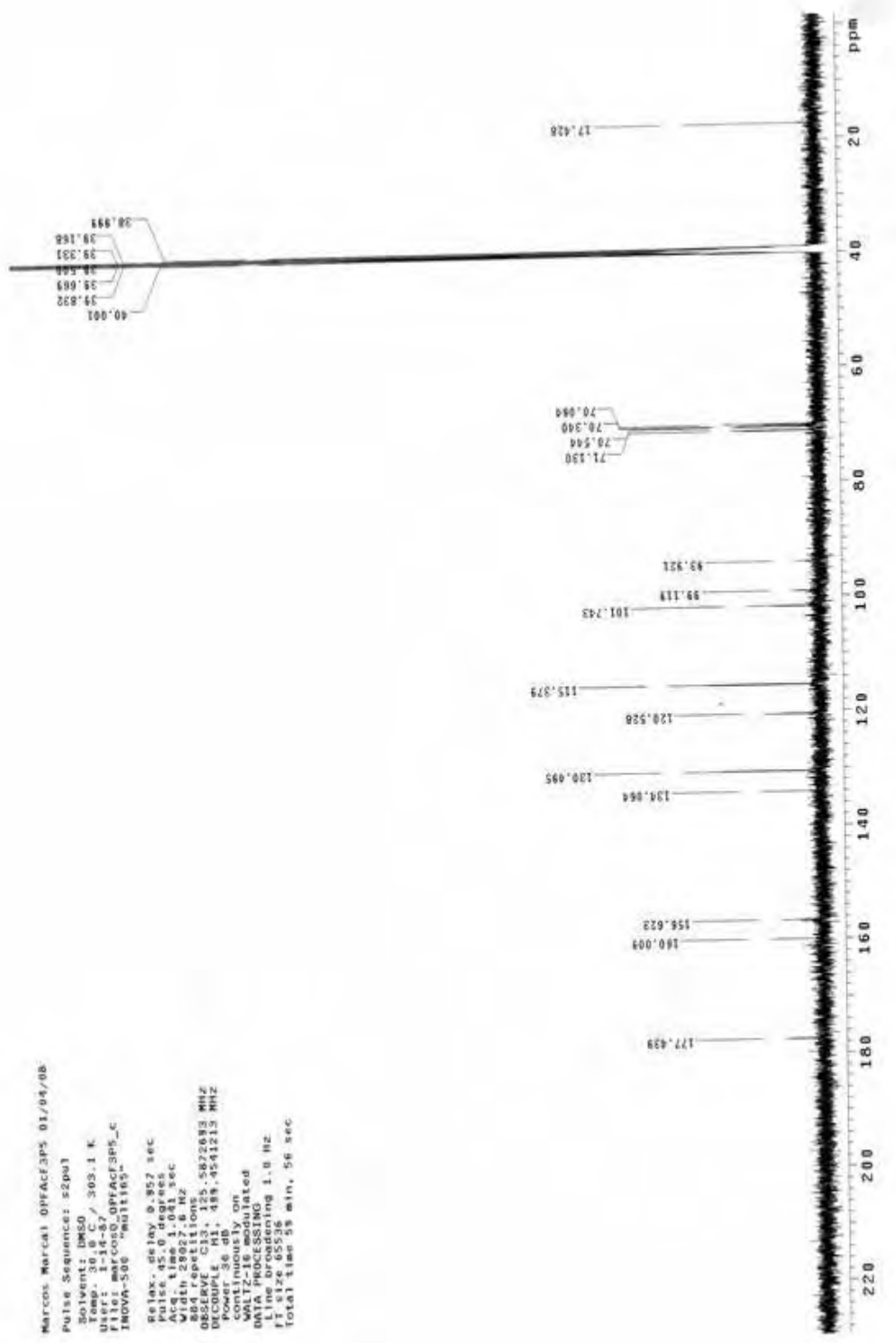


Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2.

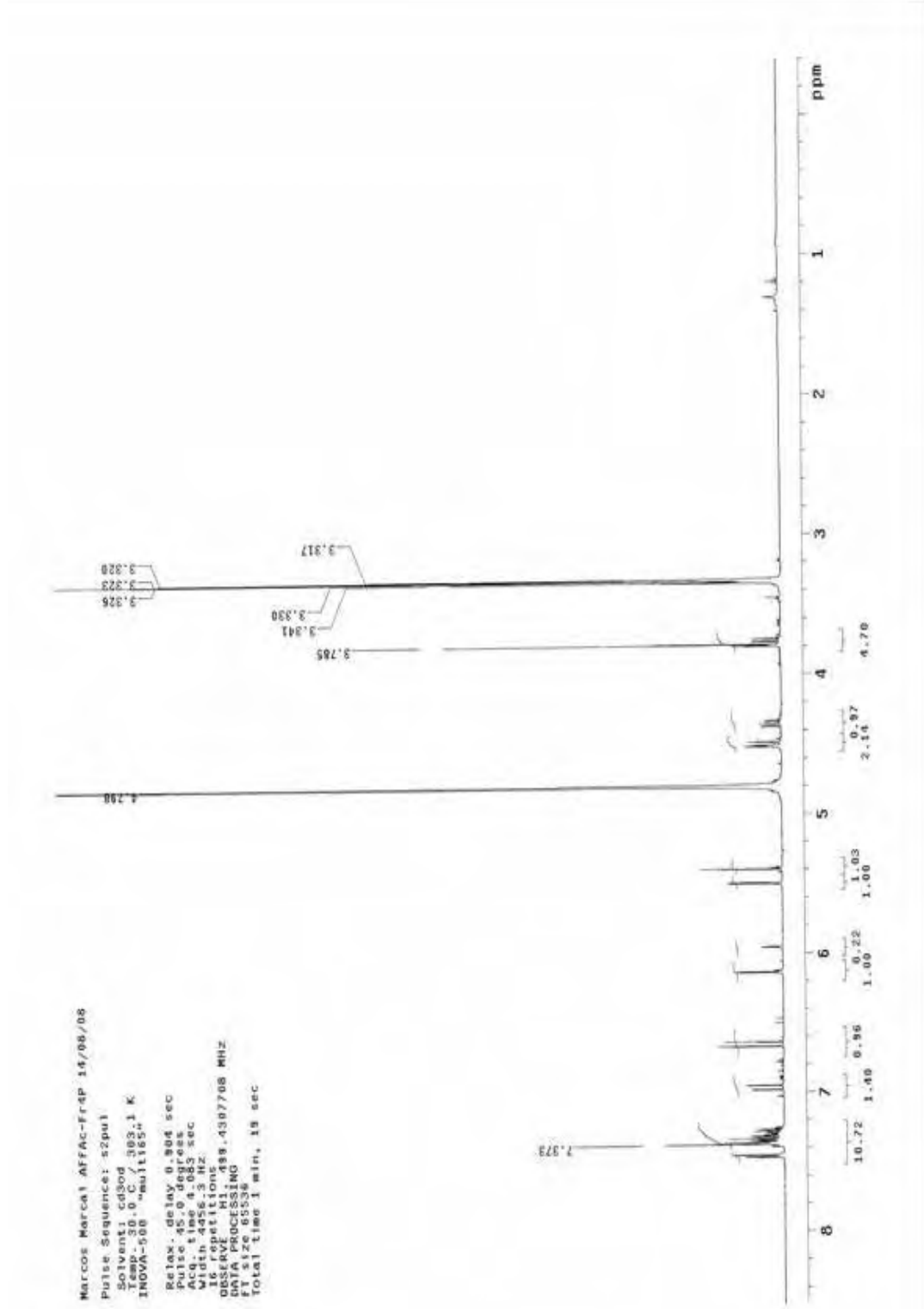


Figura 46: Espectro de RMN de ^1H de 4 (ESPI-2).

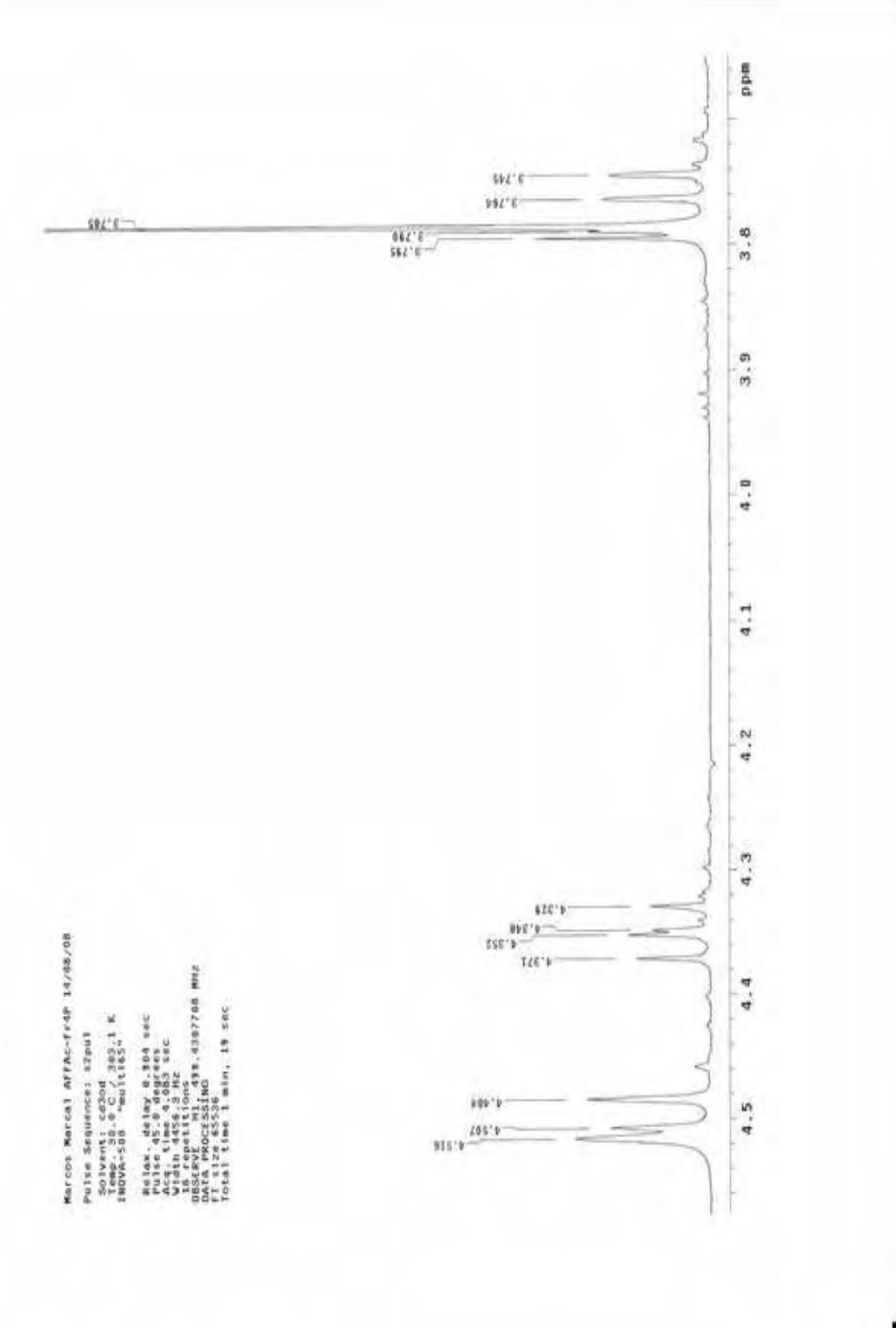


Figura 47: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 4 (ESPI-2).

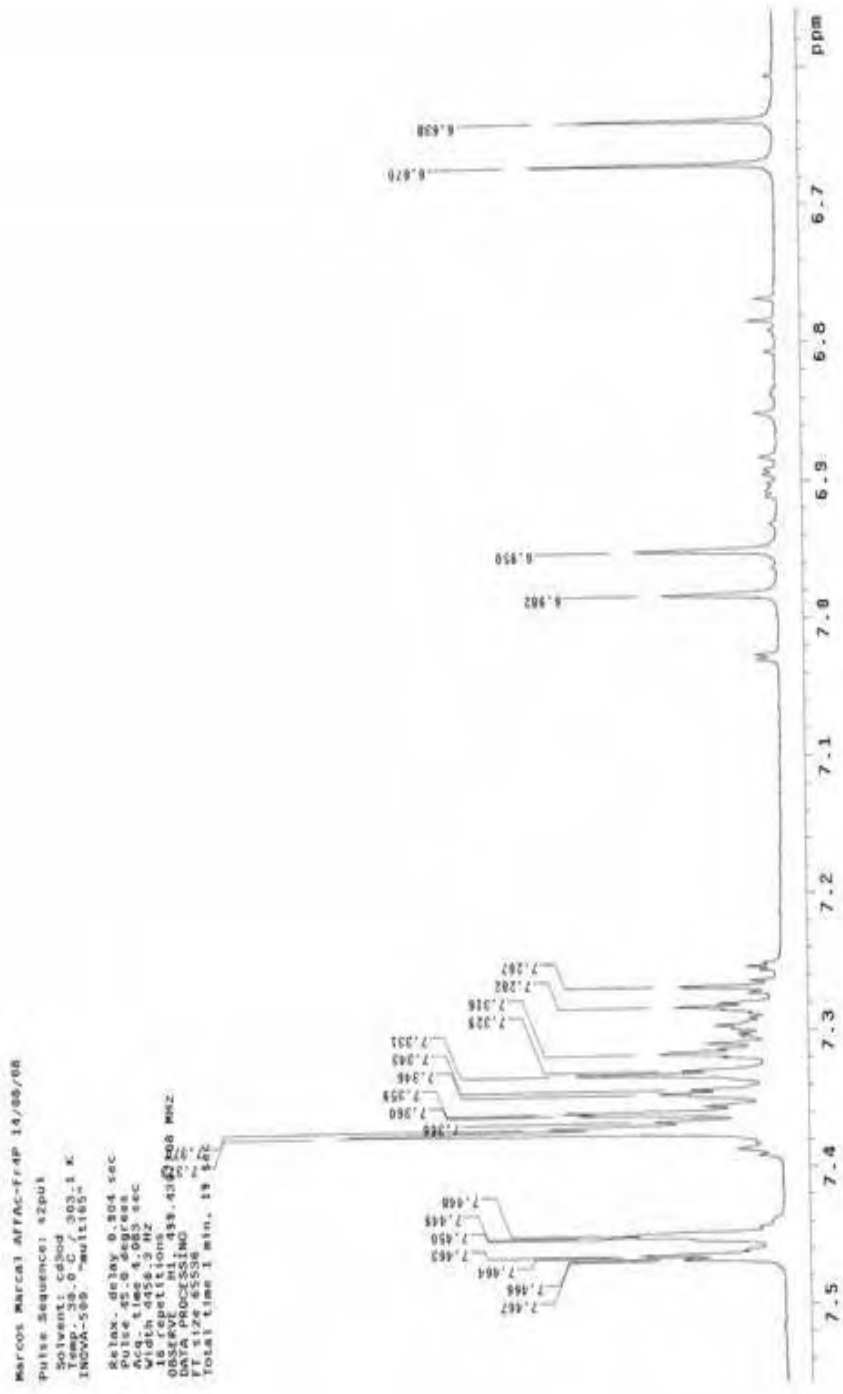


Figura 48: Ampliação do espectro de RMN de ¹H de **4** (ESPI-2).

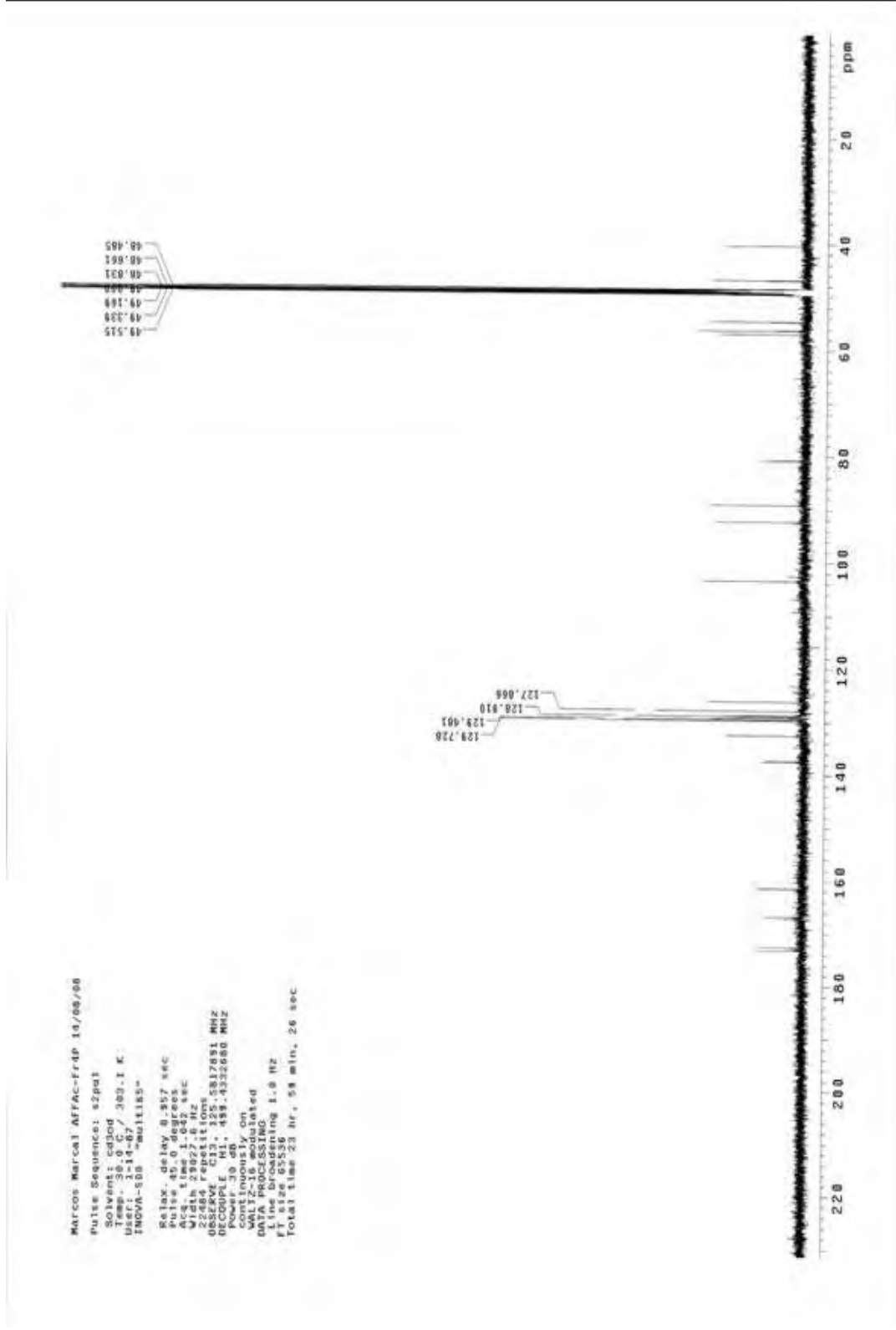


Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C de 4 (ESPI-2).

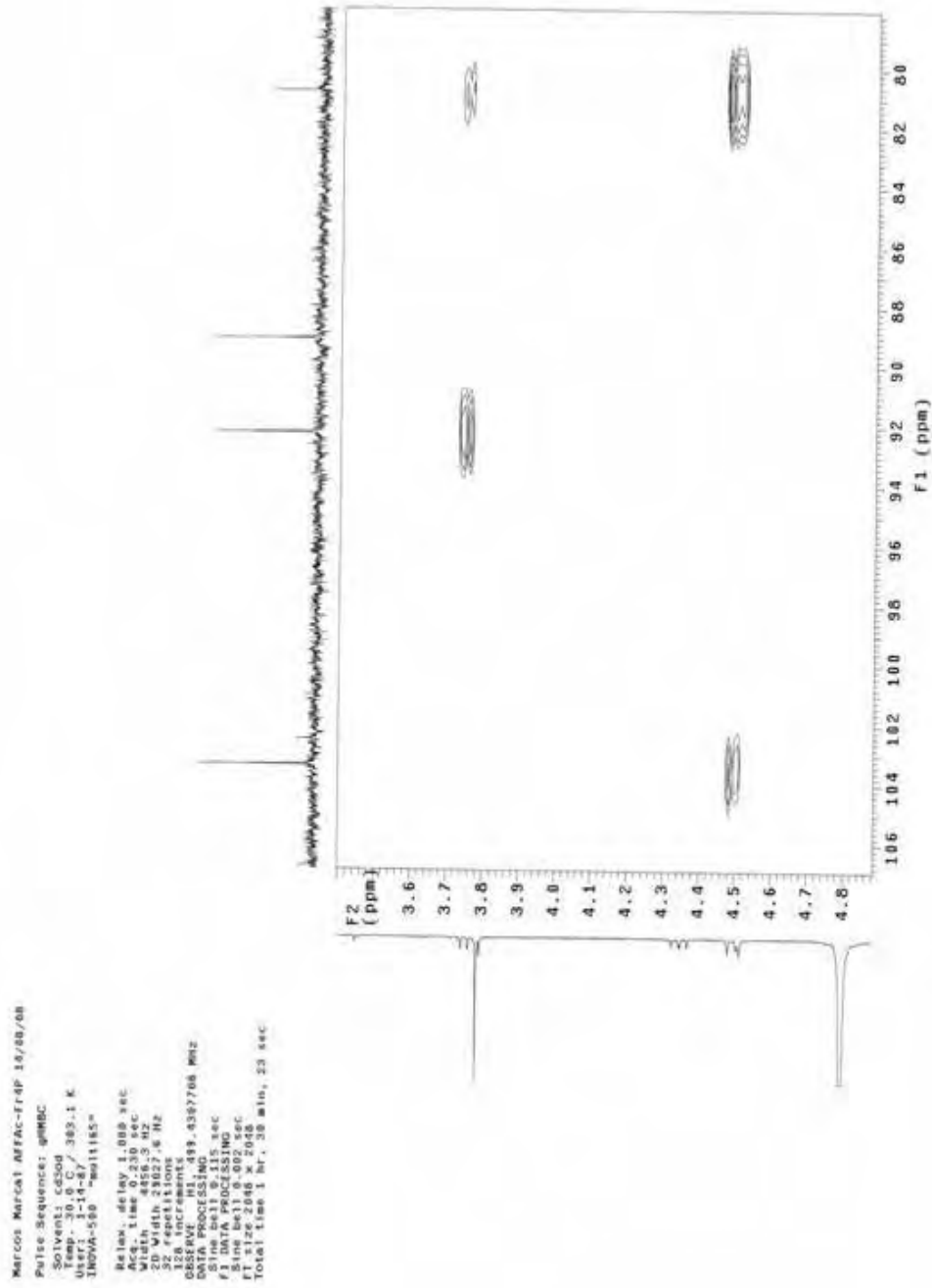


Figura 50: Mapa de contornos gHMBC de 4 (ESPI-2).

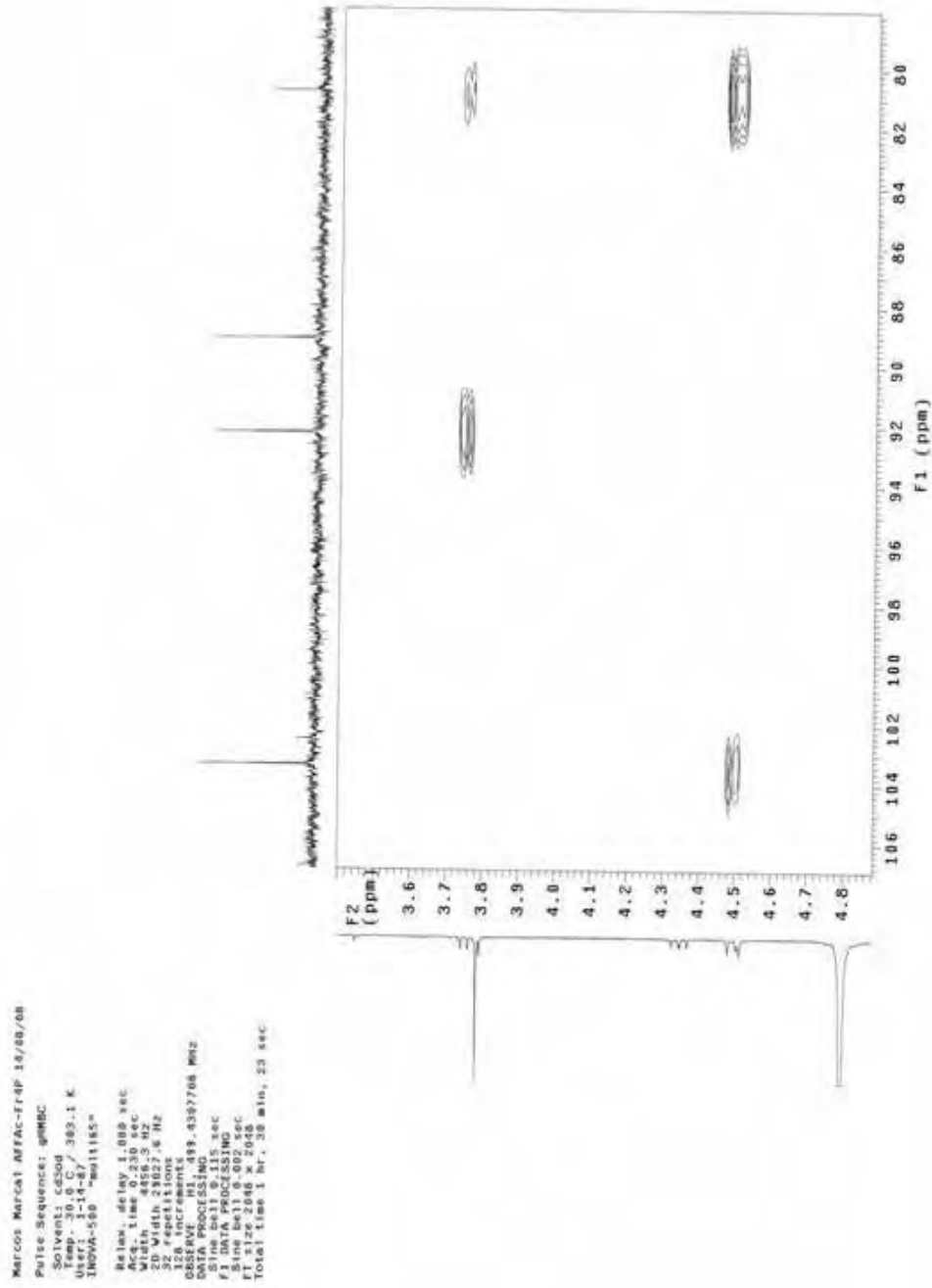


Figura 51: Mapa de contornos gHMBC de 4 (ESPI-2).

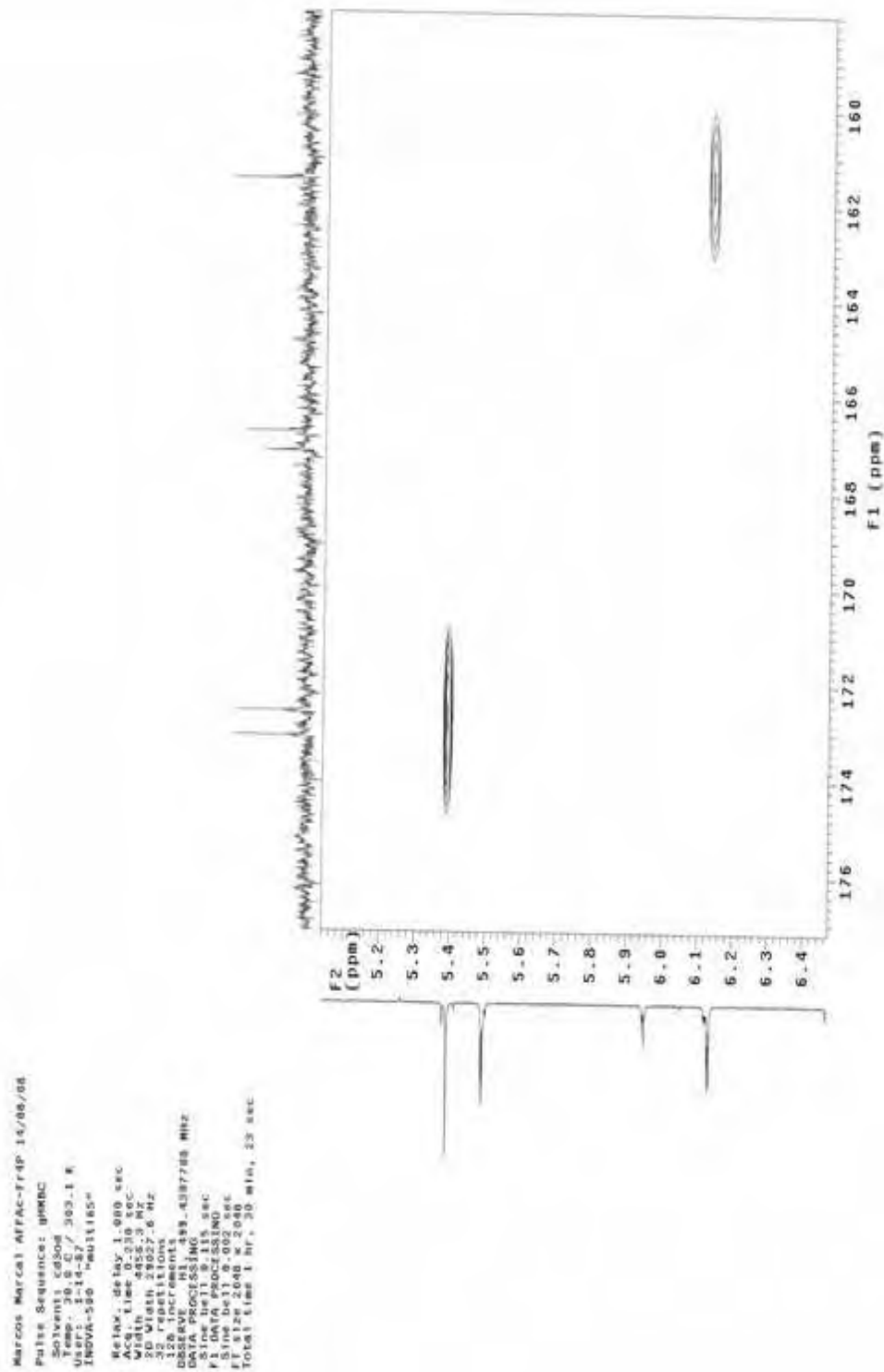


Figura 53: Mapa de contornos gHMBC de 4 (ESPI-2).

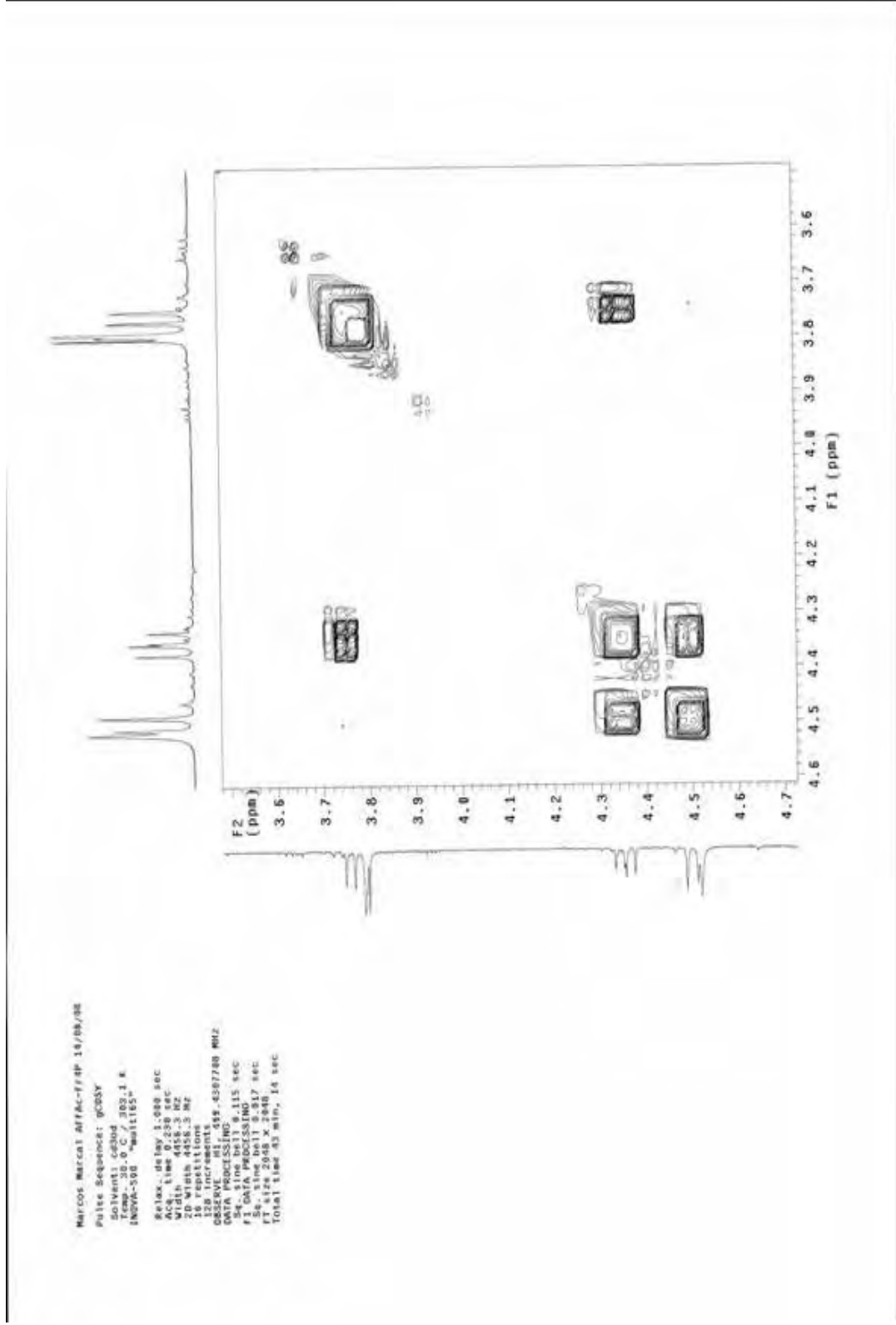


Figura 54: Mapa de contornos gCOSY de 4 (ESPI-2).

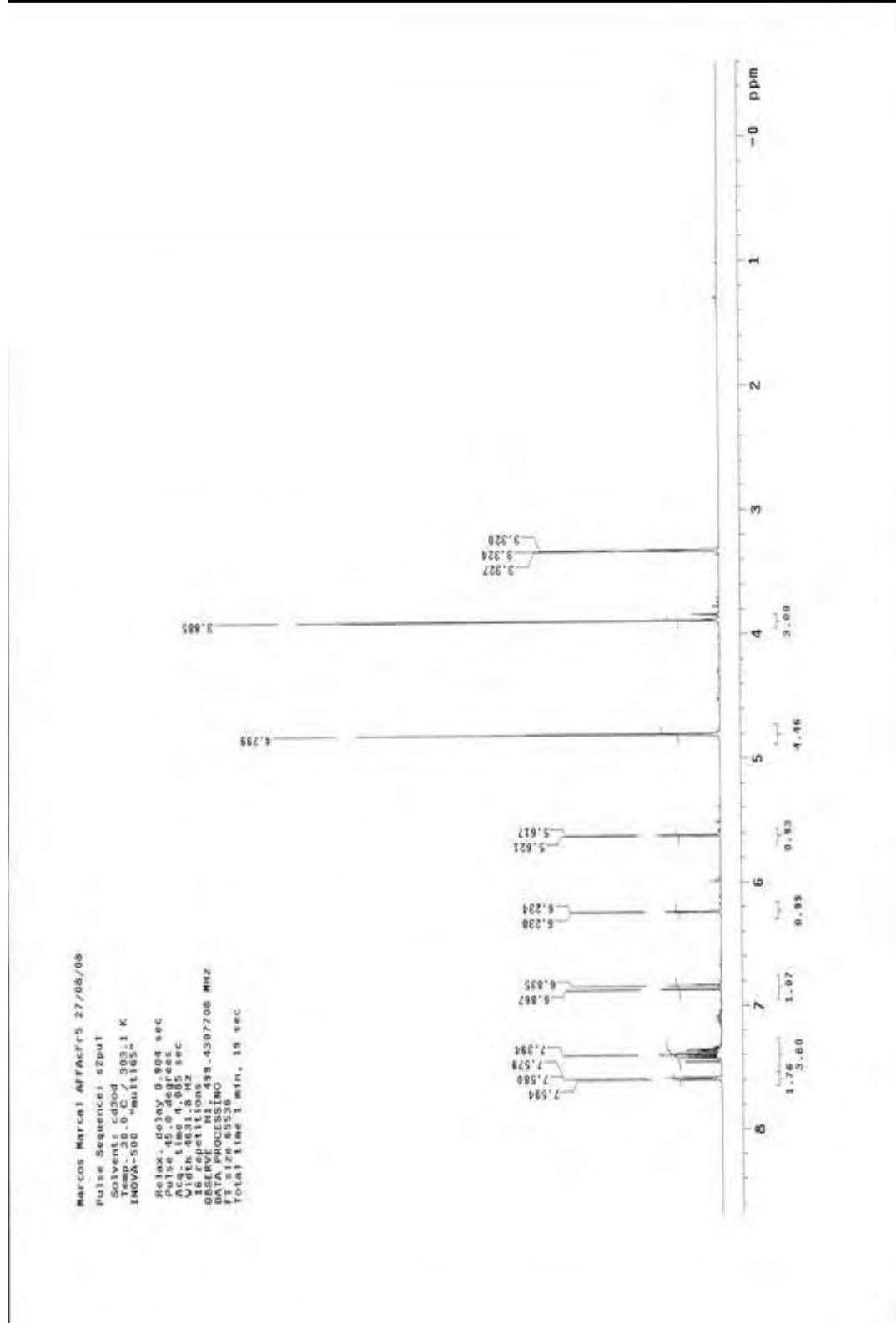


Figura 55: Espectro de RMN de ^1H da substância **3** (ESPI-1).

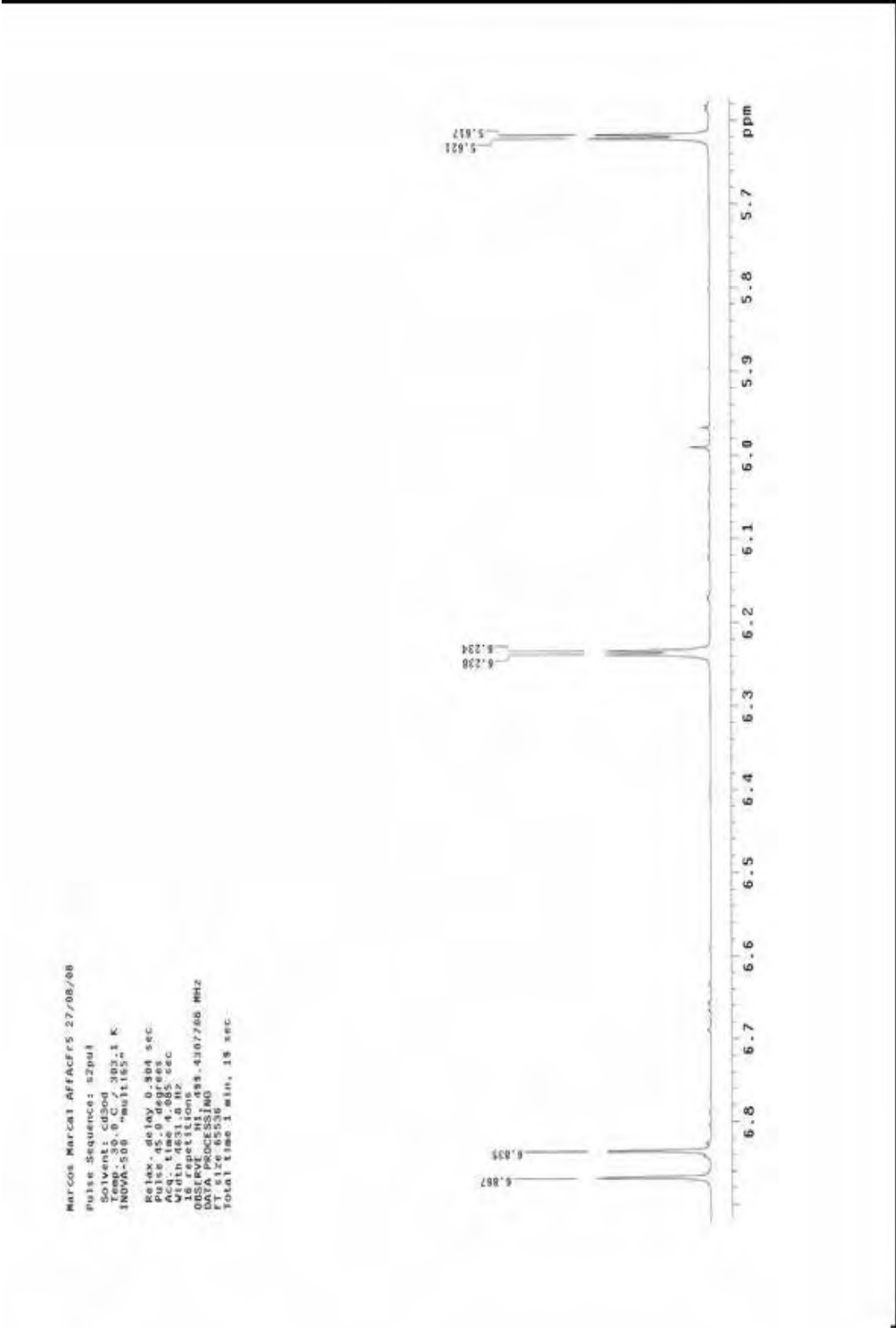


Figura 56: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 3 (ESPI-1).

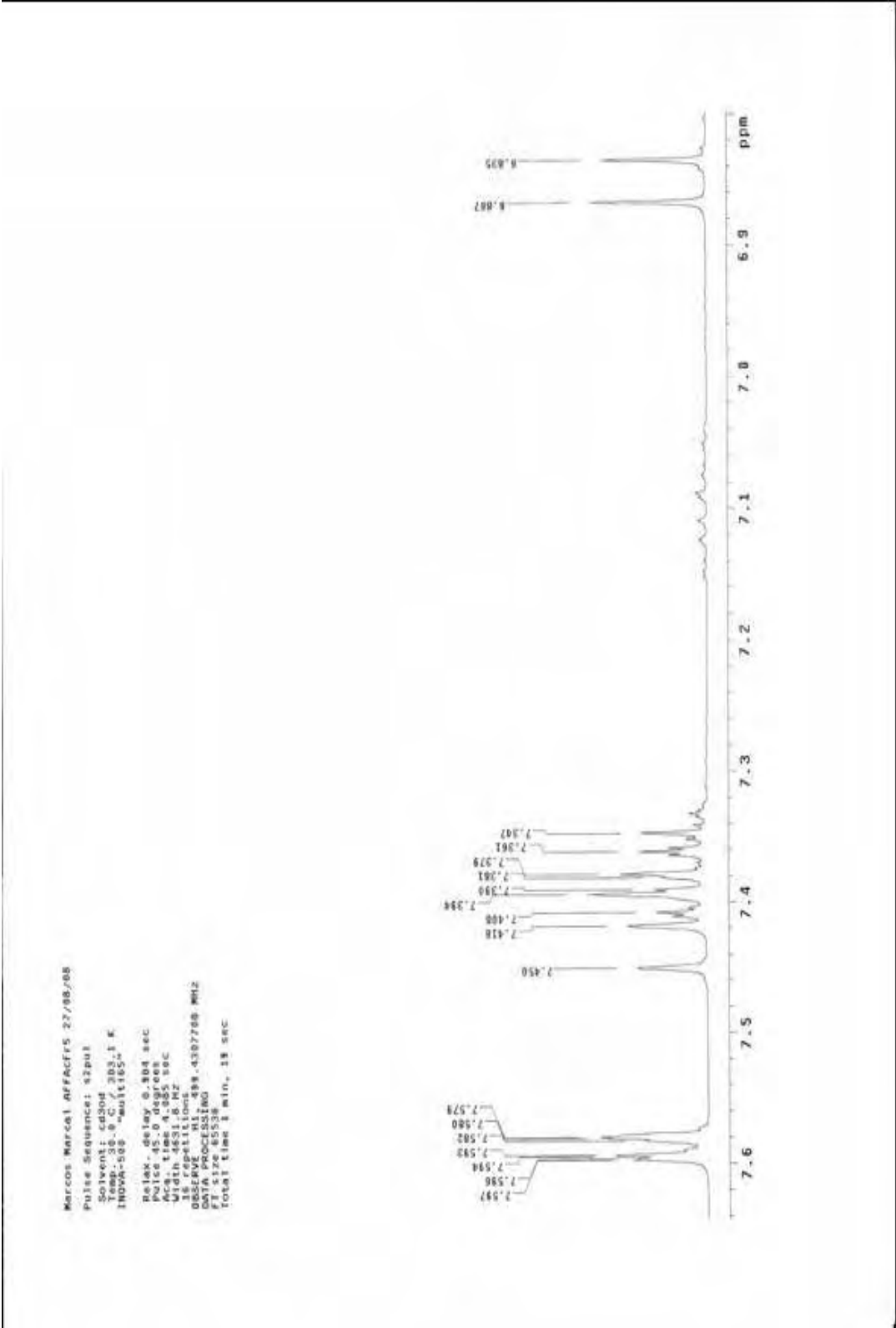


Figura 57: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **3 (ESPI-1)**.

Marcos Marcal AffAcFr5 27/08/88
 Pulse Sequence: zgpg30
 Solvent: CDCl3
 Temp: 30.0 C, 300.1 K
 User: 1-14-87
 INOVA-500 "multispec"
 Relax-delay 8.000 sec
 Acq. time 1.000 sec
 Width 23927.6 Hz
 Frequency 125.760 MHz
 DECOUPLE C13, 435.432600 MHz
 Power 30 dB
 Continuously
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 Gain 10.00
 Total time 4 hr, 09 min, 52 sec

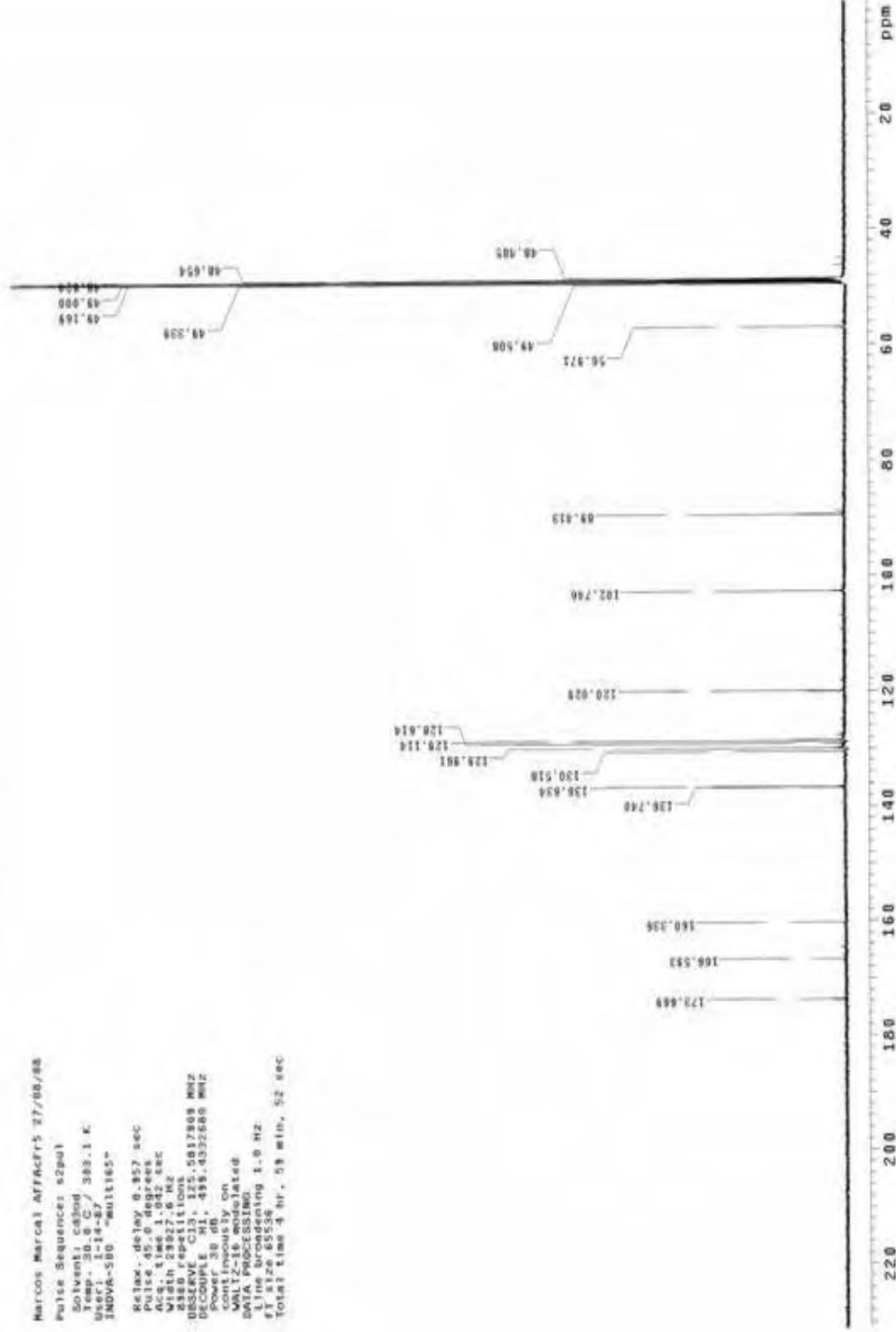


Figura 58: Espectro de RMN de ¹³C de 3 (ESPI-1).

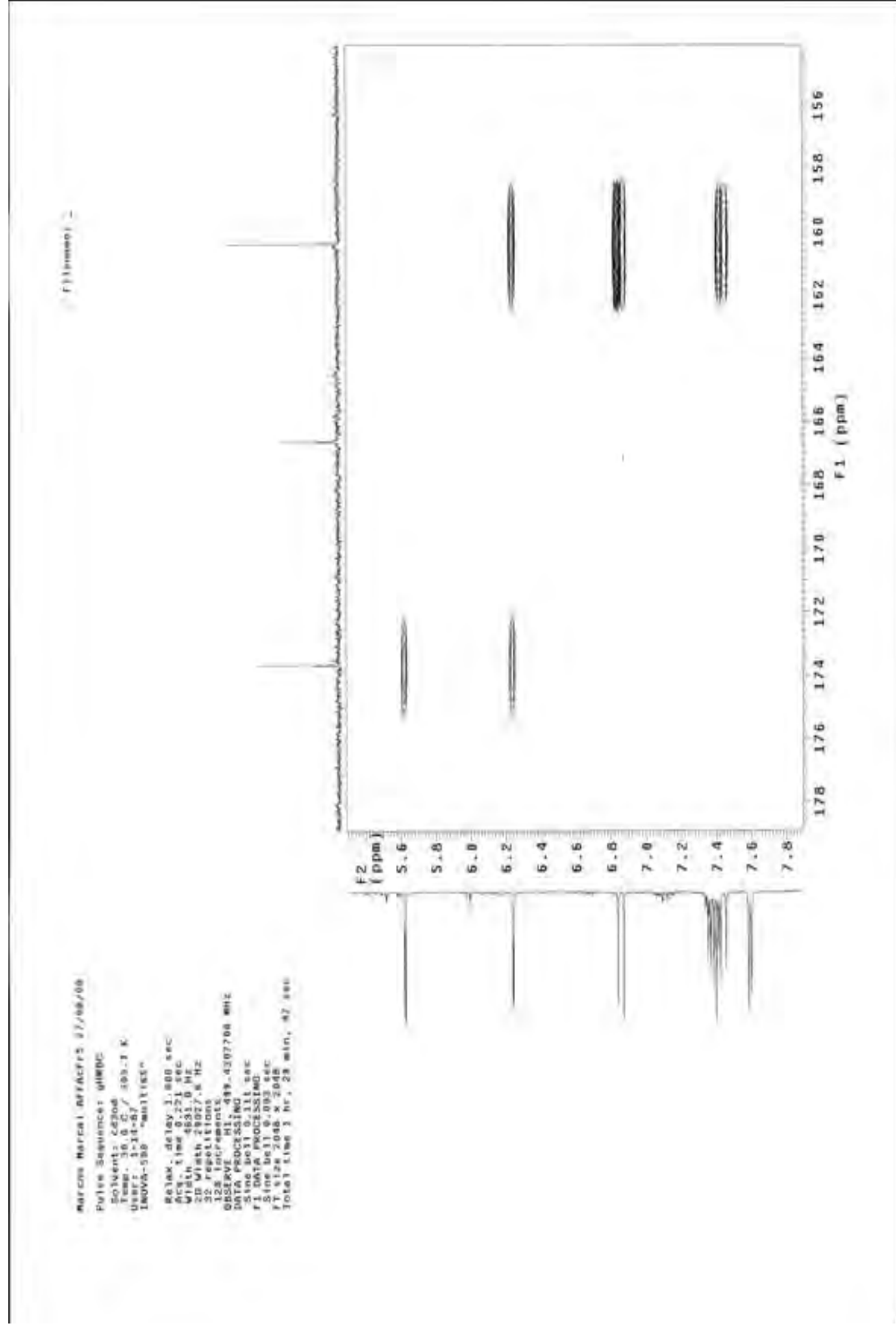


Figura 60: Mapa de contornos gHMBC de **3** (ESPI-1).

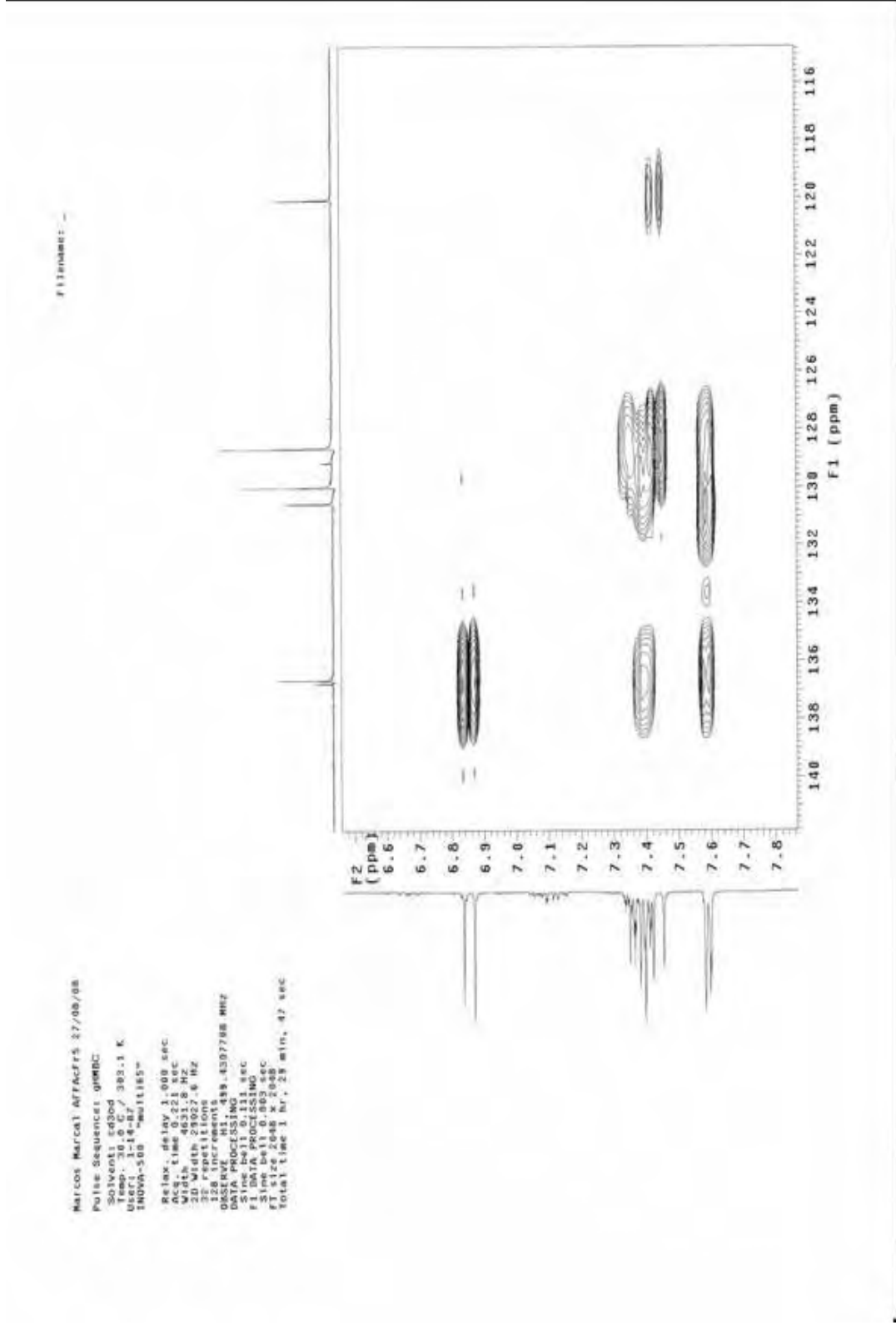


Figura 61: Mapa de contornos gHMBC de **3** (ESPI-1).

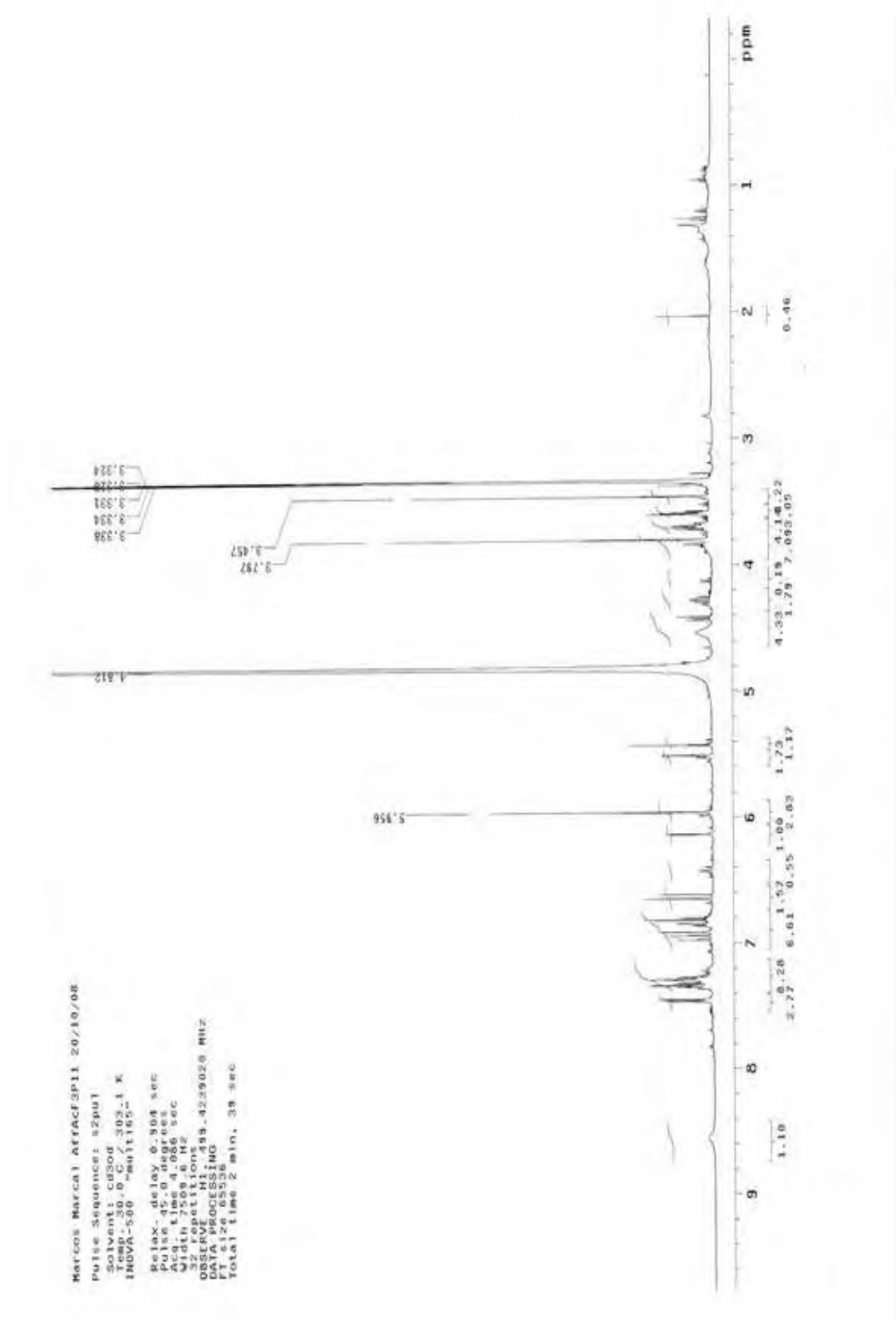


Figura 63: Espectro de RMN de ^1H de 5 (ESPI-3).

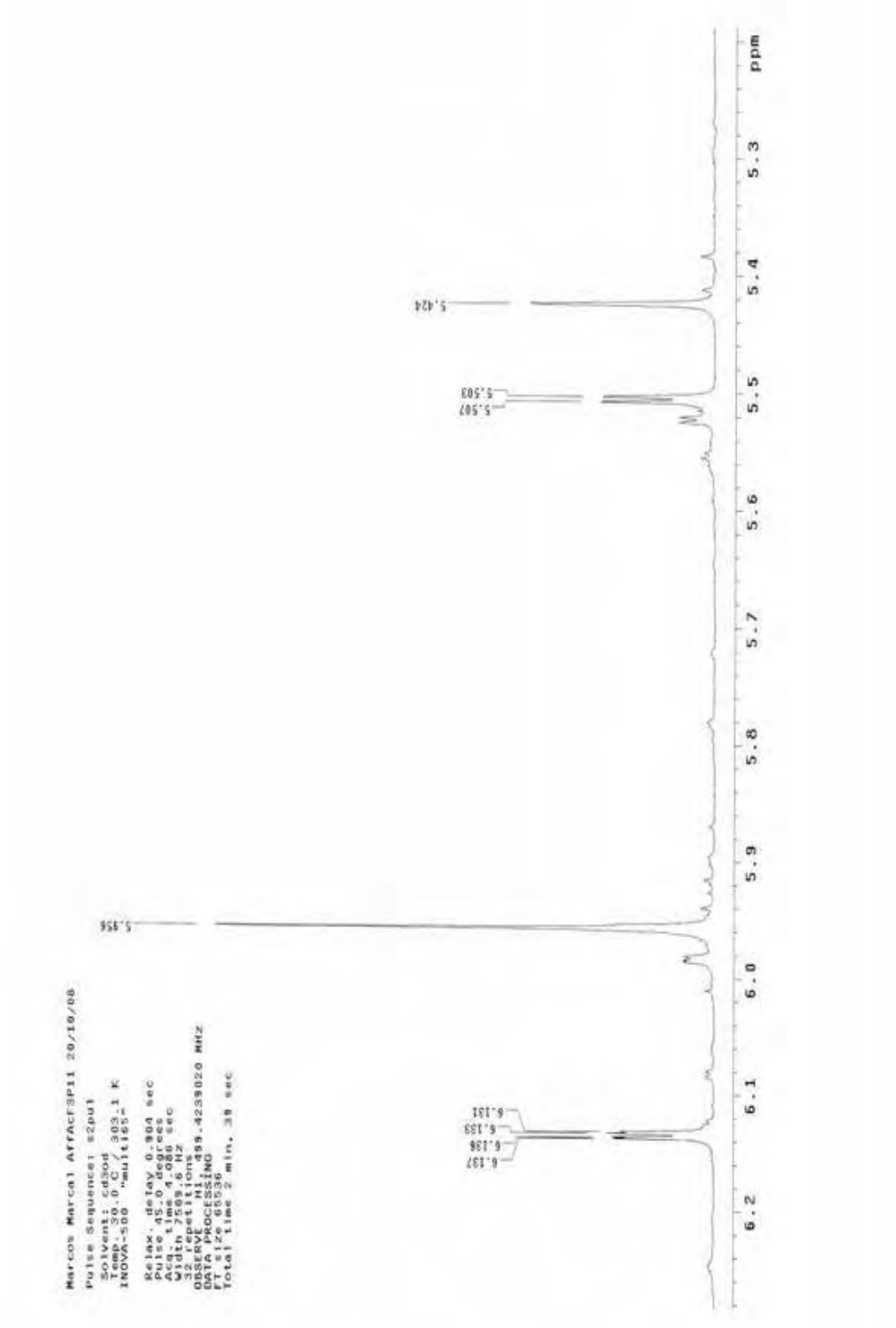


Figura 64: Espectro de RMN de ^1H de **5** (ESPI-3).

4arcos Marca) AffAcF3P11 20/10/08

Pulse Sequence: e2pu1

Solvent: cd3od 303.1 K

Temperature: 303.1 K

INOVA-500 "mult163"

Relax. delay: 0.504 sec

Pulse: 45.0 degrees

Acq. time: 4.086 sec

Width: 7509.6 Hz

32 repetitions

OBSERVE: H1: 499.4239020 MHz

DATA: 160C5536

PT: 17.55536

Total time: 2 min, 39 sec

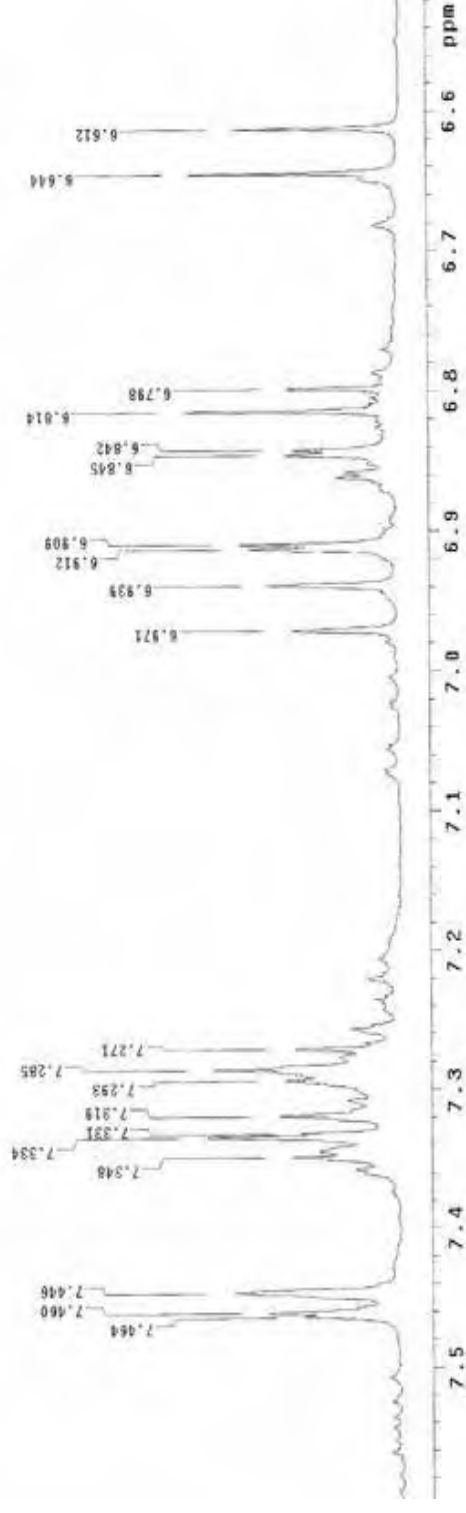


Figura 65: Espectro de RMN de ¹H de 5 (ESPI-3).

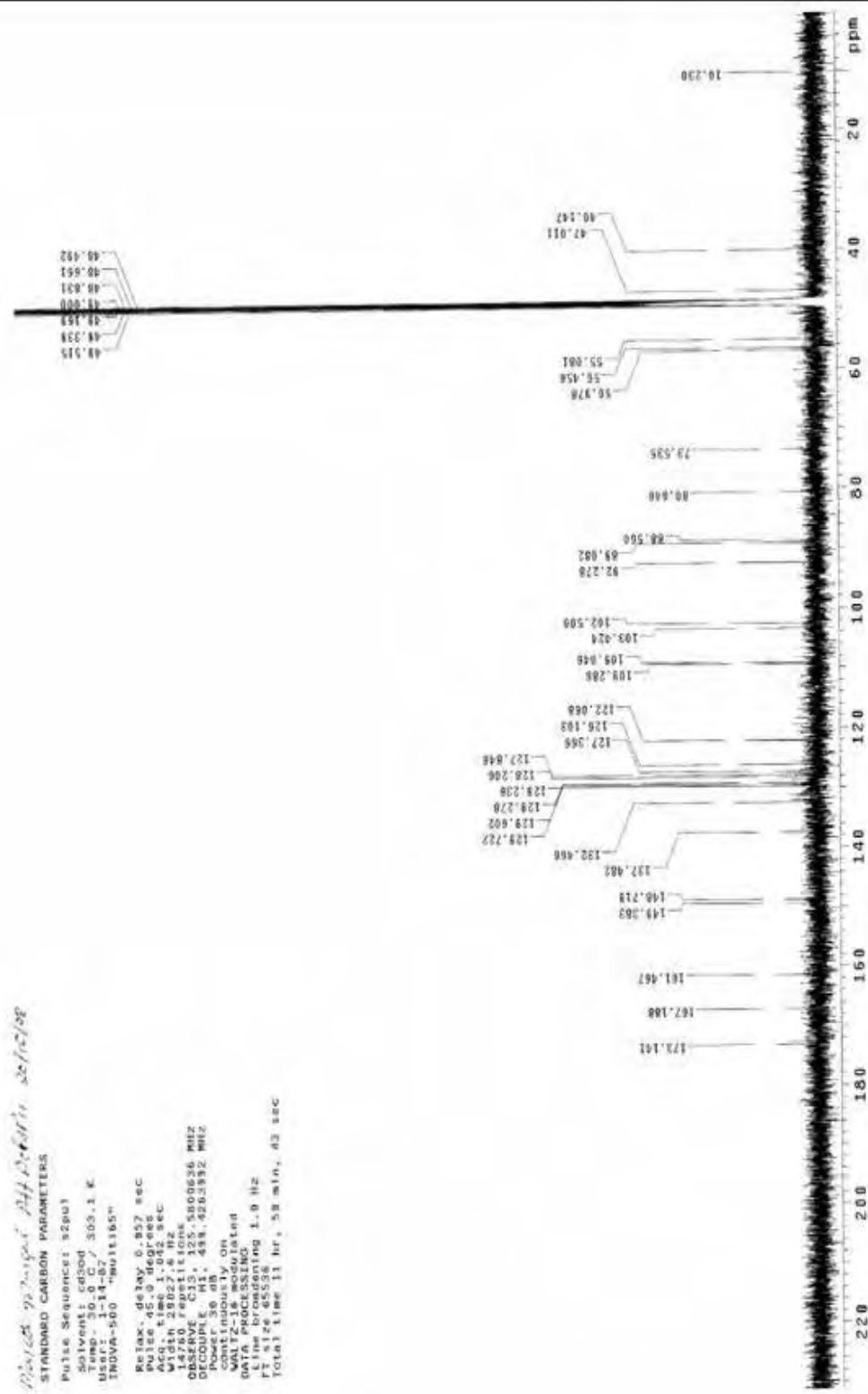


Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C de 5 (ESPI-3).

Marcos Marcal AFFAC3P11 26/10/08

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: DMSO

Temp: 30.0 C / 363.1 K

INVA=508 "mz1185"

Relax, delay 1.000 sec

Acq. time 20.16 sec

2D Width 7508.6 Hz

16 Repetitions

16 Repetitions

DATA PROCESSING

DATA PROCESSING

32 Data Points

32 Data Points

FT size 2048 x 2048

Total time 28 min, 48 sec

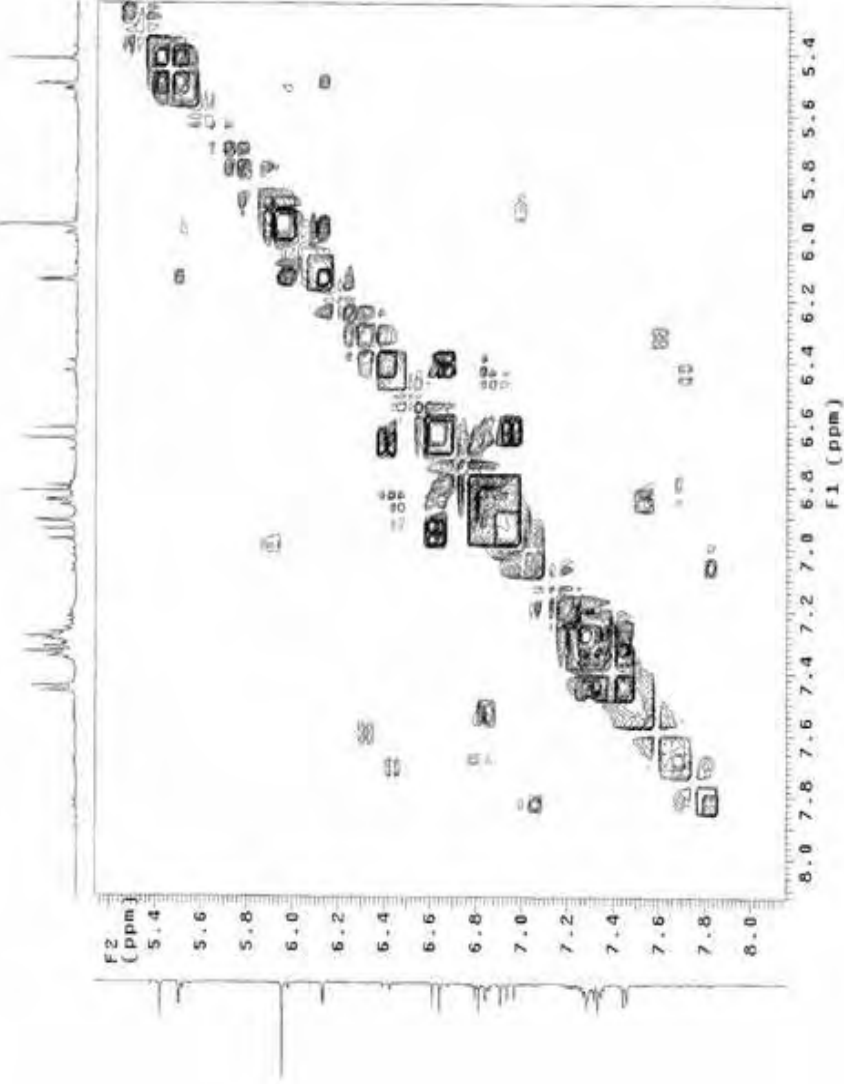


Figura 67: Mapa de contorno gCOSY de 5 (ESPI-3).

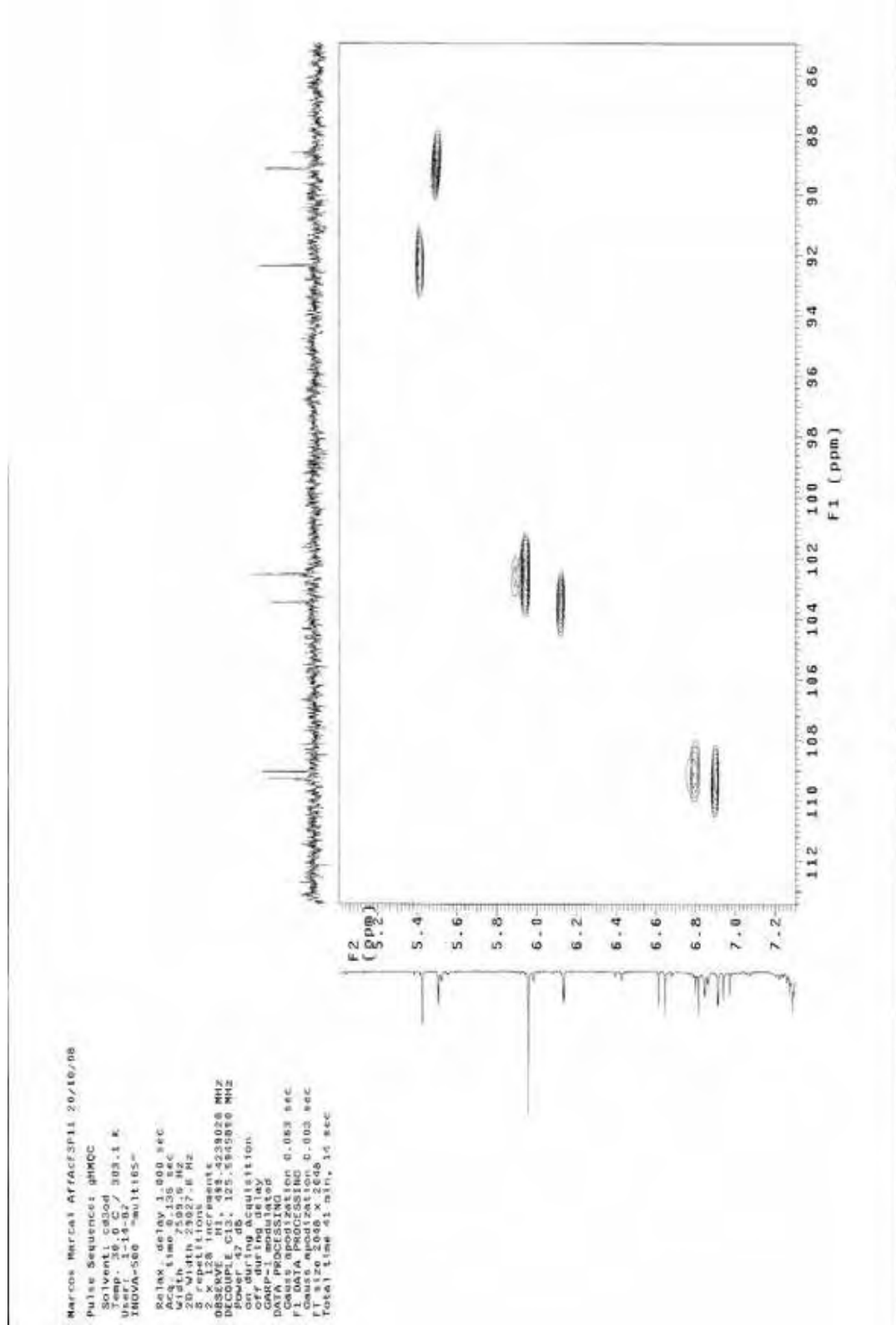


Figura 68: Mapa de contorno gHMQC de 5 (ESPI-3).

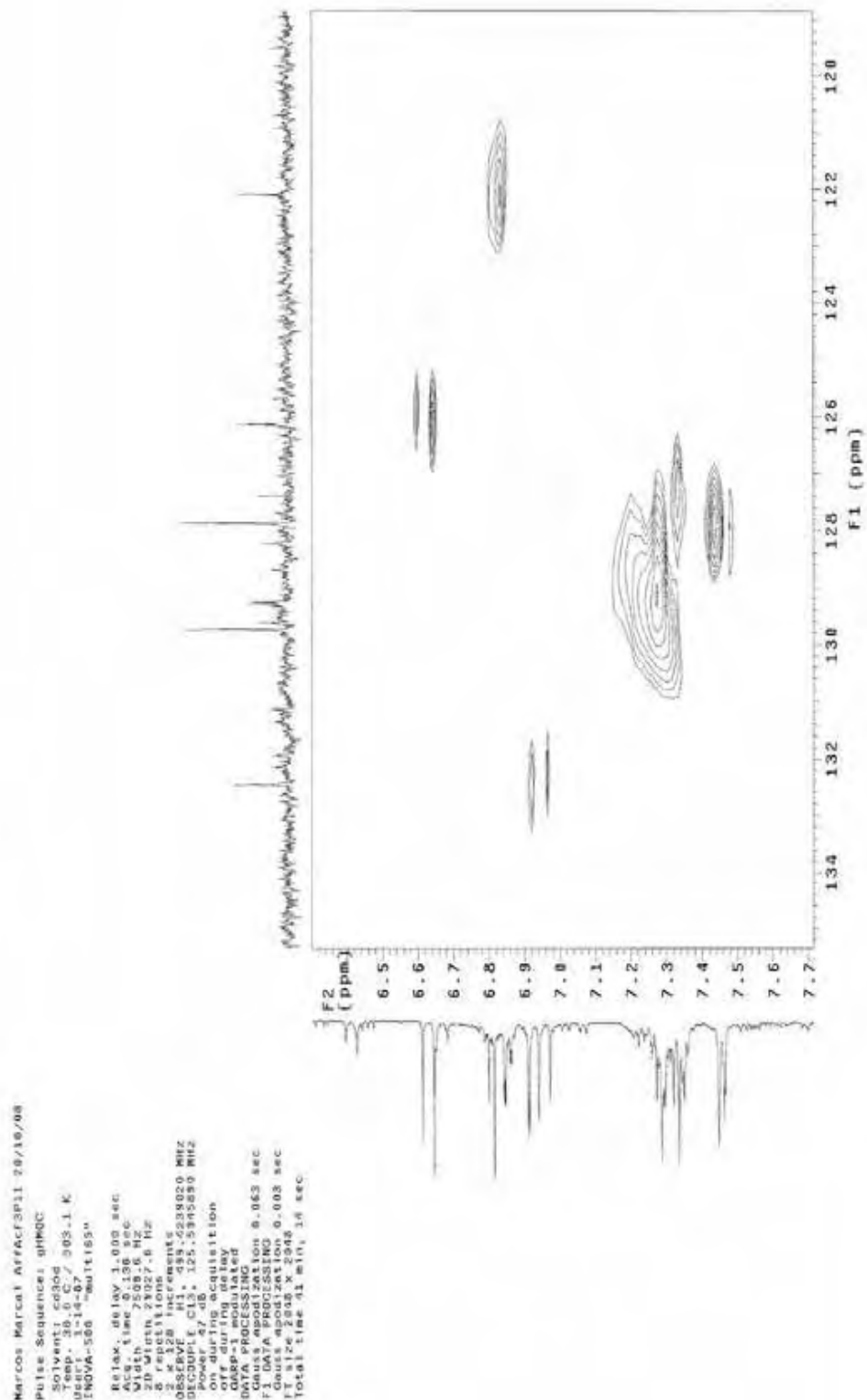


Figura 69: Mapa de contorno gHMQC de 5 (ESPI-3).

ERROR: stackunderflow
OFFENDING COMMAND: ~

STACK: